



HAL
open science

Régulation de la migration des cellules dendritiques : étude des mécanismes dépendant du récepteur de chimiokine CXCR4 et de la protéine Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper.

Mathias Vétillard

► To cite this version:

Mathias Vétillard. Régulation de la migration des cellules dendritiques : étude des mécanismes dépendant du récepteur de chimiokine CXCR4 et de la protéine Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper.. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASQ002 . tel-03505888

HAL Id: tel-03505888

<https://theses.hal.science/tel-03505888>

Submitted on 1 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Régulation de la migration des cellules
dendritiques : étude des mécanismes
dépendant du récepteur de chimiokine
CXCR4 et de la protéine Glucocorticoid-
Induced Leucine Zipper

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Structure de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation
microbiome immunosurveillance, 92290, Châtenay-Malabry, France.

Référent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Chatenay-Malabry,
Le 18 septembre 2020, par**

Mathias VÉTILLARD

Composition du Jury

Bernard MAILLÈRE

DR, HDR, CEA de Saclay (DRF Joliot SIMOPRO)

Président

Elodie SEGURA

CR, HDR, Institut Curie (INSERM U932)

Rapporteur

Marc DALOD

DR, HDR, CIML (CNRS U1104)

Rapporteur

Ana-Maria LENNON DUMENIL

DR, Institut Curie (INSERM U932)

Examinatrice

Olivier MIGNEN

MCU, LABI (INSERM UMR1227)

Examineur

Géraldine SCHLECHT-LOUF

PU, Université Paris-Saclay (INSERM UMR996)

Directrice de
thèse

A ma grand-mère, Claude.

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement tous les membres de mon jury de thèse pour l'attention qu'ils porteront à la lecture de ce manuscrit ainsi qu'à l'évaluation de mon travail.

Au président de mon jury, Dr Maillère, j'exprime toute ma sympathie, et je vous remercie d'avoir porté tant d'attention à mon travail, mais aussi à mon avenir professionnel. Dr Segura, je tiens à vous adresser mes remerciements pour votre participation au comité de suivi de ma thèse et votre réactivité dans l'écriture des rapports. Soyez assuré que vos conseils ont été suivis. Dr Lennon-Dumenil, je tiens à vous remercier particulièrement pour nous avoir permis de collaborer avec votre équipe. Je suis honoré de pouvoir partager avec vous l'aboutissement de ce travail. Aux Dr Dalod et Mignen, je tiens à vous remercier d'avoir pris sur votre temps pour évaluer ce travail.

Je remercie le Dr Françoise Bachelerie de m'avoir accueilli dans son unité de recherche. Merci aussi d'avoir toujours été présente et de m'avoir soutenu.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse le Dr Géraldine Schlecht-Louf. Depuis mon stage de M1 en 2015, cela fait 5 ans que tu me m'oriente dans la recherche. C'est grâce à ton encadrement que j'ai pu obtenir ma bourse de thèse et ma subvention de 4^{ème} année. Tu as toujours su conseiller plutôt qu'imposer et tu t'es toujours montrée patiente et à l'écoute. Merci pour ta confiance et pour tout.

Je remercie aussi le Dr Olivier Dellis pour sa disponibilité et son soutien. J'ai toujours apprécié tes venu et nos discussions. Tu t'es toujours montré réactif et à l'écoute, travailler avec toi a été un réel plaisir.

Au Dr Hélène D Moreau, j'adresse aussi mes sincères remerciements. Tu t'es montrée disponible et m'a lancé sur l'analyse d'image. Je suis vraiment heureux de cette collaboration. Je tiens aussi à remercier le Dr Mathieu Morin. Les Skype d'analyse d'image m'ont réellement aidé. Merci pour ta gentillesse ! J'espère que tu as réussi à te racheter une souris.

Je remercie aussi sincèrement Agnieszka Jaracz-ros pour sa présence et son attention continue pour mon projet de recherche. Merci d'avoir pris le temps de m'aider pour les expériences sur les canaux ORAI.

Françoise mercier j'adresse mes sincères remerciements. Merci de m'avoir orienté pour les expériences de microscopie optique et confocale. Désolé de t'avoir fait perdre des points de vision avec les comptes de neutrophiles.

Je remercie aussi Marie laure Aknin et Sophie Viel pour leur gentillesse et l'aide soutenue qu'elles m'ont apporté. Je remercie aussi Hélène Gary pour son aide précieuse dans le couplage des anticorps de cryométrie de masse. J'en profite aussi pour remercier Quentin Jouot pour sa participation aux expériences sur l'Hélios

Morgan, Merci pour ton aide, ta disponibilité, mais surtout merci pour tes cakes. Merci à Sarah et Baptiste pour l'animalerie mais aussi pour votre amitié. Merci aussi à khadidiatou pour son aide pour les géotypages. Merci Nadine pour l'organisation des journées de l'unité et ta disponibilité pour m'aider à chaque commande qui rate. Merci aussi pour la rapidité de réservation des billets d'avion pour Lisbonne.

To my office colleague, Joyce, Thank you for all those discussions, for your support and your humour. By all means, it was good times.

Merci aux étudiantes de M2 qui sont passées dans l'équipe et m'ont permis de faire avancer le projet, Layla et Molène. Layla, Merci d'avoir été là pour moi et de l'être toujours. Tu as de grandes qualités humaines et tu es vraiment une belle personne. Je suis toujours étonné par ton énergie, qu'est-ce que tu manges ? Molène je te souhaite de réussir au mieux dans la suite de ce projet avec Géraldine. Je suis content que tu reprennes le flambeau.

A tout ceux que je ne cite pas, Carmen, Myriam, Nicolas, Marta, Camille, Tom, Amine, Julie, Nagham, Vincent ... Merci pour tout ! Je garde par ailleurs une pensée émue pour Michèle. Les meilleurs nous quittent toujours trop tôt. Merci aussi à tous ceux qui m'ont accompagné durant ces années de thèse. Merci à Arnaud, Sandrine, Coline, Manu, Julien, Ségolène et Claire (Merci pour l'appartement !), le collectif SSSC, et j'en oublie beaucoup. J'espère que vous serez fières de moi comme je lui suis de votre amitié.

Enfin je tiens à réaffirmer tout mon amour pour ma famille qui sont prêts à tout pour moi. Merci pour m'avoir soutenu, c'est grâce à vous que j'en suis là.

Table des matières

❖	Liste des abréviations.....	8
❖	Liste des Figures.....	10
❖	Préambule.....	11
I.	INTRODUCTION.....	13
1.	Les cellules dendritiques	13
1.1.	Difficultés inhérentes à l'étude des DC	13
1.2.	Rôle des DC dans le système immunitaire	14
1.3.	Diversité ontogénique des DC.....	15
1.3.1.	Sous-populations de cDC et marqueurs moléculaires	19
1.3.1.1.	cDC1.....	20
1.3.1.1.1.	cDC1 de la peau.....	20
1.3.1.1.2.	Ontogénie.....	20
1.3.1.1.3.	Fonctions privilégiées.....	22
1.3.1.2.	cDC2.....	22
1.3.1.2.1.	cDC2 de la peau.....	23
1.3.1.2.2.	Ontogénie.....	23
1.3.1.2.3.	Fonctions privilégiées.....	25
1.3.1.3.	pDC	27
1.3.1.3.1.	Ontogénie et sous-populations.....	27
1.3.1.3.2.	Fonctions privilégiées.....	29
1.3.2.	Les autres CPA d'origine myéloïde.....	31
1.3.2.1.	Les cellules de Langerhans (LC).....	31
1.3.2.1.1.	LC de la peau.....	31
1.3.2.1.2.	Ontogénie.....	31
1.3.2.1.3.	Fonctions privilégiées.....	32
1.3.2.2.	Les DC dérivés de monocytes.....	32
1.3.2.2.1.	MoDC de la peau.....	32
1.3.2.2.2.	Ontogénie.....	33
1.3.2.2.3.	Fonctions privilégiées.....	33
1.3.2.3.	Cellules dendritiques de culture.....	33
1.3.2.3.1.	DC de culture différenciées avec du GM-CSF.....	33
1.3.2.3.2.	DC de culture différenciées avec du GM-CSF et du FLT3-L.....	34
2.	Migration des DC.....	36
2.1.	Organisation générale de la migration des pré-DC et DC	38
2.1.1.	Cellules mésenchymateuses et amoéboïdes.....	39
2.1.2.	Les régimes de migration des DC en fonction de leur état d'activation	40
2.1.2.1.	Patrouille et macropinocytose, une prérogative des DC immatures.....	40
2.1.2.2.	Migration rapide orientée, le régime de migration des DC activées.....	41
2.2.	L'orientation de la migration des DC	42
2.2.1.	Chimiokines et Récepteurs aux chimiokines	42
2.2.2.	Modulation de l'expression et de la signalisation des ChR.....	43
2.2.3.	Les récepteurs de chimiokine atypiques : création des gradients	44
2.2.4.	Régulation des chimiokines.....	45

2.3. Rôle et régulation de la polymérisation d'actine.....	50
2.3.1.1. Arp2/3 : branchements	51
2.3.1.2. Formines	51
2.3.1.3. Myosine II A : moteur moléculaire	52
2.3.1.4. Modulation de la localisation de la myosine II A	53
3. Importance du calcium pour la migration des DC et mécanismes associés. 55	
3.1. Signalisation via les ChR.....	55
3.1.1. L'exemple de CCR7	57
3.1.2. Intégration du signal chimiokinique, lien avec le Ca ²⁺	58
3.2. Régulation de l'influx calcique.....	60
3.3. Reticulum endoplasmique et Store Operated Calcium Entry (SOCE).....	62
3.3.1. IP3R.....	62
3.3.2. ORAI.....	64
3.3.3. STIM.....	65
3.4. Autres médiateurs des flux calciques et effets de leur modulation sur la migration des DC.....	70
4. La protéine GILZ.	72
4.1. GILZ et sa modulation	72
4.1.1. Gène et expression tissulaire.....	72
4.1.2. Modulation de l'expression de GILZ.....	73
4.2. Rôle de GILZ dans les DC.....	75
4.2.1. Phénotype et sécrétion cytokinique	75
4.2.2. Capture antigénique et présentation	76
4.2.3. Activation des lymphocytes T.....	77
4.2.4. Mécanismes	79
4.3. Rôle de GILZ sur la régulation des flux ioniques	80
5. Objectifs de la thèse.....	84
II. RESULTATS.....	86
III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	167
IV. REFERENCES.....	180
V. ANNEXE.....	208
VI. RESUMES.....	233

❖ Liste des abréviations

A

AKT: protéine kinase B
AMPC: adénosine monophosphate cyclique
Ampk: AMP-activated protein kinase
AP-1: activator protein 1
Arp2/3: actin-Related Proteins
AXL: tyrosine-protein kinase receptor

B

Batf3: basic Leucine zipper ATF-Like transcription factor 3
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BCR: récepteur des cellules B

C

c-myc: cellular Myc
C/EBP: CCAAT-enhancer-binding proteins
cADPR: ADP-ribose cyclique
CCL"x": chemokine C-C motif ligand "x"
CCR"x": C-C chemokine receptor type "x"
CD: cluster de différenciation
CD103: intégrine alpha E beta 7 (ITGAE)
CD11b: intégrine alpha M (ITGAM)
CD172: voir Sirpa
CD207: langerine
cDC: cellules dendritiques conventionnelles
cDC1: cDC de type 1
cDC2: cDC de type 2
CDC42: cell division control protein 42 homolog
CLEC9A: c-type lectin domain family 9 member A
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CPA: cellule présentatrice d'antigène
CRAC: calcium-release activated channels
CX3CR1: CX3C chemokine receptor 1
CXCR"x": C-X-C chemokine receptor type "x"

D

DAG: diacylglycerol
DC: cellules dendritiques
Dex: dexaméthasone

E

EAE: expérimental autoimmune encephalomyelitis
ELC: essential light chain
ENaC: epithelial sodium channel
ERK: extracellular signal-regulated kinases

F

FHRE: forkhead responsive elements
FLT3-L: fms-like tyrosine kinase 3 ligand
FoxO3: forkhead box O3
FoxP3: forkhead box P3

G

GABA: gamma-Aminobutyric acid
GATA: GATA-binding factor
GEF: guanine nucleotide exchange factors
GILZ: glucocorticoid induced leucine zipper
GL: ganglions lymphatiques
GM-CSF: granulocyte macrophages stimulating factor
GM-CSFR: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor
GPCR: récepteurs couplés aux protéines G
GRE: glucocorticoid response element

H

HGF: hepatocyte growth factor

I

ICOS-L: ICOS ligand
ID2: DNA-binding protein inhibitor 2
Ii: HLA class II histocompatibility antigen gamma chain
ILT-3: leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4
IFN"x": interféron "x"
IP3: inositol trisphosphate
IP3R: IP3-récepteur
IRF"x": interféron regulatory factor "x"

J

JNK: c-Jun N-terminal kinases

K

L

Lin: lineage markers
LRRK2: leucine-rich repeat kinase 2
LT: lymphocytes T
LTBR: lymphotoxin beta receptor
LZ: leucine zipper

M

MAPK: mitogen-activated protein kinase
Mcsfr: macrophage colony-stimulating factor receptor
MCU: mitochondrial calcium uniporter
mDia1: drosophila gene diaphanous 1
MEC: matrice extracellulaire
MerTK: proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER
MLC: myosin light chain
MLCK: myosin light chain kinase
MoDC: DC dérivant de monocytes
mTORC2: mTOR Complex 2
MyD88: myeloid differentiation primary response 88

N

NCX: Na⁺/Ca⁺ exangers
Nedd4-L: neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like
NFAT: nuclear factor of activated T-cells
NFkB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NM IIA: non-muscle Myosin II A

O

Oct-1: POU domain, class 2, transcription factor 1
ORAI: calcium release-activated calcium channel proteins
OL: organes lymphoïdes

P

P2x7: P2X purinoceptor 7
p38: p38 mitogen-activated protein kinases
PD-L1: programmed death-ligand 1
pDC: DC plasmacytoïdes
PI3K: phosphoinositide 3-kinases
PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC: protein kinase C
PLCB: phospholipase C β
pré-cDC: précurseurs de cDC
PU.1: transcription factor PU.1

Q

R

Raf-1: RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
Rho: Ras homolog family member
ROCK: Rho-associated protein kinase
Runx3: Runt-related transcription factor 3
RyR: récepteurs à la ryanodine

S

SERCA: sarcoendoplasmatic Ca²⁺-ATPase
SGK1: serum glucocorticoid-regulated kinase 1
Sirp1a: signal regulatory protein alpha
SLC39a8: solute carrier family 39 member 8 (ZIP8)
SOCE: store operated calcium entry
SRE: splicing regulatory element
STAT: signal transducer and activator of transcription
STIM: stromal interaction molecules
STIMATE: STIM-Activating enhancer
STING: stimulator of interferon genes

T

TCF4: transcription factor 4
TGF-β: transforming growth factor beta
TLR"x": toll Like Recepteur "x"
TNF-α: tumor necrosis factor
Treg: lymphocytes T régulateurs
TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TRPM: transient receptor potential cation channel subfamily M
Tsc22d3: TSC22 domain family protein 3

U

UNC93B1: unc-93 homolog B1

V

VDAC: voltage-dependent anion channels

W

WASP: wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE: WASP-family verprolin-homologous protein
WNK1: lysine deficient protein kinase 1

X

XCR1: X-C motif Chemokine Receptor 1

Y

Z

❖ Liste des Figures

- Figure 1 :** Ontogénie myéloïde des monocytes, cDC et pDC chez l'Homme. (Page 15)
- Figure 2 :** schéma récapitulatif des sous populations de DC, LC, MoDC *in vivo*. (Page 18)
- Figure 3 :** Fonction simplifiées des cDC1 et 2 sur la polarisation des LT. (Page 27)
- Figure 4 :** Fonctions associées aux pDC. (Page 29)
- Figure 5 :** Sous population de DC issues de culture. (Page 35)
- Figure 6 :** La migration est un processus présent à toutes les étapes de la vie des DC. (Page 36)
- Figure 7 :** la nature des signaux d'activation et de leur PRR définit la réponse immunitaire induite par les DC. (Page 38)
- Figure 8 :** Chimiokines et chimiorécepteurs et leurs rôles dans la migration des cellules dendritiques. (Page 45)
- Figure 9 :** les différents ligands de CCR7 et leurs effets sur la signalisation. (Page 47)
- Figure 10 :** Régulations des chimiokines et chimiorécepteurs. (Page 48)
- Figure 11 :** Les régimes de migration des DC immatures et matures. (Page 49)
- Figure 12 :** Compétition pour l'actine monomérique via les petites protéines G. (Page 54)
- Figure 13 :** Intégration du signal des GPCR via les différentes protéines G associées. (Page 56)
- Figure 14 :** Intégration du signal chimiokinique et lien avec le calcium dans les DC en réponse à CCL21. (Page 59)
- Figure 15 :** Canaux calciques ayant une importance pour la migration des DC. (Page 61)
- Figure 16 :** Structure simplifiée des IP3R à la surface du RE. (Page 63)
- Figure 17 :** Schéma illustrant l'entrée de calcium induite par le SOCE. (Page 69)
- Figure 18 :** schéma représentant la structure protéique conservée entre les différents isoformes de GILZ. (Page 73)
- Figure 19 :** Fonctions de GILZ dans les DC. (Page 80)
- Figure 20 :** Schéma des actions connues de GILZ sur la régulation des canaux ENaC dans le rein. (Page 82)
- Figure 21 :** schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'article 1. (Page 88)
- Figure 22 :** schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'article 2. (Page 136)
- Tableau 1 :** Effets de la modulation des ORAI, des STIM et de leurs facteurs associés sur les fonctions des DC. (Page 70)

❖ Préambule

J'ai souhaité rédiger un préambule pour faciliter la lecture de ce manuscrit en établissant ici les liens logiques m'ayant amené à construire l'introduction comme vous la trouverez. Dans mes études, j'ai utilisé deux modèles murins développés par mon laboratoire. Premièrement un modèle murin de gain de fonction du récepteur CXCR4, modèle d'étude du syndrome WHIM. Ce modèle m'a servi à étudier le rôle de CXCR4 et de sa désensibilisation dans la biologie des cellules dendritiques (DC), notamment dans la migration des DC de la peau *in vivo*. Deuxièmement, un modèle murin de délétion conditionnelle de la protéine Glucocorticoid induced leucine zipper (GILZ) dans les DC (CD11c-GILZ^{ko}). Ce modèle m'a servi à étudier le rôle de l'expression endogène de la protéine GILZ dans les DC sur leur biologie et plus particulièrement sur leur fonction de polarisation des réponses T et leur migration. Mon travail de thèse s'est appuyé sur deux axes majeurs. Premièrement J'ai étudié les mécanismes régulant la migration des DC. Cet axe étant le plus aboutit dans mes travaux, c'est lui qui sera exclusivement présenté dans l'introduction. Deuxièmement, J'ai étudié la régulation des réponses lymphocytaires T dans les contextes pathologiques en lien avec la délétion de GILZ dans les DC. Pour aborder les différents sujets et concepts couverts par les publications que vous trouverez dans la partie résultat, j'ai divisé l'introduction en trois grandes parties. Premièrement, nous nous intéresserons à l'ontogénie et à la diversité des sous-populations de DC. Cette partie positionne notamment la dépendance des progéniteurs des DC à la fonction du récepteur CXCR4 pour émigrer de la moelle osseuse au sang. Je m'attacherai aussi à définir l'importance des facteurs de transcription essentiels à la différenciation des DC dans la régulation de leur migration depuis les tissus. Je n'aborderai à ce titre que les différentes sous-population de DC de la peau et des ganglions lymphatiques la drainant, mon travail *in vivo* s'étant focalisé sur ces populations. Dans une deuxième partie nous nous focaliserons sur les mécanismes régulant la migration des DC et porterons une attention particulière à définir l'importance des récepteurs aux chimiokines dans le processus de chimiotaxie

(en particulier CXCR4 et CCR7) ainsi que de la mobilisation du cytosquelette d'actine dans la motricité. Cette partie s'articule naturellement avec la description de la signalisation calcique issus des chimiorécepteurs et son importance dans la migration des DC. Finalement, vous trouverez la partie descriptive concernant l'expression et la fonction de la protéine GILZ dans les DC.

I. INTRODUCTION

1. Les cellules dendritiques

Les DC font partie des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles. Ces cellules se différencient à partir de précurseurs hématopoïétiques (Amon *et al.*, 2020; Nutt and Chopin, 2020). Elles sont classifiées selon leur ontogénie mais aussi selon leur distribution tissulaire. En effet, certaines DC se différencient et résident dans les organes lymphoïdes quand d'autres se différencient et résident dans les tissus périphériques. Les DC des tissus périphériques sont capables de migrer aux organes lymphoïdes et sont alors considérées comme des DC « migrantes » à l'inverse des DC des organes lymphoïdes dites « résidentes » (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017; Eisenbarth, 2018). Les DC sont capables d'induire les réponses lymphocytaires T CD4 (LT CD4) via la présentation des antigènes (AG) par les molécules du CMH de classe II (CMHII) et LT CD8 via la présentation directe ou croisée des AG par les molécules du CMHI. La polarisation des LT CD4 peut aboutir à une induction de réponses effectrices ou tolérogènes (e.g LT régulateurs, LTreg) selon la différenciation fonctionnelle des DC (Macri *et al.*, 2018). Parmi les CPA (Lymphocytes B, macrophages et cellules dérivées de monocytes), les DC sont les plus efficaces pour activer les LT naïfs.

1.1. Difficultés inhérentes à l'étude des DC

« DC » est une appellation qui regroupe un ensemble hétérogène de cellules partageant des fonctions similaires. Leur étude implique de prendre en compte plusieurs aspects techniques relatif à leur biologie. Premièrement, l'ontogénie des DC est complexe et d'un précurseur unique peuvent dériver des sous-populations phénotypiquement différentes (Amon *et al.*, 2020). De plus, les DC sont sensibles aux modifications de leur environnement, cela rend délicat la mise en place d'une extraction préservant leur phénotype tissulaire. Pour finir, les DC sont présentes en petit nombre, ce qui minimise les rendements d'extraction. De ce fait, la mise en place

de tests fonctionnels utilisant des DC triées depuis les organes s'avère souvent coûteuse et demande une quantité importante de matériel biologique. Les chercheurs pionniers dans la découverte des fonctions des DC se sont donc rapidement attelés à essayer de les différencier *in vitro* à partir de précurseurs hématopoïétiques. Ces cultures ne permettent pas de représenter la diversité des DC retrouvés *in vivo*, mais sont capables de produire un nombre important de cellules, facilitant les études fonctionnelles. Nous pourrions ici citer l'exemple de Kayo Inaba, chercheuse ayant travaillé dans le laboratoire de Ralf Steinmann, prix Nobel de médecine pour la découverte des DC. Les travaux de K. Inaba furent fondateurs sur la compréhension de la fonction des DC (Inaba *et al.*, 1983) et elle mit aussi en place la première méthode de culture cellulaire de DC dérivées de moelle osseuse de souris (BMDC) (Inaba *et al.*, 1992). Cela nous amène à la dernière difficulté concernant l'étude des DC. Les BMDC sont, comme nous le verrons par la suite, une culture cellulaire contaminée par la présence de macrophages. Le développement des cultures de DC *in vitro* est toujours très actif et permet aujourd'hui de décrire l'ontogénie fine des DC (Balan *et al.*, 2018; Luo and Dalod, 2020). En outre, de nombreuses études ont permis de démontrer l'existence et la fonction des différentes sous-populations de DC, que les techniques de masse (e.g. Cytométrie de masse, single cell transcriptomic) permettent aujourd'hui d'affiner. Finalement, un consensus semble se créer autour de l'appellation des sous-populations de DC en prenant comme critères de classification les signatures moléculaires révélatrices de leurs phénotype et ontogénie (Arendt, 2008; Achim and Arendt, 2014; Williams *et al.*, 2014; Arendt *et al.*, 2016; Marioni and Arendt, 2017). Nous nous baserons sur ces derniers travaux pour classer les DC dans ce manuscrit.

1.2. Rôle des DC dans le système immunitaire

Fonctionnellement, les DC possèdent d'importantes capacités de capture des antigènes. Toutes ont démontré une capacité à apprêter les antigènes sur le CMH de type I et II. Elles sont aussi capables de mettre en place un processus dit de maturation,

conduisant à une modulation fonctionnelle leur permettant 1- d'exprimer des récepteurs facilitant leur migration (à l'intérieur des tissus et/ou aux tissus lymphoïdes) 2- d'exprimer des molécules de co-stimulation et des cytokines favorisant l'activation des LT et 3- de présenter des antigènes et d'activer les LT CD4 et CD8 naïfs (Macri *et al.*, 2018; Reizis, 2019; Ye *et al.*, 2020). Nous le verrons par la suite, même si ces fonctions sont partagées, elles sont tout de même régulées de manière différente selon les sous-populations de DC.

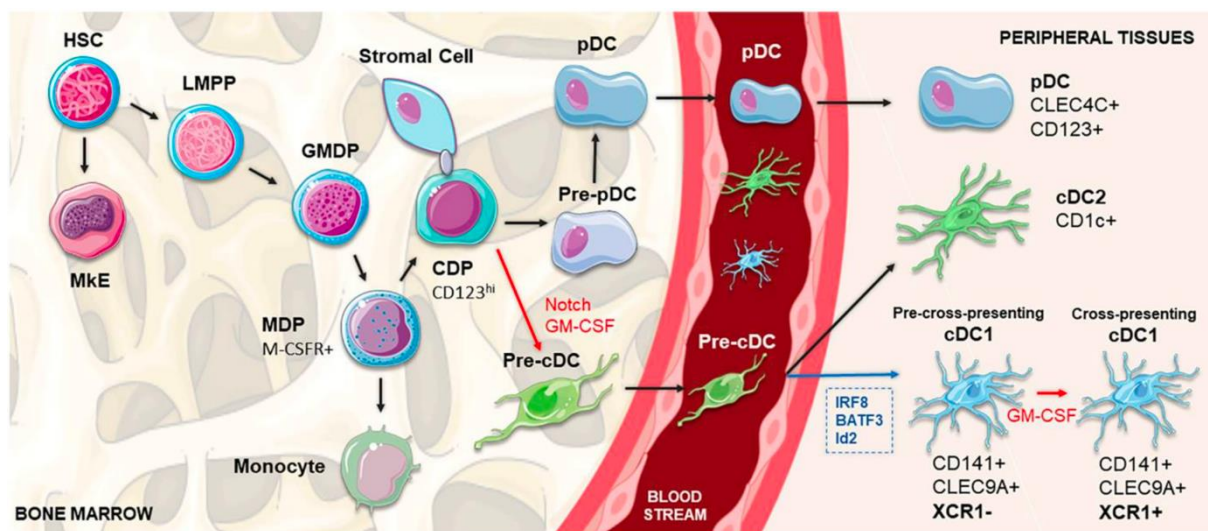


Figure 1 : Ontogénie myéloïde des monocytes, DC conventionnelles (cDC) et plasmacytoïdes (pDC) chez l'Homme. Les DC peuvent se différencier à partir d'un progéniteur (Pr) commun aux granulocytes, monocytes, et DC (GMDP). Ce Pr générerait un Pr des monocytes et DC (MDP) qui donnerait naissance au Pr des monocytes et au Pr commun aux DC (CDP). Les cellules stromales de la moelle sécrètent le FLT3-L, essentiel à la différenciation des cDC et pDC. Du CDP se différencie les pre-cDC, dépendant de NOTCH et du GM-CSF, qui circulent via le sang et infiltrent les tissus. Le devenir des cDC1/cDC2 est imprimé dans le programme génétique de ces Pr. Dans les tissus, de manière dépendante de facteurs locaux, les pre-cDC1/2 différencieront des cDC1 et 2 résidentes des organes lymphoïdes (OL) ou des tissus périphériques. Les cDC1 possèdent un progéniteur intermédiaire n'exprimant pas XCR1, marqueur des cDC1 différenciées de manière terminale. Les pDC sortent de la moelle différenciées de manière terminale. Figure issue de (Calmeiro *et al.*, 2020).

1.3. Diversité ontogénique des DC.

Les sous-populations de DC peuvent toutes dériver d'un précurseur commun aux monocytes-DC (MDP) (Figure 1). Ce précurseur perdrait graduellement ses capacités de multipotance en différenciant un précurseur des monocytes (cMoP) et des DC (CDP)

(Lee *et al.*, 2015). Les CDP peuvent se différencier en DC conventionnelles (cDC) et en DC plasmacytoïdes (pDC) (Onai *et al.*, 2013). L'ontogénie des pDC est encore discutée, mais il est clair qu'elles peuvent aussi se différencier à partir de précurseurs lymphoïdes (common lymphoid progenitor, CLP) (Sathe *et al.*, 2013; Shortman *et al.*, 2013; Dekker *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Dress *et al.*, 2019). Les cDC sont elles-mêmes subdivisées en deux sous-groupes ayant leurs précurseurs respectifs, les cDC de type 1 (cDC1) et les cDC de type 2 (cDC2) (Figure 1) (Guilliams *et al.*, 2014; Schlitzer *et al.*, 2015) selon l'appellation de Guilliams *et al.* La différenciation des cDC1/2 est indépendante de facteurs tissulaires et est déterminée au niveau du progéniteur (Schlitzer *et al.*, 2015). De récentes études proposent que le précurseur des cDC ainsi que ceux des cDC1 et cDC2 circulent en permanence depuis la moelle jusqu'aux tissus (See *et al.*, 2017). Il faut à cela rajouter une subtilité. Comme nous le verrons par la suite, Les cDC2 forment une population hétérogène dont l'ontogénie fine est encore débattue (Dutertre *et al.*, 2019). Finalement, c'est dans les tissus que les précurseurs de cDC différencient les cDC de manière terminale (e.g résidentes des organes lymphoïdes (OL) ou des tissu périphériques) et dépendante de facteurs locaux (e.g Granulocyte Macrophages Stimulating Factor, GM-CSF). La différenciation des cDC et pDC depuis les progéniteurs hématopoïétiques est dépendante du Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3-L). Par ailleurs, la délétion constitutive des DC donne lieu à des syndromes myéloprolifératifs dont l'origine supposée est une trop grande disponibilité de FLT3-L. Ainsi, de par leur dépendance à ce facteur, les DC favoriseraient le maintien de l'homéostasie des sous-populations myéloïdes (Birnberg *et al.*, 2008; Ohnmacht *et al.*, 2009; Humblet-Baron *et al.*, 2019). Enfin, d'autres DC se différencient à partir du MDP. Le MDP donne naissance aux cMoP et finalement aux monocytes. Les DC dérivant de monocytes (MoDC) sont retrouvées dans de nombreux tissus à l'homéostasie, mais s'accumulent particulièrement au cours de l'inflammation. En outre, au cours de l'inflammation, les monocytes sont aussi capables de se différencier en cellules de Langerhans, dont nous reparlerons par la suite. Il est à noter que l'ontogénie des DC

est dépendante de l'expression de facteurs de transcription (FT) (Bosteels and Scott, 2020). Ces FT sont soit transitoirement exprimés dans les progéniteurs, soit exprimés dans les progéniteurs et tout au long de la vie de la cellule (FT « terminal selector ») (Holmberg and Perlmann, 2012).

Dans une première partie nous nous attacherons à la description des cDC, puis une partie sera consacré aux pDC. Ensuite, nous décrirons les cellules qui exercent des fonctions de DC mais sont ontogénétiquement distinctes des cDC et pDC, à savoir les cellules de Langerhans (LC) et les MoDC. Nous nous focaliserons principalement sur les DC de la peau, cellules sur lesquelles s'est concentré la majeure partie de nos travaux *in vivo*. Pour finir, nous traiterons des DC de culture. Pour la description des DC, nous nous attacheront à définir leur ontogénie et leur dépendance aux facteurs de transcription (Bosteels and Scott, 2020), leurs marqueurs moléculaires (Guilliams *et al.*, 2016) ainsi que leurs fonctions.

Sous populations de DC, LC et MoDC *in vivo*

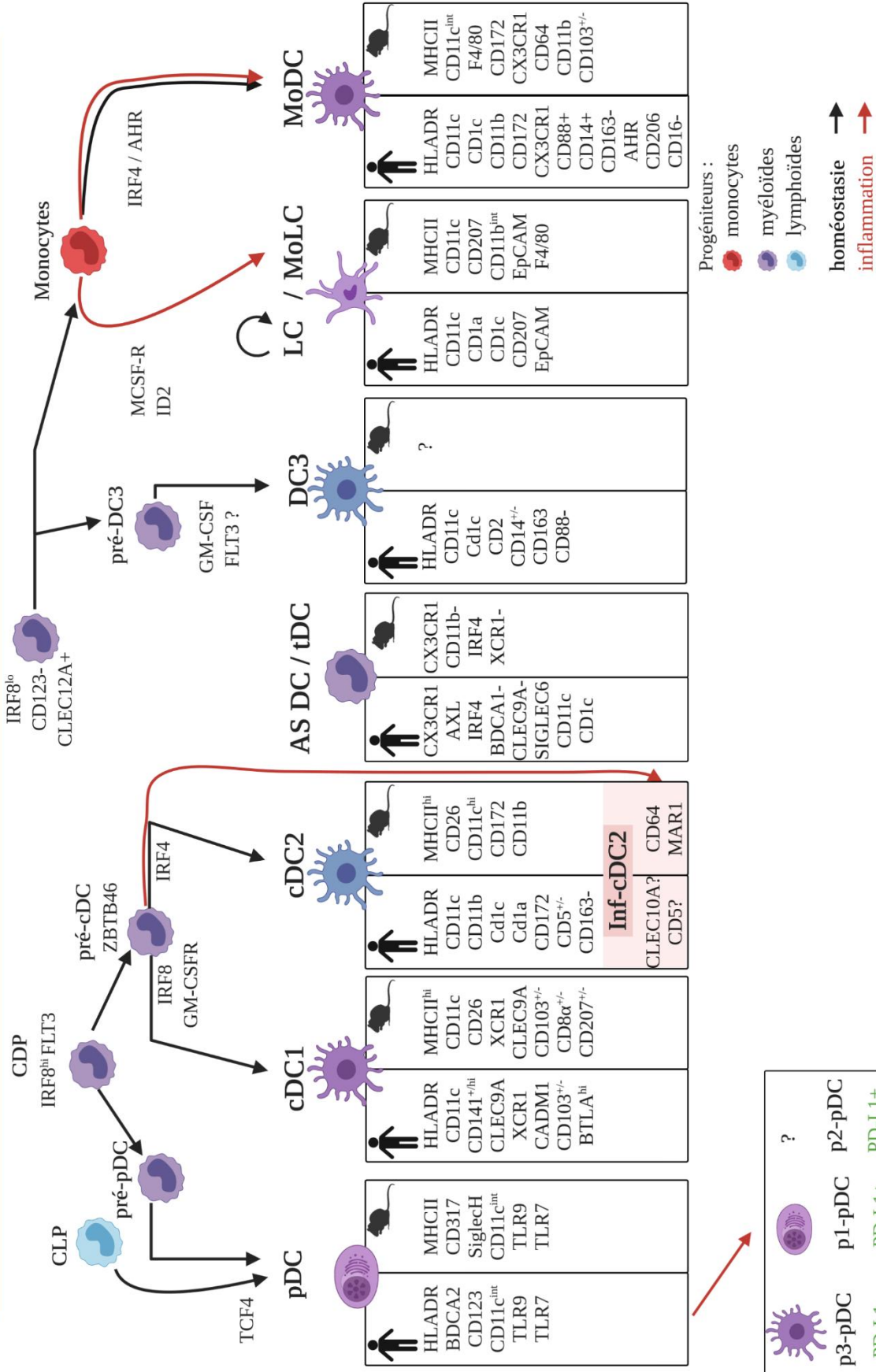


Figure 2 : Schéma récapitulatif des sous-populations de DC, LC et MoDC *in vivo*. En bas, sont représentés les monocytes (rouge), les progéniteurs d'origine myéloïde (Violet) et lymphoïde (bleu clair) capables de se différencier en sous-populations de cellule présentatrice d'antigène (CPA), représentées par les cellules à cheval sur les rectangles noirs. Des flèches présentent la filiation entre progéniteurs et CPA ainsi que les facteurs moléculaires essentiels à leur différenciation. Les progéniteurs sont nommés CDP : Précurseur commun aux DC. Pré-cDC : Précurseur commun aux cDC. Pré-pDC : Précurseur des pDC. CLP : Précurseur lymphoïde IL7R⁺ proposé pour les pDC. Sous les cellules différenciées figurent deux rectangles comprenant les marqueurs de référence pour définir ces populations chez l'Homme (gauche) et la souris (droite). Les marqueurs écrits en vert sont ceux proposés pour définir les nouvelles sous-populations de pDC. Les flèches rouges représentent les cellules différenciées en contexte inflammatoire. Adapté de (Binnewies *et al.*, 2019; Duterte *et al.*, 2019; Amon *et al.*, 2020; Bosteels and Scott, 2020).

1.3.1. Sous-populations de cDC et marqueurs moléculaires.

La différenciation des cDC (CD11c⁺ CMHII⁺) pourrait s'effectuer à partir des progéniteurs myéloïdes (pré-cDC), cependant plusieurs études rapportent que l'engagement de la différenciation dans le lignage des DC s'effectuerait plus tôt, avant la scission entre les lignages lymphoïdes et myéloïdes (Naik *et al.*, 2013; Shortman *et al.*, 2013; Perié and Naik, 2015; Helft *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017). Cette différenciation dans le lignage des DC est caractérisée par, mais indépendante de, l'expression du FT ZBTB46 (Satpathy *et al.*, 2012), et est déjà orientée vers les cDC1 / cDC2 à la sortie de la moelle osseuse (Schlitzer *et al.*, 2015; Heidkamp *et al.*, 2016). Chez l'Homme, ces pré-cDC (Lin⁻CD34⁻CD117⁺CD135⁺CD116⁺CD115⁻) (Breton *et al.*, 2015) sont retrouvées dans la moelle, la circulation sanguine et les tissus. La circulation des pré-cDC et des pré-cDC1/2 depuis la moelle est ainsi capable de renouveler les stocks « locaux » de précurseurs et d'assurer l'homéostasie des cDC dans les tissus (Breton *et al.*, 2015; See *et al.*, 2017). Chez l'Homme, les pré-cDC ont un potentiel de différenciation limité à la production des cDC2 (CD1c⁺ Figure 2) et des cDC1 (CD141⁺ CLEC9A⁺ Figure 2) (Breton *et al.*, 2015). Chez la souris on retrouve des cDC2 (CD172a⁺) et des cDC1 (XCR1⁺) (Guilliams *et al.*, 2014) dont les précurseurs expriment aussi le CD135, récepteur au FLT3-L (Waskow *et al.*, 2008).

Fonctionnellement, les cDC présentes au niveau du parenchyme des tissus périphériques sont capables de migrer aux ganglions drainants selon un mode de migration dépendant notamment de leur maturation et de l'expression du C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) (Ohl *et al.*, 2004). Ce phénomène est observé chez l'Homme et chez la souris.

1.3.1.1. *cDC1*

1.3.1.1.1. *cDC1 de la peau*

Les cDC1 sont une sous-population dont l'ontogénie, le phénotype et les fonctions sont bien décrites. Les cDC1, dans leur ensemble, sont reconnaissables par l'expression du X-C Motif Chemokine Receptor 1 (XCR1) (Crozat *et al.*, 2010, 2011; Guilliams *et al.*, 2016). Dans le parenchyme des tissus périphériques, elles expriment, chez l'Homme et la souris, l'intégrine alpha E beta 7 (ITGAE aussi appelée CD103). Dans les OL, les cDC1 résidentes expriment CD8a chez la souris, et les cDC1 migrantes expriment des niveaux de CMHII (CMHII^{hi} Figure 2) plus importants que les cDC1 résidentes. Les cDC1 représentent une population de cellules stable et relativement homogène entre les individus (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). Dans la peau, elles expriment, en plus de CD103, la langerine (CD207 chez la souris) (Figure 2). Des cellules homologues ont été trouvées chez l'Humain et expriment constitutivement CD141 (Figure 2) (Haniffa *et al.*, 2012; Malissen, Tamoutounour and Henri, 2014). Finalement, les cDC1 de la peau humaine expriment significativement plus de CD1a, CD83, CMHII et BDCA1 que les cDC1 du sang, des amygdales et de la rate. En revanche, elles expriment moins de CD135, CLEC9A et très faiblement CD11c en comparaison de leur homologue du sang et de la rate (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017).

1.3.1.1.2. *Ontogénie*

La différenciation des cDC1 est dépendante de l'expression constante dans les pré-cDC de l'Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) (Aliberti *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2005;

Grajales-Reyes *et al.*, 2015; Sichien *et al.*, 2016; Bagadia *et al.*, 2019; Durai *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020) depuis le stade MDP jusqu'aux cDC1 différenciés. Cette expression est déterminante dans l'exclusion de la différenciation des granulocytes au niveau du MDP (Kurotaki *et al.*, 2014). IRF8 est un FT contrôlant, entre autres, la transcription de l'interleukine 12 (IL12). Son inactivation par mutation génétique provoque chez la souris une sensibilité accrue à l'infection par *Mycobacterium bovis*, une moindre production d'IL12 et des syndromes myéloprolifératifs (Turcotte *et al.*, 2005). Finalement, la délétion de ce FT inhibe la différenciation des cDC1 spécifiquement. Il est à noter que ce facteur est un FT « terminal selector » pour les cDC1 (Sichien *et al.*, 2016). Dans les cDC1 différenciés, la transcription d'IRF8 est maintenue par l'expression du Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3 (Batf3), FT dont les cDC1 sont aussi dépendantes (Hildner *et al.*, 2008; Grajales-Reyes *et al.*, 2015). Cependant, l'absence de Batf3 n'inhibe pas la différenciation des pré-cDC1, mais favorise la différenciation des cDC2 (Durai *et al.*, 2019). Batf3 s'exprime progressivement au cours du développement des cDC1 depuis le CDP déjà engagé dans ce lignage via l'expression de Nfil3. Nfil3 favorise l'expression de Id2 au détriment de Zeb2, excluant la différenciation des pDC (Bagadia *et al.*, 2019). Finalement, la signalisation via NOTCH semble essentielle à la différenciation des cDC1 à partir du CDP, et des travaux récents ont démontrés *in vitro* l'existence d'un précurseur intermédiaire entre les pre-cDC1 et les cDC1 différenciées. Ce précurseur n'exprime pas XCR1, mais exprime des niveaux de CXCR4 plus importants que les cDC1 différenciées (Balan *et al.*, 2018). Cependant, la différenciation des sous-populations de cDC1 (e.g CD8⁺ / CD103⁺ chez la souris) dépend, quant à elle, de l'expression tissulaire du GM-CSF. La fixation à son récepteur, le GM-CSFR, semble déterminer le devenir des progéniteurs de cDC1 vers un phénotype CD8a⁻ CD103⁺, du moins dans la peau (King, Kroenke and Segal, 2010) et la lamina propria (Greter *et al.*, 2012).

1.3.1.1.3. Fonctions privilégiées

Les cDC1 sont connues pour produire des interférons de type III et de l'IL12 en réponse à leur activation, ce dernier polarisant les réponses TCD4-helper de type 1 (Th1) (Martínez-López *et al.*, 2015) (Figure 3). Ces cellules sont aussi capables d'induire les réponses Treg (Arnold *et al.*, 2019; Hilligan and Ronchese, 2020) (Figure 3). Elles expriment en outre le Toll-like récepteur 3 (TLR3), capable de lier l'ARN double brin. L'association de l'expression du TLR3 avec celle du récepteur CLEC9A, dont la fonction est de détecter les corps nécrotiques, place les cDC1 au centre dans les processus de réponse antivirale (détection des ARN viraux) et anti-tumorale (détection des corps nécrotiques) où elles participent à l'activation des réponses LT CD8 (Sancho *et al.*, 2009; Broz *et al.*, 2014; Cancel *et al.*, 2019). Les cDC1 sont plus efficaces pour réaliser la présentation croisée d'AG associés aux cellules que les cDC2 (Bachem *et al.*, 2010; Crozat *et al.*, 2010; Jongbloed *et al.*, 2010), notamment provenant de la peau (Bedoui *et al.*, 2009; Henri *et al.*, 2010; Haniffa *et al.*, 2012). Plus précisément, les cDC1 sont considérées comme réalisant cette présentation croisée de manière constitutive (Figure 3). Ces cDC réaliseraient la présentation croisée des AG aux LT CD8 via la voie cytosolique, comme le démontre leur indépendance à IRAP (Segura *et al.*, 2009). Les cDC2 (Den Haan and Bevan, 2002; Heath *et al.*, 2004), les pDC (Mouriès *et al.*, 2008), et les MoDC (Tsing-Lee *et al.*, 2019) ont aussi des capacités de présentation croisée dépendantes de leur maturation, mais aussi possiblement constitutives (Segura, Durand and Amigorena, 2013). Au cours de cancers, les cDC1 sont particulièrement capable de transporter présenter des antigènes intacts aux OL avant de les préparer et de les présenter aux LT CD8 (Salmon *et al.*, 2016). Dans cette étude, l'induction de prolifération (FLT3-L) et l'activation des cDC1 (Poly I:C fixant le TLR3) augmente la qualité de la réponse immunitaire aux traitements inhibiteurs de BRAF et aux anti PD1.

1.3.1.2. cDC2

1.3.1.2.1. *cDC2 de la peau*

Une caractéristique commune des cDC2 chez la souris est qu'elles expriment toutes le marqueur CD11b. Chez l'Homme elles expriment CD1c et CLEC10A (See *et al.*, 2017; Villani *et al.*, 2017; Heger *et al.*, 2018). Les cDC2, pour partie, sont dépendantes de l'expression d'IRF4 (Bosteels and Scott, 2020). Les cDC2 sont considérées comme CD16⁻ CD88⁻ CD11c⁺ CD11b⁺ XCR1⁻ CD207⁻ chez la souris et CD1a⁺ CD1c⁺ CD14⁻ CD88⁻ CD5^{+/-} chez l'Homme (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017; Dutertre *et al.*, 2019; Bourdely *et al.*, 2020). Chez l'Homme, les cDC2 cutanées expriment significativement plus de CD11b, CD123, CD206, CD1a et CD83 que les cDC2 du sang de la rate et des amygdales (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). L'expression de CD83 peut laisser penser que les cDC2 de la peau sont plus activées que dans les autres tissus, un prérequis peut-être pour leur migration. A l'homéostasie ces cellules n'expriment pas le marqueur CD64, spécifique des macrophages et des DC inflammatoires (Guilliams *et al.*, 2016). La peau est un organe au contact des pathogènes et propice aux inflammations. Il est donc possible que s'y retrouvent en permanence des populations de cDC2 inflammatoires, ayant la capacité d'exprimer CD64, comme démontré dans le poumon (Bosteels *et al.*, 2020) ou la peau, où il s'agit de DC dérivées de monocytes (Tamoutounour *et al.*, 2013). Dans la peau se trouvent aussi des cDC CD11b⁻ CD103⁻ (doubles négatives) dépendantes d'IRF4 pour leur différenciation, qui ont été associés aux cDC2. Elles expriment CD172 et CX3CR1. Elles sont absentes de la rate et n'ont pas d'homologue identifié à ce jour chez l'Homme (Strobl, Krump and Borek, 2019).

1.3.1.2.2. *Ontogénie*

Les cDC2 sont dépendantes de l'expression du FT IRF4 (Sichien *et al.*, 2016). IRF4 contrôle, entre autre, la transcription de l'IL23, et les souris délétées pour IRF4 (IRF4^{ko}) sont moins efficaces pour monter des réponses immunitaires impliquant les LT CD4⁺ (Schlitzer *et al.*, 2013). Cependant, la délétion d'IRF4 ne suffit pas à éliminer l'ensemble des cDC2 (Guilliams *et al.*, 2016). Dans la peau et la rate notamment, les souris IRF4^{ko}

ont un nombre de cDC2 (CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺) similaire aux souris WT (Bajaña *et al.*, 2012; Schlitzer *et al.*, 2013). L'impact différentiel de la délétion d'IRF4 sur leur différenciation révèle aussi, d'une part, l'hétérogénéité des populations CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ à l'homéostasie, et d'autre part l'impact compensatoire possible de facteurs locaux. L'origine ontogénique des cDC2 est encore activement discutée (Amon *et al.*, 2020). Il se dégage que chez la souris (Tussiwand and Gautier, 2015; Binnewies *et al.*, 2019; Brown *et al.*, 2019) et chez l'Homme (Villani *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2017; Dutertre *et al.*, 2019) qu'il existerait au moins deux sous-populations de cDC2. Dans l'ensemble, ces études proposent une nouvelle classification des cDC2 avec des cDC2 exprimant CD5 chez l'Homme (Villani *et al.*, 2017; Dutertre *et al.*, 2019), marqueur aussi mis en évidence par (Yin *et al.*, 2017) et des cDC2 CD5⁻. Ces dernières sont hétérogènes, et trois sous-populations sont décrites, mais celles-ci correspondraient en réalité à trois états de maturation d'une même population de cellules, depuis nommée DC3 (Figure 2) (Dutertre *et al.*, 2019; Bourdely *et al.*, 2020). Ces cellules sont non classiques car elles sont dépendantes du FLT3-L, comme les c/pDC, mais l'ablation des populations de monocytes les exclut en grande partie (Dutertre *et al.*, 2019). Les cDC2 B seraient des DC inflammatoires, comme le suggère leur accumulation au cours du lupus (Dutertre *et al.*, 2019). Cela pourrait aussi coïncider avec la description récente chez la souris de sous-populations de cDC2 inflammatoires induites depuis des progéniteurs CCR2^{-/-} (marqueur de progéniteurs des monocytes chez la souris). Ces cellules expriment CD64, un marqueur des macrophages, et pourraient contribuer à la confusion quant à l'origine et à la fonction des cellules dérivées de monocytes (Bosteels *et al.*, 2020). Les cDC2 inflammatoires de cette dernière étude ne sont pas décrites à l'homéostasie. En outre, des sous-population de DC inflammatoires sont aussi décrites dans le cancer et sont retrouvées chez l'Homme et la souris. En conclusion, il est encore difficile de différencier les cDC2 des DC3 et des DC inflammatoires, cependant la définition de marqueurs membranaire permettant de trier ces populations de cellules est un pan de recherche essentiel pour mieux comprendre la biologie des DC (Segura *et al.*, 2013;

Binnewies *et al.*, 2019; Villar and Segura, 2020). Finalement, les autres populations décrites (CD1c⁻ CD141⁻ CD11c⁺) et (AXL⁺ SIGLEC1⁺ SIGLEC6⁺, dites AS DC) (Villani *et al.*, 2017). Si les premières semblent correspondre à des MoDC, les secondes pourraient correspondre à une nouvelle population de DC, cependant il est possible que les marqueurs utilisés pour leur discrimination définissent aussi des progéniteurs de cDC1/2 (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017; Villani *et al.*, 2017; Dutertre *et al.*, 2019; Leylek *et al.*, 2019). Ces cellules ont été décrites aussi chez la souris et nommée transitional DC (tDC) (Leylek *et al.*, 2019). Il est important de garder à l'esprit qu'une différenciation de DC inflammatoires implique que l'histoire immunitaire des sujets sains impactera probablement les sous-populations de DC décrites (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). De même, le microenvironnement tissulaire semble déterminer le devenir des progéniteurs, mais les facteurs orientant la différenciation des cDC2 dans les tissus restent mal connus.

1.3.1.2.3. *Fonctions privilégiées*

Les cDC2 sont de bonnes productrices d'IL23 et sont capables de polariser les réponses LT CD4. En particulier, elles polarisent efficacement les réponses Th2 (Gao *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014) et Th17 (Schlitzer *et al.*, 2013) (Figure 3). Les lymphocytes Th2 sont particulièrement impliqués dans l'allergie. Les cDC2 sont compétentes aussi dans l'induction de T follicular helpers (Tfh), lymphocytes impliqués dans l'établissement des réponses LB, suggérant un rôle important dans la réponse humorale (Calabro *et al.*, 2016; Briseño *et al.*, 2018; Durand *et al.*, 2019). De ce fait, ces cellules sont particulièrement intéressantes dans les approches vaccinales visant à induire des réponses humorales (Durand *et al.*, 2019). Finalement, les cDC2 sont capables de polariser les réponses Treg (Vander Lugt *et al.*, 2017), notamment dans la peau via la production d'acide rétinoïque (Guilliams *et al.*, 2010). Une étude récente propose que la fonction des cDC2 dans l'environnement tumoral serait fortement inhibée en retour par les Treg qui empêcheraient leur migration aux OL en plus d'inhiber la fonction des

LT effecteurs (Binnewies *et al.*, 2019). Finalement, elles sont aussi capables de moduler les réponse T CD8 en contrôlant particulièrement l'induction de T CD8 mémoires (Ainsua-Enrich *et al.*, 2019) et sont capables de réaliser la présentation croisée, principalement d'antigènes couplés à des complexes immuns (Den Haan and Bevan, 2002; Heath *et al.*, 2004). Du point de vu des mécanismes contrôlant leur fonction, les cDC2, du moins une sous partie de ces cellules, sont dépendantes du FT terminal selector IRF4. Le rôle précis d'IRF4 dans les cDC2 reste à définir. Il est possible qu'IRF4 contrôle directement la migration des cDC2 car les cellules IRF4^{ko}, sans altération de leur nombre dans la peau, migrent moins bien aux OL dans des expériences de type « FITC painting » (Bajaña *et al.*, 2012). Cependant ce FT contrôlant la survie des cDC2, il est possible que les défauts en cDC2 observés dans les OL des souris IRF4^{ko} soient en réalité liés à une surmortalité de ces cellules. Il est possible aussi qu'IRF4 joue un rôle direct sur la polarisation des réponses T (Amon *et al.*, 2020). Comme nous le disions précédemment, il semblerait que coexistent 2 sous-populations de cDC2A/B (Figure 2), suggérant que cDC2A et B (Dutertre *et al.*, 2019) pourraient avoir des rôles complémentaires sur la polarisation des LT, en fonction de leur dépendance relative à ce FT. En outre, plusieurs études suggèrent que les DC dépendantes de NOTCH2 (cDC2B) sont efficaces pour polariser les réponses Th17 (Tussiwand and Gautier, 2015). Finalement, des études récentes proposent que les cDC2 induites au cours de l'inflammation, à la différence des MoDC, sont capables de migrer des tissus vers les OL (Binnewies *et al.*, 2019; Bosteels *et al.*, 2020). L'étude du rôle précis des sous-populations de cDC2 reste néanmoins à mieux définir.

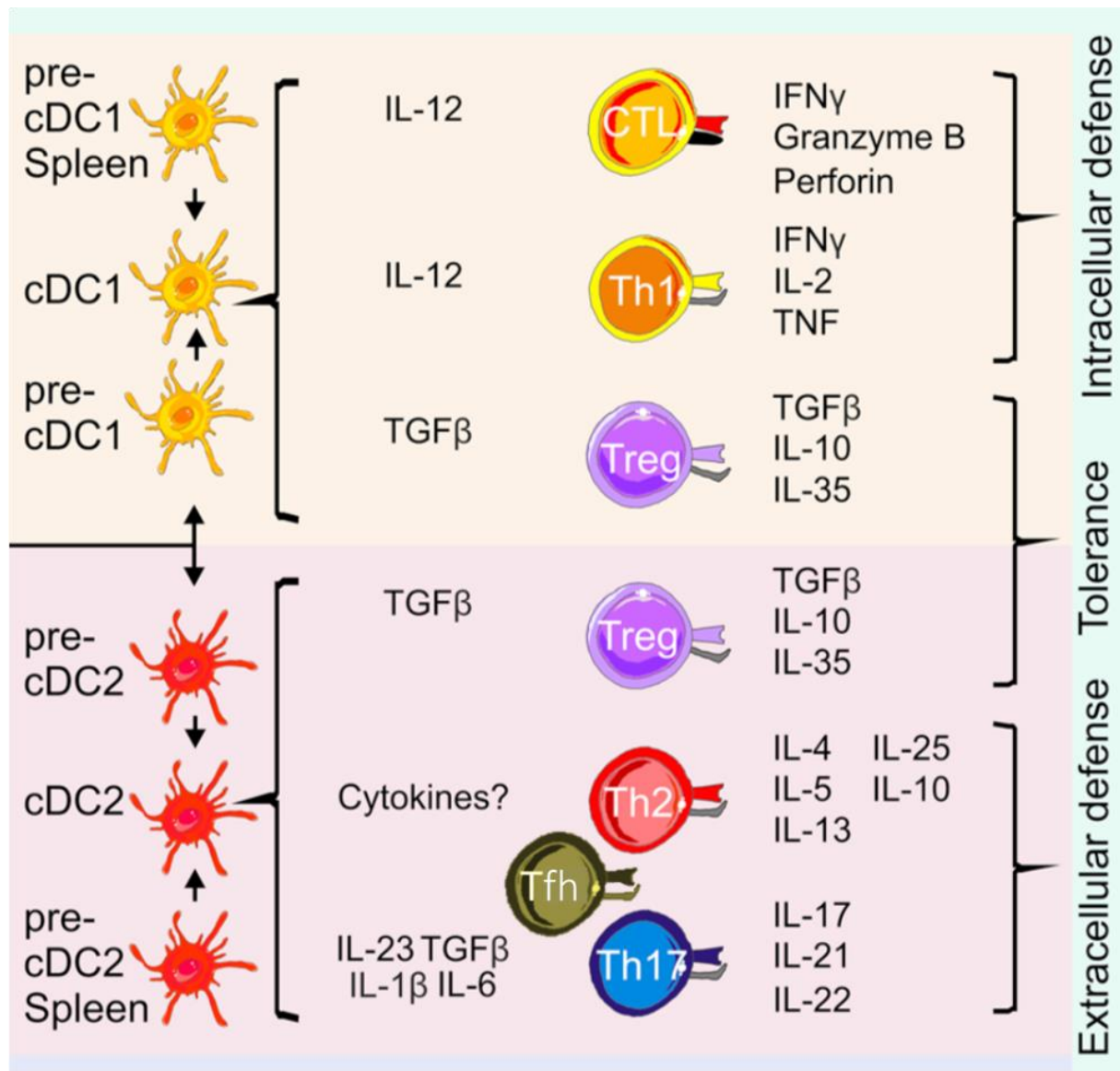


Figure 3 : Rôles des cDC1 et 2 sur la polarisation des LT. Les cDC1 et 2 se différencient de manière terminale dans les tissus. Les cDC1 sont connues pour polariser les réponses Th1 de par leur production d'IL12 et des LT CD8 (CTL) via leur capacité de présentation croisée. Les cDC2 sont connues pour leur capacité de polarisation des réponses Th2/Th17 et leur production d'IL23. cDC1 et cDC2 sont capables de polariser les réponses Treg, notamment via la production de TGF β . Figure issue de (Amon *et al.*, 2020).

1.3.1.3. pDC

1.3.1.3.1. Ontogénie et sous-populations.

Nous ne définirons pas les sous-populations de pDC de la peau car, à l'homéostasie, ces cellules n'y sont que très peu présentes (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). La dépendance des pDC à IRF8 et IRF4 n'est pas claire. Toujours est-il que la délétion

concomitante de ces deux FT abolit la différenciation des pDC (Sichien *et al.*, 2016). Il est envisagé que la perte d'IRF8 puisse être en partie compensée par IRF4 dans ces cellules. Ces cellules sont dépendantes de l'expression des FT TCF4 (E2.2) et ZEB2 (Bosteels and Scott, 2020). Du point de vue fonctionnel, ces DC sont capables de produire des interférons de type I et III (IFN I/III) et de présenter directement, ou via la présentation croisée, les antigènes aux LT (après maturation) (Reizis, 2019). Ces fonctions pourraient différencier deux populations de cellules, ou deux états d'activation, avec d'un côté une capacité à présenter les antigènes (les « cDC like ») et de l'autre des DC moins efficaces à présenter les antigènes mais très efficaces pour produire les IFN (Abbas *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2020). Deux hypothèses émergent alors : cette diversité fonctionnelle est à l'image 1) d'une diversité ontogénique ou 2) d'une différenciation fonctionnelle après activation (Reizis, 2019; Amon *et al.*, 2020). Un élément de réponse est venu de l'identification d'une sous population de précurseurs de cDC, les AS DC, polluant les pDC isolée de manière standard. Ces précurseurs de cDC(/pDC) partagent des marqueurs communs avec les pDC (AXL) induisant une confusion entre ces deux populations de cellules. Les AS DC, désormais connues, sont retirées de la plupart des analyses. Pourtant les différences fonctionnelles se maintiennent, en particulier au cours des réponses antivirales (Alcumbre *et al.*, 2018). Un élément important semble soutenir la première hypothèse. En effet, les pDC seraient capables de se différencier à partir de progéniteurs myéloïdes (Onai *et al.*, 2013), mais aussi lymphoïdes (Dekker *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Dress *et al.*, 2019). A ce titre, une proportion non négligeable de pDC circulante présente un réarrangement des gènes du BCR, indiquant l'activation dans ces cellules de programmes transcriptomiques partagés avec la lignée lymphoïde et dépendante de TCF4 dans les pDC (ou d'un autre FT encore non identifié dans les cDC1). Chez la souris, les pDC d'origine myéloïde seraient préférentiellement issues de progéniteurs Lin⁻ Flt3⁺ IL7R⁻ M-CSFR⁻. Une autre étude récente propose, chez la souris, que les pDC seraient uniquement d'origine lymphoïde, issues de progéniteurs Ly6D⁺

L7R⁺ (Dress *et al.*, 2019). Finalement, en faveur de la seconde hypothèse, des études récentes montrent que l'activation des pDC (là encore en l'absence des AS DC) leur confère des phénotypes extrêmement différents (Alculumbre *et al.*, 2018). Cette étude propose que les pDC subissent une différenciation fonctionnelle forte à partir d'une population homogène de départ. Il est alors tentant de se demander si les pDC sont réellement différenciées de manière terminale lorsqu'elles sortent de la moelle. Ces auteurs redéfinissent des sous-populations de « cDC like » (dites P3-pDC, PD-L1⁻ CD80⁺, fortement migrantes) et productrices d'IFN (P1-pDC, PD-L1⁺ CD80⁻) (Figure4). Ils définissent aussi une population P2 dont les fonctions sont moins claires. Cependant, il est possible que l'orientation de ces cellules vers les cDC like ou productrices d'IFN soit déjà imprimée dans leur programme génétique (Reizis, 2019). Ces questions restent actuellement débattues.

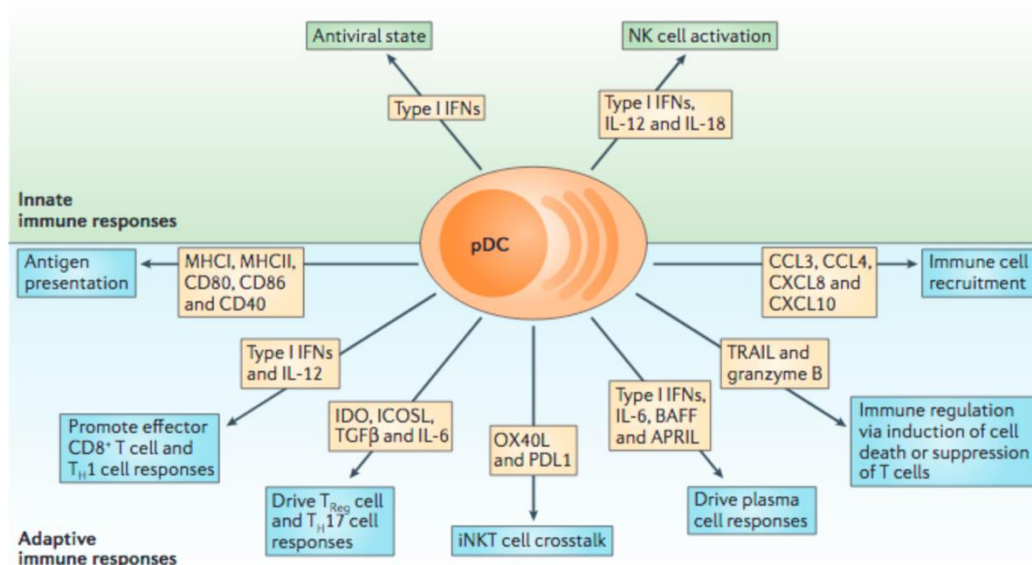


Figure 4 : Fonctions associées aux pDC. Les pDC sont connues pour mettre en place des fonctions essentielles, notamment dans les réponses anti virales. Elles possèdent d'importantes capacités de production d'IFN de type I et participent activement à la mise en place des réponses innées (cellules NK) et adaptatives (polarisation de LT/LB). Figure issue de (Swiecki and Colonna, 2015)

1.3.1.3.2. Fonctions privilégiées

Les pDC possèdent, via l'expression des TLR 9 et 7, d'importantes capacités de réponse aux ADN et ARN exogènes. Le TLR7 est spécialisé dans la détection des ARN tandis

que le TLR9 détecte l'ADN portant des motifs CpG non méthylés. Le TLR7 est particulièrement activé en réponse à un traitement par l'imiquimod. Il est intéressant de noter que l'activation des pDC via les TLR induit une forte production d'IFN I et III (Figure 4), leur conférant un rôle central dans la reconnaissance des virus et d'autres pathogènes (Reizis, 2019), mais que cette production pourrait diminuer leur survie (Swiecki and Colonna, 2015). En outre, la production des IFN est, dans ces cellules, dépendante du FT IRF7, exprimé constitutivement dans les pDC, leur permettant d'initier les réponses IFN (Dalod *et al.*, 2002). Ces cellules semblent constamment contrôler leur état d'activation et leur survie via la mise en place de boucles de rétrocontrôle positif : les IFNAR (Tomasello *et al.*, 2018) et le TNFa (Alcumbre *et al.*, 2018) favorisant leur production d'INF-I ou négatif : CXCR4 inhibant l'activation des pDC en réponse aux monoamines (Smith *et al.*, 2017; Reizis, 2019). Ces boucles sont essentielles au maintien de l'homéostasie immunitaire et leur délétion dans les pDC peut induire des syndromes auto-immuns (Schmitt *et al.*, 2016). Le rôle des pDC dans l'induction des réponses adaptatives ne se limite pas à la production d'IFN (Figure 4). En effet, elles (ou du moins une partie d'entre elles) possèdent, une fois mature, des capacités d'activation des LT CD4 et CD8 (Schlecht *et al.*, 2004; Mouriès *et al.*, 2008; Tel *et al.*, 2013). L'activation des TCD4 peut se faire en faveur de LT effecteurs mais aussi des LTreg (Ye *et al.*, 2020). Cela rend les pDC particulièrement intéressantes dans l'étude des réponses antivirales, auto-immune et anticancéreuses (Swiecki and Colonna, 2015; Reizis, 2019). Finalement, des découvertes récentes semblent indiquer que les LT CD8⁺ favorisent le recrutement local des pDC et des cDC1 d'une manière CCR5 et XCR1 dépendante respectivement. Les pDC favoriseraient localement l'activation des cDC et l'activation des LT CD8 (Brewitz *et al.*, 2017). Enfin, la migration des pDC, critique pour leur fonction, est dépendante des nombreux récepteurs tels que CXCR4 (sortie de la moelle osseuse) (Kohara *et al.*, 2007), CCR7 (entrée dans les GL), CCR9 (entrée dans les tissus) et CCR5 (migration dans les LN) (Tiberio *et al.*, 2018).

1.3.2. Les autres CPA d'origine myéloïde

Certaines populations cellulaires sont proches des DC en terme fonctionnel mais ne correspondraient pas « purement » à des DC sur la base de critères ontogéniques. En effet, à la différence des pDC et cDC, ces cellules dérivent de précurseurs s'auto-renouvelant localement ou de monocytes circulants. Ces cellules sont abondamment différenciées durant l'inflammation, mais peuvent aussi être retrouvées à l'homéostasie dans certains tissus (Bogunovic *et al.*, 2009).

1.3.2.1. Les cellules de Langerhans (LC)

1.3.2.1.1. LC de la peau

Dans la peau, les LC sont situées dans l'épiderme. Elles expriment chez l'Homme et la souris les marqueurs CMH II, CD207, EpCAM, CD11b, CX3CR1 et CD172a. Chez l'Homme, elles expriment CD1a et CD1c. Chez la souris, elles expriment F4/80 (Kashem, Haniffa and Kaplan, 2017; Strobl, Krump and Borek, 2019). Des sous-populations de LC sont décrites. Particulièrement, les LC issues de monocytes Ly6C^{hi} chez la souris, CD14⁺ chez l'Homme. Les LC dérivant des monocytes (moLC) exprimeraient à la fois CD207 et DC-SIGN, contrairement aux LC qui n'expriment pas DC-SIGN (Otsuka *et al.*, 2018). Cependant les moLC de cette étude sont dérivées *in vitro*, et des facteurs locaux, comme les corticoïdes endogènes, pourraient influencer ce phénotype.

1.3.2.1.2. Ontogénie

Chez l'Homme et la souris (Mass *et al.*, 2016), comme pour les macrophages tissulaires, les LC sont issues de précurseurs d'origine embryonnaire qui colonisent l'épiderme et s'auto renouvèlent (Deckers, Hammad and Hoste, 2018). La délétion des facteurs TGFb1, ID2, Runx3 et Mcsfr inhibe leur différenciation. De plus, il semblerait que ces cellules secrètent elles même le TGFβ et qu'il soit nécessaire qu'elles se désensibilisent à ce facteur pour pouvoir migrer aux OL (Bobr *et al.*, 2012). Contrairement aux cDC et aux pDC, les LC ne sont pas dépendantes du FLT3-L pour leur développement même

si elles sur-expriment son récepteur au cours de leur migration (Miller *et al.*, 2014). En outre, la délétion d'IRF8 réduit leur nombre (Merad, Ginhoux and Collin, 2008). De par leur ontogénie, les LC sont donc classées parmi les macrophages dans certaines études (Guilliams *et al.*, 2014), cellules avec lesquelles elles partagent de nombreux aspects de leur biologie (Deckers, Hammad and Hosten, 2018). Cependant, leur capacité migratoire avérée (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017) les distingue fonctionnellement des macrophages. Ces classifications restent largement débattues.

1.3.2.1.3. Fonctions privilégiées

Les LC sont capables de capturer des antigènes dans la peau et de migrer aux OL. En particulier, CD207 est retrouvée dans des formations membranaires en « raquettes de tennis » dont la fonction est, entre autres, d'internaliser les particules virales (De Witte *et al.*, 2007). Leur migration se fait en deux étapes, une première phase dépendante de CXCR4 pour rejoindre le derme puis une seconde phase dépendante de CCR7 notamment pour rejoindre les OL. Les LC peuvent induire des réponses Treg capables d'inhiber la mise en place d'une réponse T mémoire (Gomez de Agüero *et al.*, 2012; Strandt *et al.*, 2017) mais peuvent également activer de fortes réponses T CD8 (Strandt *et al.*, 2017). Leur capacité d'induction de Treg est limitée par leur activation. De plus, la délétion des LC conduit à une hyper sensibilité cutanée accrue (Kaplan *et al.*, 2005). Ces études laissent penser que les LC sont prédéterminées à promouvoir la tolérance immunitaire et qu'il faut un signal d'activation suffisant pour « casser » la tolérance (Shklovskaya *et al.*, 2011). Les LC sont aussi capables d'induire les réponses Th17, cellules dont l'induction est dépendante des LC dans l'eczéma (Kobayashi *et al.*, 2015).

1.3.2.2. Les DC dérivés de monocytes

1.3.2.2.1. MoDC de la peau.

Les MoDC dans la peau (Tamoutounour *et al.*, 2013) sont décrites avec un phénotype quasi similaire aux cDC2. Elles expriment CD11c, CD11b, CX3CR1, CD172, CD64 et CCR2

(Kashem, Haniffa and Kaplan, 2017). Dans la peau inflammée s'accumulent les cellules CD206⁺ DC-SIGN⁺ CD1a⁺ qui pourraient correspondre à des moLC et des moDC (Guttman-Yassky *et al.*, 2007). Cependant dans la peau saine chez l'homme ces cellules ne sont pas retrouvées.

1.3.2.2.2. Ontogénie

Ces cellules, dérivées majoritairement au cours de l'inflammation, proviennent de monocytes circulant CD14⁺ chez l'Homme, Ly6C^{hi} CCR2⁺ chez la souris. Ces monocytes ont la capacité de se différencier en Mo-Macrophages et Mo-DC. Il semblerait que les Mo-Macrophage dépendent du FT MAFB et que IRF4, AHR et BLIMP-1 définissent la différenciation en Mo-DC (Goudot *et al.*, 2017).

1.3.2.2.3. Fonctions privilégiées

Elles ont de nombreuses convergences fonctionnelles avec les macrophages (Coillard and Segura, 2019). En outre, elles produisent d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires. Finalement, elles sont capables de promouvoir les réponses Th17 (Segura *et al.*, 2013). Ces cellules ne migreraient pas aux OL, mais seraient capables de réaliser la présentation croisée (Segura *et al.*, 2009; Tsing-Lee *et al.*, 2019), proposant, pour ces cellules un rôle dans la mise en place de l'immunité locale.

1.3.2.3. Cellules dendritiques de culture

1.3.2.3.1. DC de culture différenciées avec du GM-CSF.

Une manière de différencier *in vitro* un grand nombre de cellules proches des DC est de traiter des monocytes CD14⁺ circulants (Humain) ou des cellules de moelle osseuse (souris) avec du GM-CSF (Inaba *et al.*, 1992). Nous appellerons ces cellules des BMDC pour la suite de ce manuscrit. Dans les cultures de BMDC, chez la souris, on peut identifier des DC et des macrophages sur la base de marqueurs membranaires

différenciant : CD11c⁺ MHCII^{int} CD115⁺ MerTK⁺ pour les macrophages (GM-Mac, Figure 5) et CD11c⁺ MHCII^{hi} CD115⁻ CD135⁺ pour les DC (GM-DC, Figure 5). En outre, la maturation induit dans GM-DC l'expression d'IRF4, rappelant les cDC2, CD11b⁺. Les différences d'expression de CD115 correspondent à celles retrouvées *in vivo* sur les précurseurs de cDC (CD115⁻) vs monocytes (CD115⁺) chez l'Homme (Breton *et al.*, 2015). Fonctionnellement, les GM-Mac sont plutôt sessiles et répondent aux gradients de chemokine C-C motif ligand 2 (CCL2) grâce à l'expression du récepteur CCR2 à leur surface. Les GM-DC sont très mobiles même immatures et, après maturation, répondent aux gradients de chimiokine C-C motif ligand 21 (CCL21) grâce à l'expression du récepteur CCR7 à leur surface.

1.3.2.3.2. DC de culture différenciées avec du GM-CSF et du FLT3-L.

Cette méthode de culture cellulaire permet l'obtention de pDC, cDC1 et 2 (FL-cDC et FL-pDC) (Sathe *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2014). Phénotypiquement, les cultures n'utilisant que du FLT3-L permettent l'obtention de DC CD8⁺ CD11b⁻, CD8⁻ CD11b⁺ et pDC. L'ajout de GM-CSF à forte concentration en association du FLT3-L différencie une majorité de DC CD103⁺ ayant une fonction proche de celle des cDC1 (Mayer *et al.*, 2014). Cependant, contrôler l'ajout de GM-CSF, à concentrations faibles puis forte, trois jours avant la fin de la culture, permet l'obtention de cellules CD103⁺ CD24⁺, CD11b⁺ CD103⁻ et de pDC (Sathe *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2016). Ces cultures reproduisent *in vitro* la nécessité de la signalisation FLT3-L et GM-CSF pour différencier des DC CD103⁺. En outre, elles montrent aussi que la présence de GM-CSF inhibe la différenciation de DC exprimant CD8a. Les DC CD103⁺ dérivés dans ces culture (FL-cDC1), comme discuté dans (Mayer *et al.*, 2014), expriment de fort niveaux de CCR7.

Sous populations de DC différenciées *in vitro*

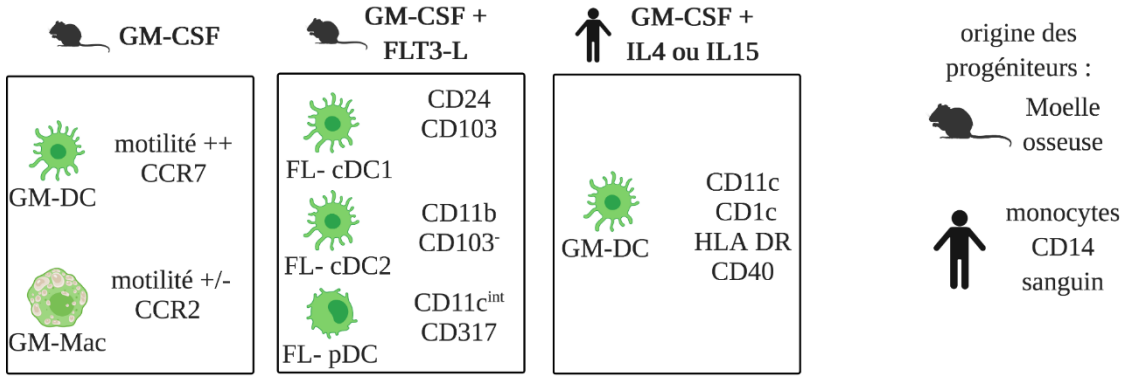


Figure 5 : Sous-population de DC issues de culture. Même structure de figure que la figure 4. Au-dessus des rectangles sont représentés les cytokines utilisées pour différencier les cellules. Adapté de (Guo *et al.*, 2016).

Dans cette première partie, nous avons donc vu les différentes sous-populations de DC et discuté de leur ontogénie. Nous allons à présent voir comment la migration, processus central pour que les pré-DC puisse rejoindre les tissus et que les DC périphériques puissent y patrouiller puis migrer aux OL (Figure 6) est régulée (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017; Eisenbarth, 2019). Je me concentrerai sur la fonction des DC murines pour la suite de ce manuscrit.

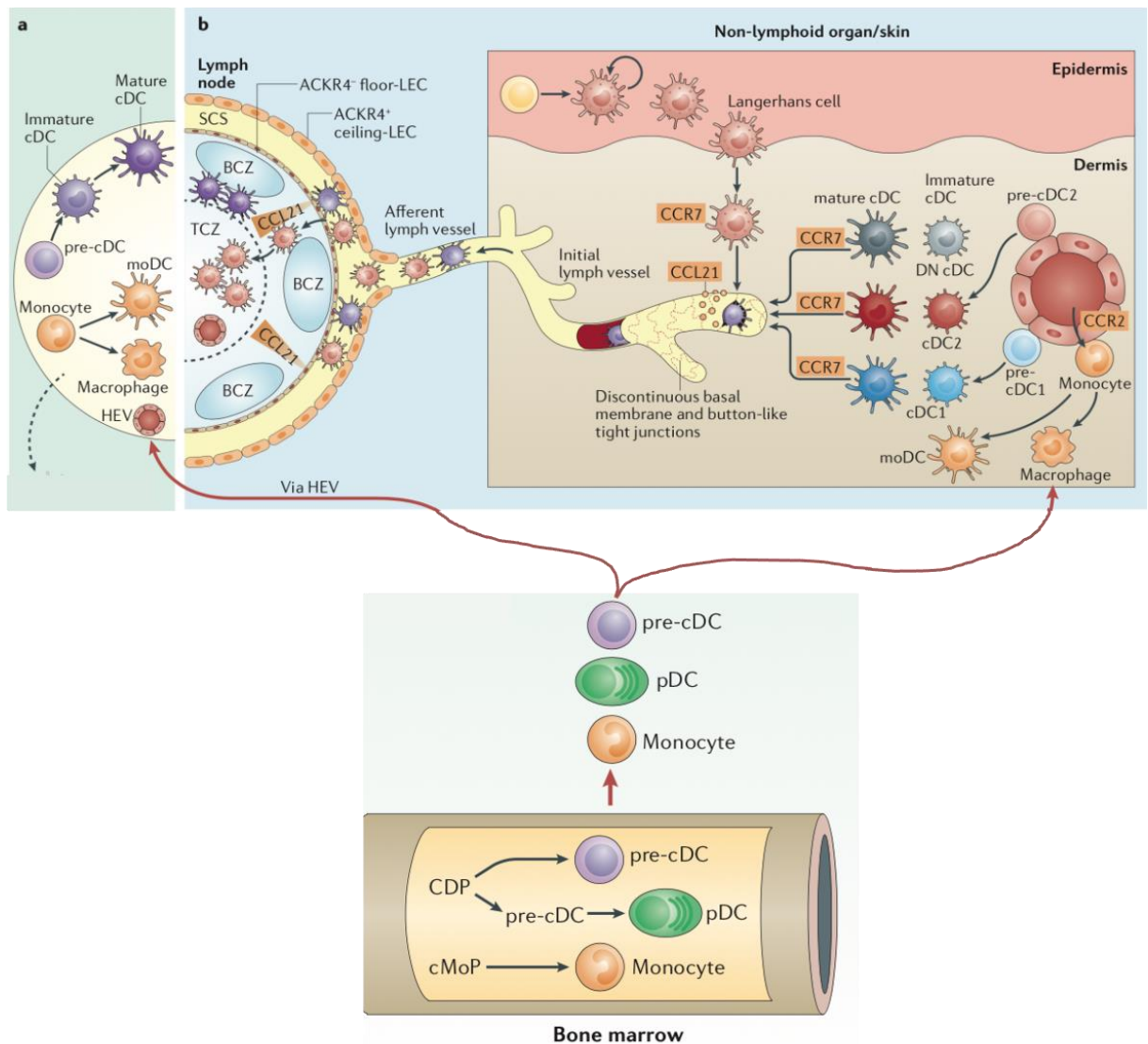


Figure 6 : La migration est un processus présent à toutes les étapes de la vie des DC. Premièrement, les précurseurs de cDC émigrent de la moelle osseuse jusqu'aux sang. Les pDC sortent différenciée de la moelle selon un mode dépendant de la fonction de CXCR4. Du sang, les pré-cDC et pDC migrent dans les tissus périphériques et lymphoïdes pour se différencier de manière terminale. Au sein du tissu, les DC immatures migrent et capturent les antigènes. Après maturation, les DC des tissus périphériques migrent, de façon dépendante de CCR7 notamment, aux OL. Une fois dans les OL, les sous-populations de DC migrent vers différentes zones. Figure adaptée de (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017).

2. Migration des DC

La migration des DC depuis les tissus jusqu'aux OL est dépendante de leur état d'activation/maturation. Nous avons, et allons, employer le terme de maturation à plusieurs reprises au cours des parties suivantes. Clarifions donc ce processus rapidement pour mieux appréhender les concepts de la migration des DC. Les DC possèdent de nombreux récepteurs capables de reconnaître des motifs conservés de

pathogènes (les Pattern Recognition Receptors, PRR) (Macri *et al.*, 2018). Nous avons déjà abordé certains de ces récepteurs en discutant plus haut des TLR3/7/ et 9. Ces récepteurs sont couplés, pour les TLR, aux protéines TRIF et Myd88, capables d'induire, entre autres, l'activation de NFκB, un facteur de transcription central dans l'activation des DC. Comme le montre la figure 7, la nature du pathogène définit la réponse immunitaire induite par les DC. Cependant, une activation spontanée des DC est aussi décrite. Cette activation est dépendante d'Ikkβ, un régulateur de NFκB et promeut la différenciation fonctionnelle de DC « tolérogènes » c'est à dire capables d'induire faiblement les réponses T effectrices, mais efficacement les réponses Treg (Baratin *et al.*, 2015). Les conséquences fonctionnelles de l'activation des DC sont une expression accrue des molécules du CMH II, une expression des molécules de co-stimulation CD80/86, une modification de leur schéma de migration et finalement une modification de leur capacité à polariser les réponses T (Hilligan and Ronchese, 2020).

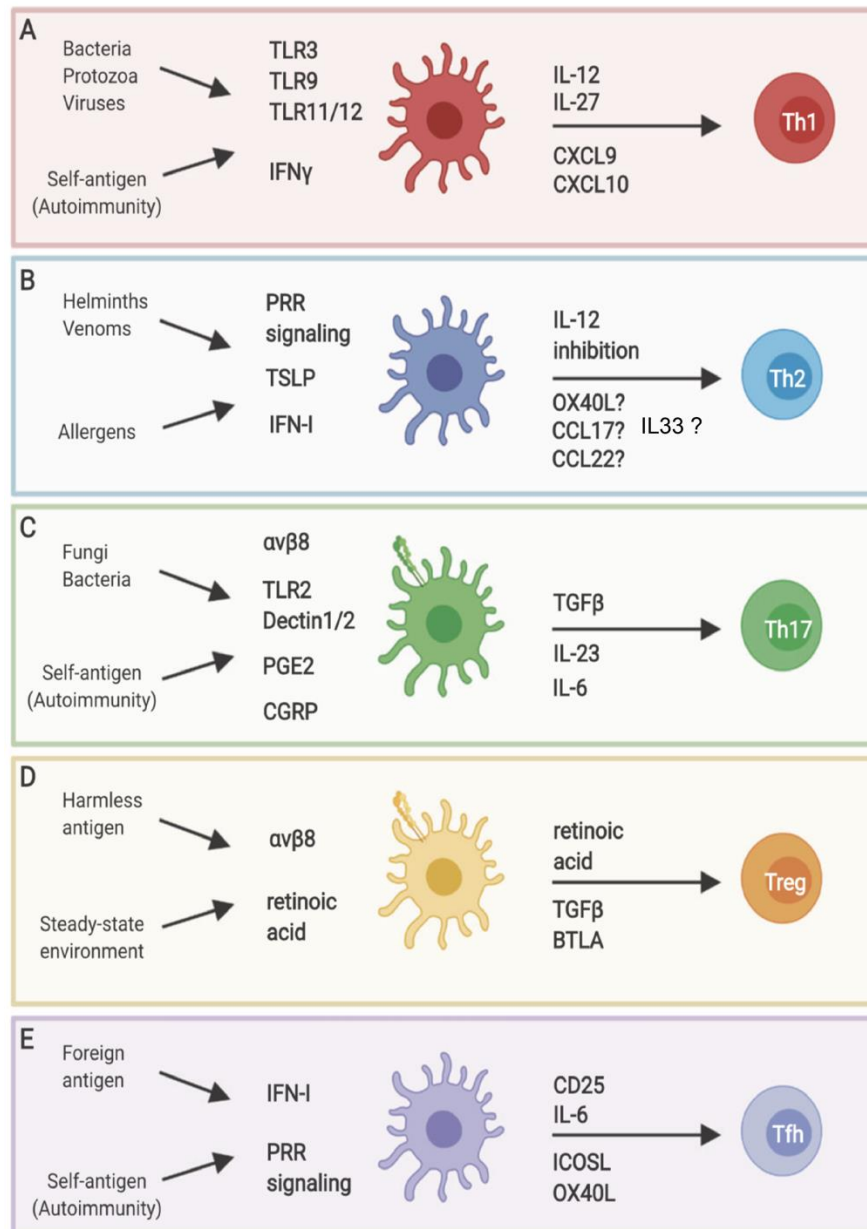


Figure 7 : La nature des signaux d'activation et de leur PRR définit la réponse immunitaire induite par les DC. Les cadres de couleur définissent la polarisation des grandes familles de lymphocytes T (Th1/2/17/fh) et Treg. Au milieu sont représentés les DC avec à leur droite la nature des signaux qu'elles produisent pour polariser les réponses T. Sur leur gauche sont définis la nature des pathogènes et les récepteurs capables de les détecter. Figure adaptée de (Hilligan and Ronchese, 2020)

2.1. Organisation générale de la migration des pré-DC et DC

La fonction des DC est dépendante de la migration à bien des égards (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017). En effet, ce processus détermine la capacité de leurs précurseurs à sortir de la moelle osseuse et à pénétrer les tissus par la

transmigration endothéliale. Leur entrée dans les ganglions lymphatiques (GL) se fait aussi par le sang (pré-cDC / pDC), via des veinules spécialisées, les High endothelial venules (HEV). Une fois différenciées, les DC doivent pouvoir patrouiller les tissus mais aussi capturer les antigènes. Suite à leur activation, les DC changent de régime de migration pour quitter le tissu et rejoindre les GL. Sur leur route, ces cellules passent d'un tissu aux vaisseaux lymphatiques via des cellules endothéliales lymphatiques (LEC). Leur migration dans les vaisseaux lymphatiques semble guidée par les flux de lymphe. Arrivées aux GL, les DC doivent s'arrêter au niveau du sinus sous capsulaire et migrer, via les LEC, pour rejoindre les zones riches en LT et LB. Finalement, les DC doivent reprendre une migration intra-tissulaire en direction des LT /B pour promouvoir les réponses immunitaires. Il est à rajouter qu'un contexte inflammatoire va profondément moduler la microarchitecture des GL et de ce fait la migration des DC. Comme nous le disions, la migration des DC aux GL est dépendante de leur maturation et de l'engagement du récepteur CCR7, mais peut aussi être contrôlée par l'engagement d'autres récepteurs.

Pour parler de la migration des DC, abordons premièrement leur « mode » de migration, comment se déplacent les DC.

2.1.1. Cellules mésenchymateuses et amoéboïdes.

La migration mésenchymateuse, ou adhérente, repose sur le contact avec des points d'ancrage (*e.g.* intégrines, fibronectines) et exige que la cellule réorganise son cytosquelette pour évoluer d'un point à un autre. Cette réorganisation, ancrée en plusieurs points fixes, donne aux cellules un aspect rigide caractéristique de la migration mésenchymateuse (Bear and Haugh, 2014). Une migration lente est alors organisée de points fixes en points fixes que des prolongements membranaires (*e.g.* Podosomes) ne cessent de rejoindre. De ces points fixes se développent des forces de traction permettant aux cellules d'orienter leur progression. En outre, des métalloprotéases sont exprimées dans les podosomes et permettent aux cellules de lyser les constituants de la matrice extracellulaire. D'autres cellules ont cependant

démonstré une capacité à migrer sans contact avec la matrice. Ces cellules de forme plutôt arrondie sont dites amoéboïdes en référence aux amibes (Lämmermann and Sixt, 2009). Elles utilisent un transport rétrograde d'actine constant (de l'avant vers l'arrière) pour se mouvoir. Elles mettent en place un uropode ultra contractile à l'arrière de la cellule. C'est la contraction / détente de cette structure qui crée le flux d'actine. Les cellules amoéboïdes utilisent des forces de friction pour transformer leur mouvements internes en migration (Figure 11C). L'expérience, principalement *in vitro*, montre que des cellules mésenchymateuses sont parfois capables de se mouvoir sans adhérer aux surfaces (Liu *et al.*, 2015), l'inverse étant vrai pour les cellules amoéboïdes (Lämmermann *et al.*, 2008). Ainsi donc les cellules seraient capables de mettre en place les différents modes de migration. Une question se pose alors, comment s'organise la migration des DC selon leur état de maturation ?

2.1.2. Les régimes de migration des DC en fonction de leur état d'activation

2.1.2.1. Patrouille et macropinocytose, une prérogative des DC immatures.

A l'état immature, les DC sont connues pour leur capacité à capturer des antigènes. Elles utilisent plusieurs mécanismes de capture antigéniques. Les DC peuvent mettre en place la phagocytose et l'endocytose médiée par des récepteurs, mais aussi un processus de capture antigénique indépendant de récepteurs à savoir la macropinocytose. Celle-ci est initiée par l'extension de digitations membranaires selon des processus dépendant de l'actine (Schlam and Canton, 2017). La macropinocytose des DC et des macrophages est constitutive, contrairement aux autres types cellulaires (Bohdanowicz *et al.*, 2013). Cela viendrait du fait que ces cellules possèdent des niveaux élevés d'acides phosphatidiques dans leur membrane. Les DC immatures possèdent donc d'importantes capacité de captures antigénique et une macropinocytose constitutive, en association avec l'expression de ChR leur permettant d'être recruté et de se mouvoir dans les tissus. Alors comment la capture antigénique s'articule-t-elle avec la migration ? Des études menées, *in vitro*, dans des systèmes de migration à deux

dimensions (des micro-canaux empêchant la cellule de se mouvoir autrement que d'avant en arrière), montrent que ces cellules alternent des phases de protrusion membranaire associées à de la macropinocytose avec des phases de rétractation associées à une augmentation de la vitesse de migration (Vargas, Chabaud, *et al.*, 2016) (Figure 11 A). Les DC ne semblent pas pouvoir « manger en marchant ». La migration des DC immatures, très mobiles dans les tissus (Ng *et al.*, 2008; Lelouard *et al.*, 2012; Farache *et al.*, 2013), n'est pas orientée, mais plutôt de type chimio-kinétique. En outre leur migration semble amoéboïde, car l'inhibition de leur capacité à fixer les intégrines, protéines présentes en nombre dans la matrice extracellulaire (MEC), n'empêche pas leur mobilité (Lämmermann *et al.*, 2008). Finalement, lors de l'activation, les DC perdent progressivement leur capacité de macropinocytose (Granucci *et al.*, 1999; West *et al.*, 2004; Watts, West and Zaru, 2010; Chabaud *et al.*, 2015) de manière concomitante à l'acquisition d'un phénotype mature. Nous aborderons la migration des DC matures dans le paragraphe suivant.

2.1.2.2. Migration rapide orientée, le régime de migration des DC activées

Les DC activées sont capables de migrer en direction des GL de manière chimio-taxique. L'inhibition de la macropinocytose et l'acquisition de l'expression de CCR7, en association avec d'autres signaux synergistes, favorisent cette chimiotaxie. Là encore, cette migration orientée est amoéboïde. Cependant il est possible qu'elle soit modulée par la nature des signaux de maturation. En effet, la maturation des DC par le LPS, ligand du TLR4 favorise une migration amoéboïde, alors qu'une stimulation via le TLR2 induit une migration adhérente (Cougoule *et al.*, 2018). Ces différences de mode migratoire sont imputées à la capacité des DC de former ou non des podosomes. La migration orientée des DC matures est donc de nature amoéboïde et chimio-taxique.

Dans une seconde partie, nous aborderons les mécanismes orientant et régulant la migration dans les DC en définissant leur lien au cytosquelette d'actine. Nous établirons ensuite leur lien avec la régulation calcique.

2.2. L'orientation de la migration des DC

Plusieurs signaux agissent sur le guidage des DC sur de longues distances. Les signaux chimiokines, reconnus par les chimiorécepteurs (ChR), distribués de manière homogène induisent un mouvement dit de chimio-kinésie (mouvement non orienté). Lorsqu'ils forment des gradients de concentration en phase soluble, ils sont capables d'induire une migration orientée vers les zones de plus forte concentration : la chimiotaxie (Murphy, 2012). La migration envers des chimiokines fixées sur un support est dite « hapto-taxique ». Ce mode de migration est défini par (Worbs, Hammerschmidt and Förster, 2017) comme une migration directionnelle prolongée le long de chimio-attractants immobilisés sur des cellules ou à la surface d'éléments de la MEC. Dans certains cas, les DC vont se servir des propriétés physiques du tissu (pression, dureté, topologie, porosité) (Bear and Haugh, 2014; Moreau, Piel, *et al.*, 2018) comme déterminants de guidage. Cependant tous les types cellulaires ne sont pas aussi efficaces dans l'utilisation de ces différents modes de migration, comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Nous allons détailler dans cette partie comment sont établis et décodés les signaux de guidage chimiokine.

2.2.1. Chimiokines et Récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines sont de petites molécules classifiées selon des séquences conservées. On retrouve 4 grandes familles : CC, CXC, XC et CX3C (Bachelier *et al.*, 2014) (Figure 8). Ces chimiokines sont détectées par des ChR à sept domaines transmembranaires signalant via les petites protéines G (GPCR). La signalisation via les ChR, abordée en détails dans la partie « importance du calcium », contrôle l'adhésion, la survie, la prolifération, la migration et bien d'autres fonctions dans les DC (Thelen and Stein,

2008; Tiberio *et al.*, 2018). La régulation des chimiokines et des ChR est centrale dans les processus de chimiotaxie et de grands axes de régulation sont décrits.

2.2.2. Modulation de l'expression et de la signalisation des ChR.

L'expression des ChR est régulée dans les DC selon leur état de maturation. Les DC immatures expriment un grand nombre de ChR pouvant moduler leur migration, à savoir CCR1/2/5/6, CXCR1/2/4 (Randolph, Ochoa and Partida-Sánchez, 2008) (Figure 8 & 10). Lorsqu'elles mûrissent, les DC expriment le récepteur CCR7 dont les ligands sont CCL21 et CCL19, deux chimiokines essentielles à la migration vers les GL. Les ChR peuvent être directement modulés de sorte à ce que leur capacité à induire la chimiotaxie soient inhibées ou augmentées. La modulation de la signalisation des ChR passe par deux processus principalement.

Premièrement, les récepteurs peuvent s'hétéro ou s'homo-oligomériser (Figure 10) (Stephens and Handel, 2013). CCR7 par exemple, dans un contexte inflammatoire et en présence de prostaglandine E2 (PGE2) s'oligomère et induit une signalisation forte favorisant la chimiotaxie envers CCL21 (Hauser *et al.*, 2016). Deuxièmement, CCR7 peut voir sa signalisation modulée et biaisée vers le recrutement de Barrestines, protéines conduisant à son internalisation. Ce phénomène est particulièrement décrit lors de la liaison de CCL19 à CCR7 (Otero, Groettrup and Legler, 2006). CCL19 promeut l'internalisation de CCR7 via notamment les G-protein coupled Kinases (GRK) 3 et 6 (Schwarz *et al.*, 2017). Mais cette internalisation est importante pour la chimiotaxie. En effet, la liaison de CCL19 n'induit pas une désensibilisation du récepteur, c'est à dire une perte de fonction. CCR7 n'est pas recyclé aux endolysosomes mais dans le réseau trans-golgien, où il rejoint un stock de CCR7 néo-synthétisé présent dans cet organe dans les DC matures. Cette internalisation facilite une signalisation via les protéines SRC / VAV / Rac (Laufer *et al.*, 2019) qui conduit au recyclage de CCR7 à la membrane plasmique en association avec le cytosquelette d'actine, induisant la formation de lamellipodes, structures importantes pour la chimiotaxie des DC activées. Certains récepteurs en revanche sont désensibilisés lors de leur internalisation, via leur

dégradation dans les endolysosomes. C'est le cas de CXCR4 par exemple (Marchese and Benovic, 2001). A ce titre, des mutations de CXCR4 ont été décrites, qui inhibent sa capacité à être désensibilisé après fixation de CXCL12. Ces mutations gain de fonction sont retrouvées chez les patients atteints du syndrome WHIM (Hernandez *et al.*, 2003; Balabanian *et al.*, 2005; Alapi *et al.*, 2007; Siedlar *et al.*, 2008) et perturbent notamment la compartimentalisation des cellules immunitaires. Nous avons donc vu que l'expression et la signalisation des ChR peut être modulée. Cependant, comment les gradients de chimiokines sont-ils établis pour induire la chimio-taxie?

2.2.3. Les récepteurs de chimiokine atypiques : création des gradients .

Les ChR atypiques n'induisent pas de signalisation dépendante des protéines G, contrairement aux ChR classiques (Bachelerie *et al.*, 2014) (Figure 8). Ces récepteurs peuvent être considérés comme des pièges à chimiokines. Ils les capturent et les adressent aux voies de dégradation, tout en recyclant en permanence aux endosomes. Ces récepteurs piègent localement les chimiokines et contribuent à établir des gradients. Pour la chimiotaxie des DC de la peau aux GL, on peut citer trois exemples de récepteurs particulièrement importants. Le récepteur ACKR2 est exprimé à la surface des LEC. Il a pour rôle de diminuer la concentration de chimiokines « non CCL21 » de la périphérie des LEC pour faciliter l'arrêt des DC matures et éviter la fixation des DC immatures. La délétion de ce récepteur induit le recrutement des DC immatures sur les LEC au détriment des DC matures (McKimmie *et al.*, 2013). Or, l'arrêt des DC matures sur les LEC est essentiel à leur migration aux GL car c'est là que s'engagent des contacts forts induisant leur transmigration vers les canaux lymphatiques (Vaahtomeri *et al.*, 2017). Le récepteur ACKR4 est exprimé sur le « toit » mais pas le « plancher » du sinus sous capsulaire dans les GL. Sa fonction de piégeage permet de créer le gradient de CCL19/21 favorisant l'entrée des DC dans les GL (Ulvmar *et al.*, 2014) (Figure 8). Enfin, le récepteur ACKR3 est capable de fixer la chimiokine CXCL12 avec une affinité dix fois supérieure à celle de CXCR4, (Balabanian *et al.*, 2005), qui pourrait induire une compétition locale pour cette chimiokine.

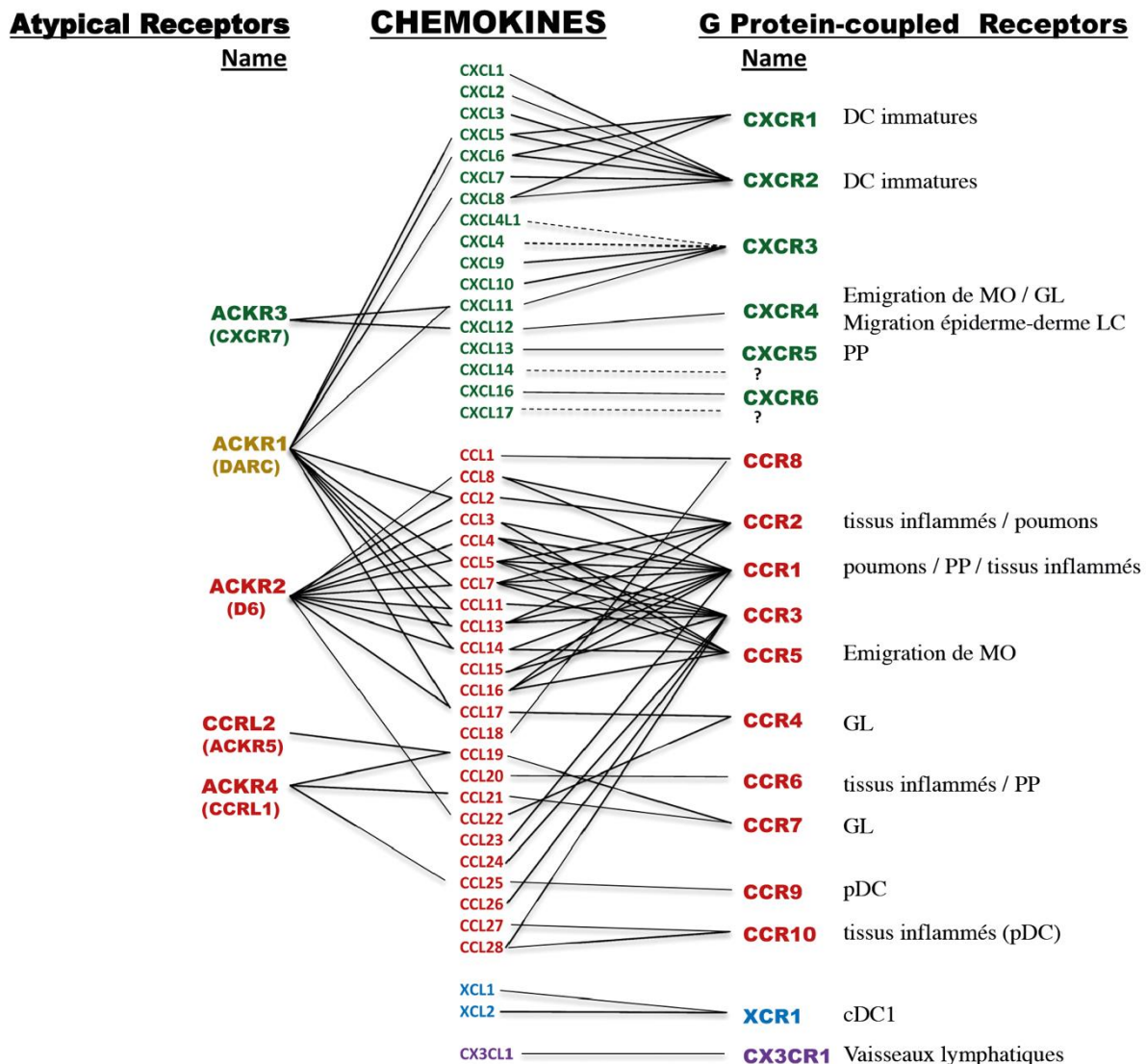


Figure 8 : Chimiokines et chimiorécepteurs et leurs rôles dans la migration des DC. Cette figure représente les différents ChR auxquels sont associés les chimiokines qu'ils fixent. Sur la droite sont figurés les types de migration pour lesquels ils sont essentiels dans les DC. MO : Moelle osseuse ; transmigration : passage de la paroi des vaisseaux lymphatiques ; PP : migration aux plaques de Peyer. Les annotations proviennent de Tiberio *et al.*/et la Figure de Bachelierie *et al.* (Bachelierie *et al.*, 2014; Tiberio *et al.*, 2018)

2.2.4. Régulation des chimiokines

Finalement, les chimiokines elles-mêmes sont régulées. CXCL12 et CCL21 sont des chimiokines secrétées avec une queue C-terminale leur permettant de se fixer sur la matrice extracellulaire. On considère que les gradients de chimiokines non solubles résistent bien mieux au stress mécanique que les gradients solubles et que CXCL12 et

CCL21 sont fixées à la MEC in vivo (Shute, 2011; Tal *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2013). Pour CCL21, cette queue provoque son auto-inhibition, et la présence d'acide polysialic sur CCR7 est nécessaire à la levée d'inhibition (Kiermaier *et al.*, 2016). De plus les DC activées ont la capacité d'exprimer des protéases clivant la queue C-terminale de CCL21, devenant soluble. La capacité de CCL21 à induire une signalisation via CCR7 se modifie alors drastiquement (Schumann *et al.*, 2010) (Figure 10). CCL21 clivée est bien plus apte que CCL21 non clivée à induire la chimiotaxie des DC. Sa fixation n'induit pas le recrutement des Barrestines à la différence de CCL21 non clivée et de CCL19 (Hjortø *et al.*, 2016)(figure 9). En outre CCL21 non clivée induit une chimio-hapto-taxie, qui nécessite donc l'adhérence des DC au substrat (Schwarz *et al.*, 2017), contrairement à CCL21 clivée qui induit une chimiotaxie (Schumann *et al.*, 2010; Crijns, Vanheule and Proost, 2020). Certaines protéines sont aussi capables d'inhiber la fixation des chimiokines sur la MEC en interagissant physiquement avec elles, réduisant la chimiotaxie des DC. C'est le cas de TSG-6 vis-à-vis de CCL21 (Dyer *et al.*, 2016) mais aussi des protéines virales A41 vis-à-vis de CCL21 ou E163 vis-à-vis de CXCL12 & CCL21 (Crijns, Vanheule and Proost, 2020).

D'autres formes de régulation sont à noter. Certaines chimiokines peuvent se dimériser, c'est le cas par exemple de CXCL12. La formation de ces dimères faciliterait la formation de gradients en évitant la diffusion de cette chimiokine (Stephens and Handel, 2013). Les monomères et dimères de CXCL12 ont des fonctions communes (activation des MAPK) mais certains travaux suggèrent des différences, car seul CXCL12 monomère permet la chimiotaxie et le recrutement des Barrestines (Luo *et al.*, 2017).

En outre, la production des chimiokines est elle aussi régulée. CCL21 est produite, entre autres, par les LEC. Elle est stockée dans des vésicules sous membranaires et est sécrétée localement lors des contacts établis avec les DC (Vaahtomeri *et al.*, 2017). Ces points locaux de relargage permettent la migration des DC au travers des endothéliums. C'est un aspect « adhérent » de la migration des DC activées, pourtant considérées comme non adhérentes à la matrice extracellulaire. CCL21 est aussi

sécrétée et se fixe sur la matrice extracellulaire à proximité des LEC (Tal *et al.*, 2011). Son expression est induite au cours de l'inflammation au même titre que CXCL12 (Kabashima *et al.*, 2007) et CX3CL1 (Johnson and Jackson, 2013).

Certaines chimiokines induisent des signaux qui synergisent avec la signalisation via CCR7. C'est le cas par exemple de CXCL12 et CX3CL1. En outre, pour les pDC ont été décrites des synergies entre CXCR3 et CXCR4 (Krug *et al.*, 2002), mais aussi entre CXCR4 et CCR7 dans la rate (Umemoto *et al.*, 2012). De même, la signalisation via les ChR synergise avec des médiateurs lipidiques tels que le PAF, la PGE2, l'acide arachidonique (Sadik and Luster, 2012; Tiberio *et al.*, 2018) et LT β 4 (Del Prete *et al.*, 2007) pour favoriser la chimiotaxie des DC, notamment leur passage de l'endothélium lymphatique.

Finalement, des boucles de signalisation paracrines ont été décrites pour l'induction de synergie avec CCR7. C'est le cas par exemple de la production de CCL17, ou CCL19 par les DC matures (Stutte *et al.*, 2010).

CCL19: STRONG TEMPORARY SIGNAL	CCL21: WEAK PERSISTENT SIGNAL	taillless-CCL21: STRONG TEMPORARY RESTRICTED SIGNAL
Control of DC:T-cell scanning in LN - GAG binding, no reservoir +++ G-protein activation +++ β arrestin recruitment +++ Internalization +++ Chemotaxis	DC and T-cell LN homing +++ GAG binding, surface reservoir + G-protein activation + β arrestin recruitment + Internalization + Chemotaxis	More efficient DC LN homing when many DCs move together - GAG binding, no reservoir + G-protein activation - β arrestin recruitment +++ Chemotaxis

Figure 9 : Les ligands de CCR7 et leurs effets sur la signalisation. Les ligands de CCR7 n'ont pas le même effet sur la signalisation de ce ChR. On parle de « biais » de signalisation. La fixation de CCL19 induit une signalisation forte dans les DC, une activation forte des petites protéines G couplées au ChR, un recrutement des β arrestine et une internalisation. Cette internalisation aboutit à un recyclage de CCR7 à la membrane plasmique et à la mise en place efficace de la chimiotaxie. CCL21 avec sa queue C-terminale se fixe dans la MEC. Cette chimiokine induit une chimio-hapto-taxie assez peu efficace. CCL21 clivée partage la capacité de CCL19 pour induire la chimiotaxie. Figure issue de (Jørgensen, Rosenkilde and Hjortø, 2018).

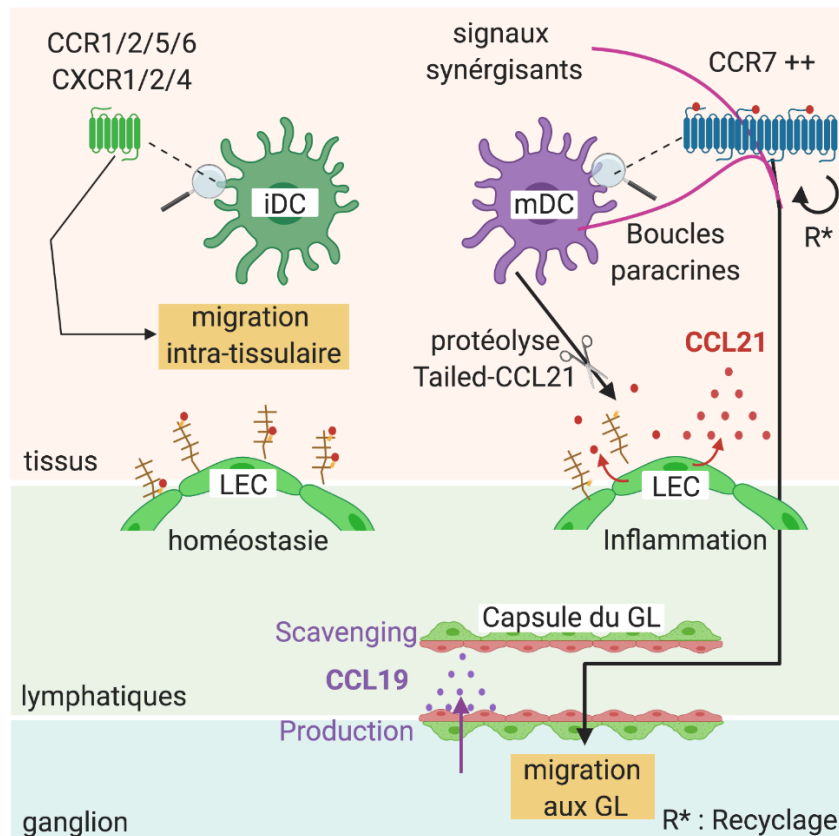


Figure 10 : Régulation des chimiokines et chimiorécepteurs. Les DC immatures migrent dans les tissus et expriment de nombreux ChR. Leur maturation induit leur reprogrammation fonctionnelle. Elles sont alors capables de cliver la queue C-terminale de CCL21 augmentant ainsi leur capacité de chimiotaxie envers les LEC. De plus, elles sécrètent des chimiokines, et d'autres molécules, dont la fixation à leur récepteur induit une signalisation en synergie avec celle de CCR7. Ces synergies sont complétées par des facteurs locaux, notamment lipidiques. Finalement CCR7 oligomérisé détecte les gradients de CCL21 et CCL19 maintenus dans les tissus, et la capsule des GL, par la fonction des ChR atypiques. Inspirée de (Tiberio *et al.*, 2018)

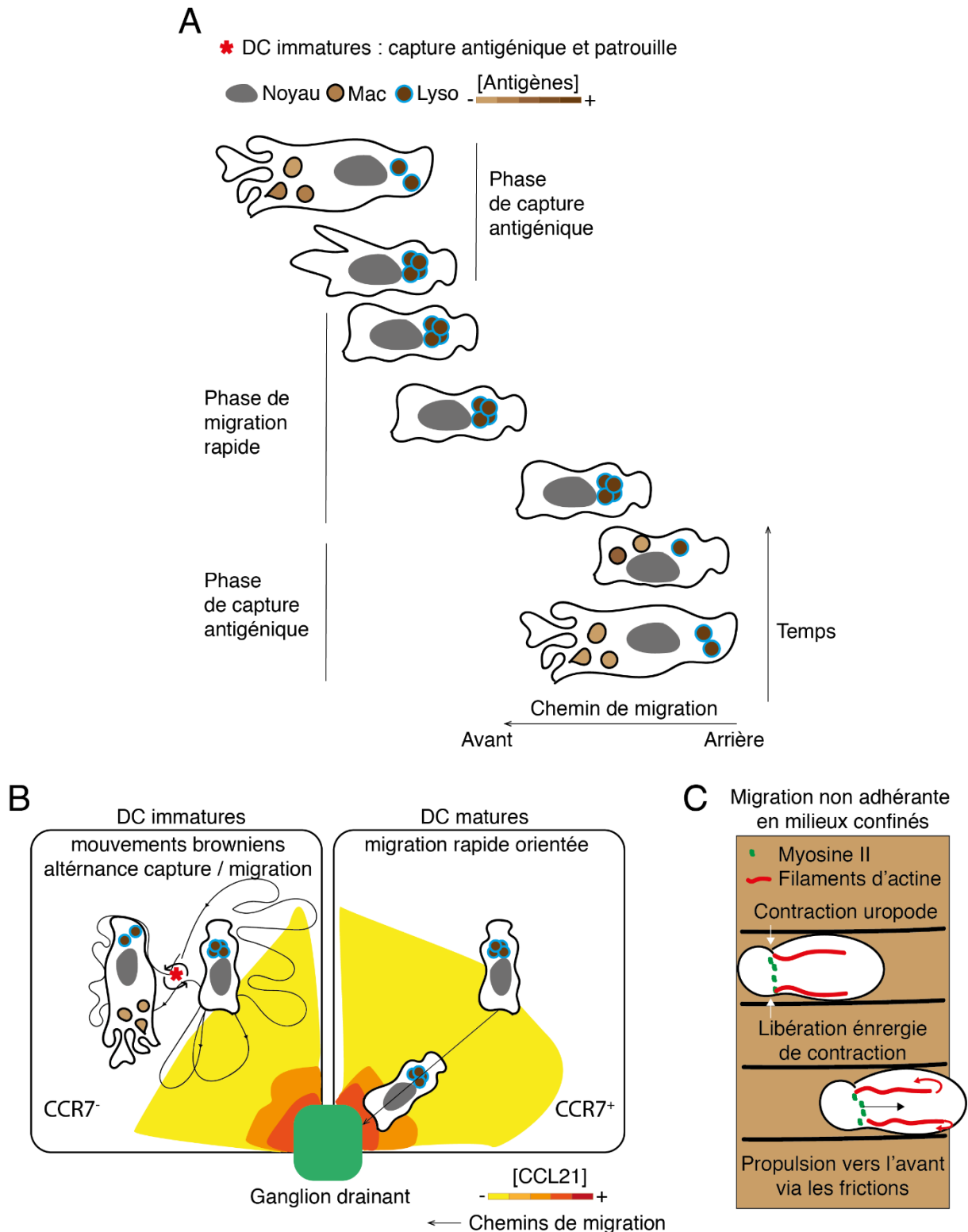


Figure 11 : Les régimes de migration des DC immatures et matures. A) Les DC immatures dans les tissus présentent une migration alternant des phases de capture antigénique associées à une vitesse lente et des phases de migration rapide sans capture antigénique. Dans la cellule sont retrouvés plusieurs structures. A l'avant, les macropinosomes (Mac) se chargent de liquide. Leur concentration en antigènes est similaire à celle du milieu. Orientés vers l'arrière lors des rétractations de la membrane à l'avant, ces endosomes mûrissent et fusionnent avec des lysosomes (Lyso) augmentant la concentration antigénique. En effet, la fusion de plusieurs

macropinosomes au sein d'une même vésicule augmente localement la concentration des antigènes. B) Les DC dans les tissus adoptent deux modes de migration selon leur état de maturation. Les DC immatures migrent de manière non orientée selon les contraintes physico-chimiques de leur milieu. L'alternance entre macropinocytose et migration rapide est représentée plus en détails en A). Les DC matures migrent de manière soutenue et rapide en direction des gradients de chimiokines (ici CCL21) vers les GL. C) Représentation schématique de la migration non adhérente des DC. La contraction de l'uropode à l'arrière génère, via la myosine II A, une force. La relaxation de cette tension génère une énergie cinétique entraînant le cytosol de la cellule vers l'avant. Les forces de friction aident à transmettre cette énergie et sont essentielles à la migration en milieu confiné. Le [] représente une concentration. A, B) adapté de (Bretou *et al.*, 2016). C) adapté de (Chugh and Paluch, 2018)

2.3. Rôle et régulation de la polymérisation d'actine

Du fait de sa nature extrêmement malléable, contractile et dynamique, l'actine est à la base de la motricité des DC. C'est le contrôle fin de sa nucléation qui permet aux DC de moduler leurs capacités migratoires. Les DC sont des cellules dont la forme change, mais dont la symétrie et la polarisation sont fortement contrôlées. La polarité des DC est maintenue via la formation de deux stocks d'actine, un à l'avant, retrouvé principalement dans les DC immatures, et un à l'arrière, retrouvé avant et après maturation des DC (Vargas, Maiuri, *et al.*, 2016). Le stock à l'avant, responsable de la formation de vésicules de capture antigénique telles que les macropinosomes et les phagosomes, est composé d'actine dont les filaments sont organisés en réseaux « branchés ». Cette organisation est médiée par l'action de Arp2/3, elle-même activée par la Rho-GTPase CDC42 et par WAVE et associée à la Myosine II A, un moteur moléculaire générant des forces de traction (Figure 12). Finalement, la taline permet de connecter les filaments d'actine aux protéines membranaires telles que les intégrines pour transmettre les forces de traction (Sun, Guo and Fässler, 2016). La dissociation des filaments rend disponible l'actine monomérique qui est transportée vers l'arrière de la cellule.

A l'arrière, le second stock d'actine est composé de filaments d'actine parallèles (Figure 12). Associé avec la Myosine II A, ce stock d'actine est connu pour former des structures hyper contractiles (uropodes, Figure 11C) associées avec la migration rapide (Cramer,

2010). Ce phénomène a pour conséquence d'induire l'afflux d'actine monomérique mais aussi de Myosine II A vers l'arrière de la cellule. La nucléation des filaments long d'actine est médiée par la formine mDia1, activée par RhoA (Figure 12) (Vargas, Maiuri, *et al.*, 2016). Fonctionnellement, le stock arrière aide à propulser le cytoplasme des DC vers des zones pour lesquelles aucune structure cellulaire organisée n'est orientée (Bear and Haugh, 2014). Dans des environnements confinés, les frictions permettront d'induire la migration.

Ainsi, la polymérisation des réseaux d'actine permet de répondre aux gradients de chimiokines et de contrôler la vitesse de migration. Voyons plus en avant les acteurs régulant ces stocks d'actine.

2.3.1.1. *Arp2/3 : branchements*

Arp2/3 forme, avec d'autres acteurs, un complexe protéique dont la fonction est de promouvoir la nucléation des filaments d'actine à partir de filaments préexistants, d'où le développement de filaments de type branchés (Figure 12) (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). Arp2/3 est connu pour se localiser à l'avant de la cellule et sa délétion rend la migration des DC immatures plus persistante, donc plus rapide (Vargas, Maiuri, *et al.*, 2016). La délétion de WAVE donne les mêmes résultats (Leithner *et al.*, 2016). Arp2/3 est donc un complexe essentiel pour la locomotion dépendante des molécules fixées sur la MEC ainsi que la capture antigénique, mais pas pour la migration orientée rapide (Rotty *et al.*, 2017). En outre, Arp2/3 est capable de se relocaliser au niveau du noyau (Thiam *et al.*, 2016). Cette localisation autorise une compression de la forme du noyau, permettant à la cellule de se mouvoir dans des environnements très confinés.

2.3.1.2. *Formines*

Les formines sont des protéines capables de promouvoir la nucléation de filaments d'actine à partir de monomères. Leurs fonctions sont dépendantes de la cofiline dont le rôle est de stabiliser les filaments nouvellement produits. Parmi les 15 isoformes de formines, certains ont préférentiellement été associés avec la nucléation d'actine

nécessaire *in vivo* pour développer les filopodes. Les filopodes sont des digitations produites par la cellule, qui pourraient servir, dans le cadre de la migration non adhérente, à amplifier les frottements avec le milieu. Parmi ces protéines, la *Drosophila* gene Diaphanous 1 (mDia1) est la plus étudiée dans les cellules immunitaires. Située à l'arrière de la cellule, mDia 1 contrôle la nucléation parallèle des filaments permettant la mise en place d'une migration rapide. Avec la Rho-associated protein kinase (ROCK), mDia1 est l'un des deux effecteurs majeurs médiant les effets de Rho dans la cellule. L'inhibition de Rho inhibe l'adhésion et la chimiotaxie des cellules (Allen *et al.*, 1998; Nobes and Hall, 1999). En accord avec ces observations, la délétion de mDia1 dans les LT diminue leur capacité à migrer envers CXCL12 et CCL21 (Eisenmann *et al.*, 2007; Sakata *et al.*, 2007).

2.3.1.3. *Myosine II A : moteur moléculaire*

La myosine II A, est une super structure protéique dont le rôle est de fixer les filaments d'actine. Parmi les trois isoformes de non-muscle myosin II exprimés chez les mammifères, l'isoforme II A est la plus exprimée dans les cellules immunitaires (Maravillas-Montero and Santos-Argumedo, 2012). Une fois fixée, via l'hydrolyse d'ATP, elle est capable d'appliquer une force de tension dans les filaments. A l'arrière de la cellule, elle participe au développement des forces de propulsion et à la création du flux rétrograde d'actine. La mise en tension du cortex arrière d'actine conduit la cellule à migrer vite et à changer peu de direction (Maiuri *et al.*, 2015). A l'avant de la cellule, la myosine II s'associe aux contours des phagosomes et des macropinosomes. Elle permet leur formation et leur fermeture. Structurellement, la myosine II, fonctionne en hétéro-hexamères. Classiquement deux chaînes lourdes s'associent. Chaque chaîne lourde est composée d'une tête (la non-muscle Myosin II A (NM IIA)), d'un cou composé de deux protéines, l'essential light chain (ELC) et la protéine régulatrice MLC et d'une queue dite coil-coil (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009; Barger, Gauthier and Krendel, 2020). Chaque chaîne est retrouvée sous deux formes, une forme inactive

repliée sur elle-même et une forme activée à la suite de la phosphorylation des protéines MLC. De nombreuses kinases, telles que les myosin light chain kinase (MLCK), sont capables de phosphoryler les MLC. Les MLCK sont, entre autres, activées par la calmoduline, dépendante des concentrations calciques dans le cytosol. Pour finir, les chaînes activées s'associent en formant des structures bipolaires. Cette association permet, lorsque les chaînes lient l'actine, de faire glisser les filaments les uns par rapport aux autres. La blebbistatine inhibe l'activité ATPase de la myosine II et son utilisation permet d'inhiber la capacité des phagocytes à capturer les antigènes et de réduire leur migration en association avec l'inhibition de Arp2/3 (Rotty *et al.*, 2017).

2.3.1.4. *Modulation de la localisation de la myosine II A*

Deux processus s'opposent donc dans les DC immatures. Dans ces cellules, l'inhibition locale de la myosine II A à l'avant de la cellule suffit à augmenter la vitesse de migration des DC immatures (Chabaud *et al.*, 2015). Ceci donne à penser que l'actine est nucléée à l'avant de la cellule, mais qu'il suffit que ce mécanisme soit inhibé pour permettre la nucléation d'actine à l'arrière. Mais alors, comment la myosine II A dans les DC immatures est-elle détournée vers l'avant des DC ? Un élément de réponse réside peut-être dans son interaction avec CD74 (Ii) (Faure-André *et al.*, 2008), une protéine chaperonne qui stabilise les molécules de CMH II néo synthétisé lors de son adressage dans les endosomes. En effet, *in vivo*, la délétion de CD74 (Ii^{ko}) dans les DC augmente leur migration aux GL au cours d'inflammation aigue. A l'homéostasie, les DC Ii^{ko} sont présentes en nombre similaire aux DC WT dans les GL, mais elles ont un phénotype plus activé que les WT. En outre, cette étude s'intéresse aussi à la cathepsine S (CatS^{ko}), une enzyme dont la fonction est de cliver Ii, donc d'en réduire la quantité dans les endosomes. La délétion de CatS réduit la migration des DC *in vivo* et leur chimiotaxie en chambre de transwell. Il est intéressant de noter que la migration en chambre de transwell n'est réduite que lorsque les puits sont tapissés de collagène. Cela laisse penser que l'impact de Ii sur la migration des DC passe par l'augmentation des

capacités de migration chimio-hapto-taxique. Finalement, les DC Ii^{ko} ont une exploration, mais pas une vitesse, significativement réduite *in vivo* lors de l'exploration des tissus (Moreau, Blanch-Mercader, *et al.*, 2018).

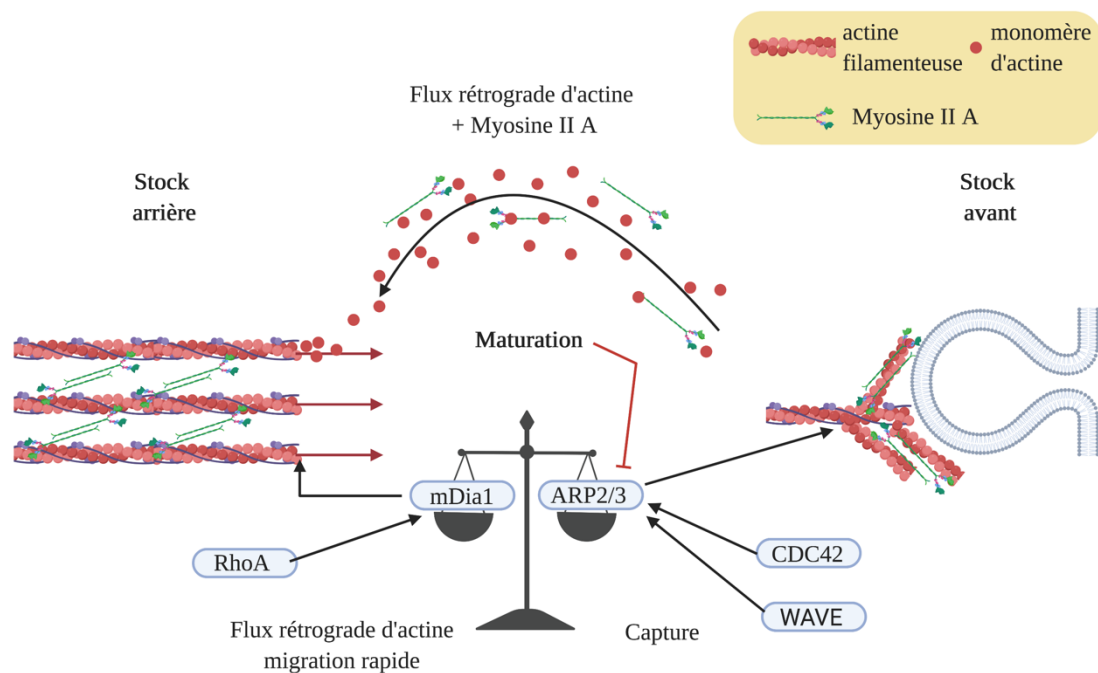


Figure 12 : Compétition pour l'actine monomérique via les petites protéines G. De gauche à droite. Les formines (mDia1) génèrent à l'arrière de la cellule une nucléation d'actine de-novo. Ces filaments parallèles associés à la contraction induite par la Myosine II A établissent un flux constant d'actine monomérique et de myosine II A vers l'arrière. A l'avant, Arp2/3 régulé par CDC42 et WAVE promeut la nucléation d'actine à partir de filaments mère formant un réseau branché. La tension appliquée dans ces réseaux entraîne la formation et la fermeture des vésicules d'endocytose. C'est la dépolymérisation de ce réseau qui fournit l'actine monomérique à l'arrière. Le réseau arrière promeut la migration rapide et favorise la chimiotaxie, le réseau avant favorise la capture antigénique et l'haptotaxie. Figure inspirée de (Vargas, Maiuri, *et al.*, 2016)

Nous avons donc vu en parallèle quels sont les facteurs importants pour la chimiotaxie des DC et la régulation du cytosquelette d'actine et la création des forces permettant aux DC de se propulser. Dans le chapitre suivant nous verrons plus spécifiquement la signalisation induite dans les DC en réponse à l'engagement de CCR7 et CXCR4 par

leurs chimiokines. Nous allons voir en quoi ces mécanismes sont dépendant de la signalisation calcique.

3. Importance du calcium pour la migration des DC et mécanismes associés

3.1. Signalisation via les ChR

Le calcium est un des seconds messagers impliqués dans la transduction du signal en aval des récepteurs de chimiokines. Pour comprendre les mécanismes qui y sont associés, décryptons d'abord la signalisation associée aux GPCR. Les protéines G associées aux GPCR forment un complexe hétérotrimérique composé des sous unités $\alpha\beta\gamma$. Leur activation correspond à trois états fonctionnels du GPCR. Lorsque non fixé par son ligand, le récepteur est inactif. Il est lié avec les protéines G $\alpha\text{-}\beta\gamma$, la sous unité α étant associée avec un GDP (Schwartz *et al.*, 2006). La fixation de la chimiokine induit une modification de la conformation et permet à une Guanine nucleotide exchange factor (GEF) d'échanger le GDP pour un GTP (récepteur à l'état intermédiaire). Finalement, la sous unité $\alpha\text{-GTP}$ et les sous unités $\beta\gamma$ se dissocient du récepteur (Récepteur actif). $\beta\gamma$ restent associées entre elles (O'Hayre *et al.*, 2008). Il existe 4 classes majeures de protéine G dites protéines $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ $G\alpha_q\text{-}11$ et $G\alpha_{12\text{-}13}$ (Figure 13), qui présentent des fonctions distinctes (Wu, 2005).

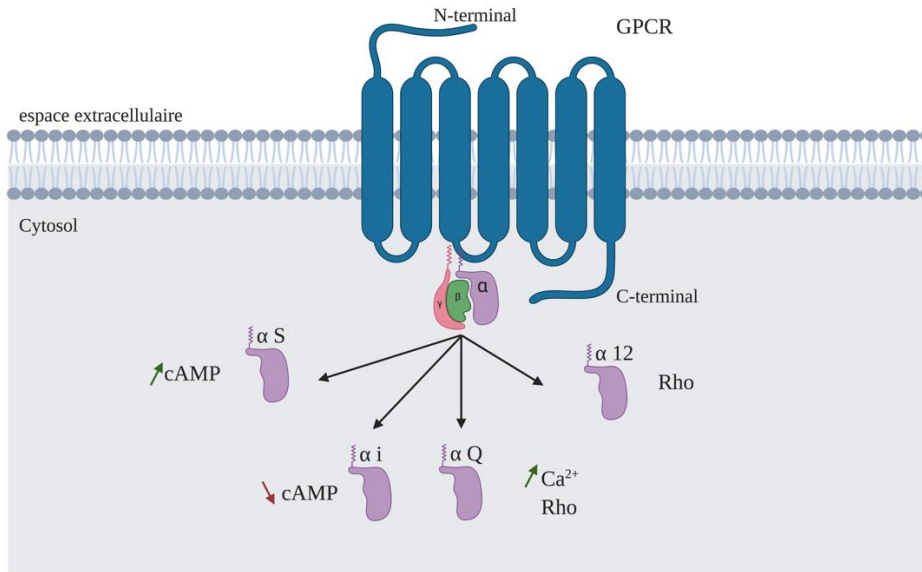


Figure 13 : Intégration du signal des GPCR via les différentes protéines G associées. En haut, représentation schématique d'un GPCR. Fixées sur la seconde boucle cytoplasmique de ce GPCR, les sous unités α - β γ de la protéine G associée. On différencie 4 grandes familles de protéines G associées aux GPCR. Les noms et fonctions principales associées aux différentes familles sont représenté en bas. Une flèche verte vers le haut représente une augmentation, une flèche rouge vers le bas une diminution. Les sous unités $G\alpha_q$ -11 et $G\alpha_{12}$ -13 activent Rho. Figure originale.

Fonctionnellement, les protéines $G\alpha_s$ stimulent la production d'AMP cyclique (AMPc) par l'adenylate cyclase. Par suite, l'AMPc active la protéine kinase A (PKA). La PKA est associée au relargage de Ca^{2+} depuis le réticulum sarcoplasmique dans le muscle. Les protéines $G\alpha_i$, elles, inhibent l'adenylate cyclase. Elles activent en outre la protéine kinase C PKC, la PI3K et Akt. Les protéines $G\alpha_q$ promeuvent la formation de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycerol (DAG). Cela a pour conséquence d'induire une augmentation majeure du calcium cytosolique. Les protéines $G\alpha_{12}$ activent RhoA et impactent ainsi directement la migration (Liu and Shi, 2014). Dans le système immunitaire, l'association des ChR se fait majoritairement avec les $G\alpha_i$, q et 12 (Thelen and Stein, 2008). L'association avec les $G\alpha_q$ dans les DC est particulièrement étudiée pour CCR7 et CXCR4 (Shi *et al.*, 2007).

3.1.1. L'exemple de CCR7

Nous nous intéresserons ici à décrypter les voies de signalisation activées en aval de la fixation de CCL21/CCL19 à leur récepteur CCR7. Dans l'ensemble sont décrits trois grands effets de la signalisation via CCR7 : la survie, la chimiotaxie et la mobilisation du cytosquelette d'actine. La régulation de ces processus repose sur trois modules de signalisation fortement indépendants (Rodríguez-Fernández and Criado-García, 2020) : la voie **PI3K / Akt** (survie et chimiotaxie), la voie des **MAPK** (chimiotaxie) et la voie **RhoA/src/pyk2** (vitesse de migration).

Suite à l'activation du ChR, l'unité $\beta\gamma$ des protéines $G_{\alpha i}$ induit une signalisation aboutissant à la phosphorylation de la PI3K (Figure 14). Les DC matures placées dans un milieu de culture dépourvu de sérum meurent rapidement, l'ajout de CCL19 et CCL21 diminuent l'apoptose de ces DC, et l'inhibition de la voie PI3K annule les effets de ces chimiokines sur l'apoptose. La voie de la PI3K induit l'activation de la protéine Akt. En retour, Akt inhibe les protéines pro-apoptotiques GSK3 β et FOXO3. Cela favorise la survie des DC de deux manières. Premièrement, cela stoppe l'induction de Bim, protéine pro apoptotique de la famille de BCL2. Deuxièmement, l'inhibition de GSK3 β permet la translocation nucléaire de NF κ B, et la transcription de gènes anti-apoptotiques (BCL_{XL}) (Escribano, Delgado-Martín and Rodríguez-Fernández, 2009). En parallèle, Akt favorise la traduction de mTORC1, protecteur contre l'apoptose, en induisant l'inhibition de eIF-4E. Les différents isoformes d'Akt semblent impacter différemment les DC. Akt1 serait impliqué dans la survie des DC (Park *et al.*, 2006; Escribano, Delgado-Martín and Rodríguez-Fernández, 2009) et Akt2 dans la chimiotaxie (Bhandaru *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014). A ce titre, la délétion de la PI3K réduit la survie des DC traitées par CCL19 ou 21, mais réduit aussi leur chimiotaxie, dans une moindre mesure. Cependant, malgré ses off-targets nombreux, le Y294002, inhibiteur de la PI3K (Arrowsmith *et al.*, 2015) n'inhibe pas compétemment la migration des DC envers CCL19. L'inhibition de la PI3K inhibe aussi fortement la macropinocytose des DC (Canton *et al.*, 2016; Doodnauth, Grinstein and Maxson, 2019).

Dans ces études, (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2004; Riol-Blanco *et al.*, 2005) les auteurs décrivent finement un deuxième axe dépendant des $G_{\alpha i}$. Cet axe est dépendant des MAPK p38/ERK (nécessaires toutes les deux) et induit la phosphorylation activatrice de JNK, favorisant la chimiotaxie. Il est à noter que CCL21 non clivée est plus efficace pour induire l'activation de ERK1/2 que CCL19. En outre CCL21 clivée ressemble à CCL19 quant à ses effets sur la migration des DC, mais ressemble à CCL21 non clivée pour l'activation de ERK.

Finalement, CCR7 signalerait aussi selon une modalité $G_{\alpha i}$ indépendante (non sensible à la toxine pertussique), probablement via les $G_{\alpha 12}$, et régulerait la vitesse de migration des DC en activant RhoA, Pyk2 (López-Cotarelo *et al.*, 2015) et la cofiline (Riol-Blanco *et al.*, 2005; Rodríguez-Fernández and Criado-García, 2020) (Figure 14). Shi et collaborateurs (Shi *et al.*, 2007) ont identifiés dans les DC et les neutrophiles, un mode de signalisation de CCR7 et CXCR4 fonctionnellement lié à la régulation de l'expression de CD38 et impactant la chimiotaxie. Cet axe est dépendant des protéines $G_{\alpha q}$. Ces résultats sont en contradiction avec des études menées dans des cellules HEK, démontrant une signalisation de CCR7 via les $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha o}$, mais pas les $G_{\alpha q}$ (Corbisier *et al.*, 2015).

3.1.2. Intégration du signal chimiokinique, lien avec le Ca^{2+}

Un aspect important de la signalisation chimiokinique est son lien direct avec la régulation des flux calciques. En plus de la relation directe possible des sous-unité $\beta\gamma$ avec les canaux calciques membranaires (Khan *et al.*, 2013), la signalisation calcique déclenchée par les ChR est induite par la production d'IP3. En effet, les $G_{\alpha i}$ mais aussi les $G_{\alpha q}$ sont capables d'activer les phospholipases C Beta (PLC β) dont le rôle est d'hydrolyser le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en IP3 et DAG (Figure 14). On compte 4 isoformes de PLC β chez les mammifères, les PLC β (1a-b, 2a-b, 3 et 4a-b) (Lyon and Tesmer, 2013). Les a-b sont des variants de d'épissage, les 1,2,3,4 sont des isoformes codés par les gènes du même nom. Si les relation $G_{\alpha i}$ / q sont bien

démontrés avec les PLC β 1,3 ($G\alpha_q$) et 2 ($G\alpha_i$), la PLC β 4 n'a pour le moment pas été mise en lien avec la migration dans les DC. Cependant, elle est considérée comme étant en interaction directe avec la PLC β 3 et des mutations gain de fonction de la PLC β 4 sont associées avec le mélanome uvéal chez l'Homme (Johansson *et al.*, 2016). En outre, ici encore la macropinocytose entre en jeu avec des partenaires associés. En effet, elle peut être dépendante d'une signalisation calcique et impliquer les PLC β (Schlam and Canton, 2017).

L'IP $_3$ dans la cellule se fixe à son récepteur situé sur le réticulum endoplasmique L'IP $_3$ -récepteur (IP $_3$ R) dont nous détaillerons la fonction dans le chapitre suivant.

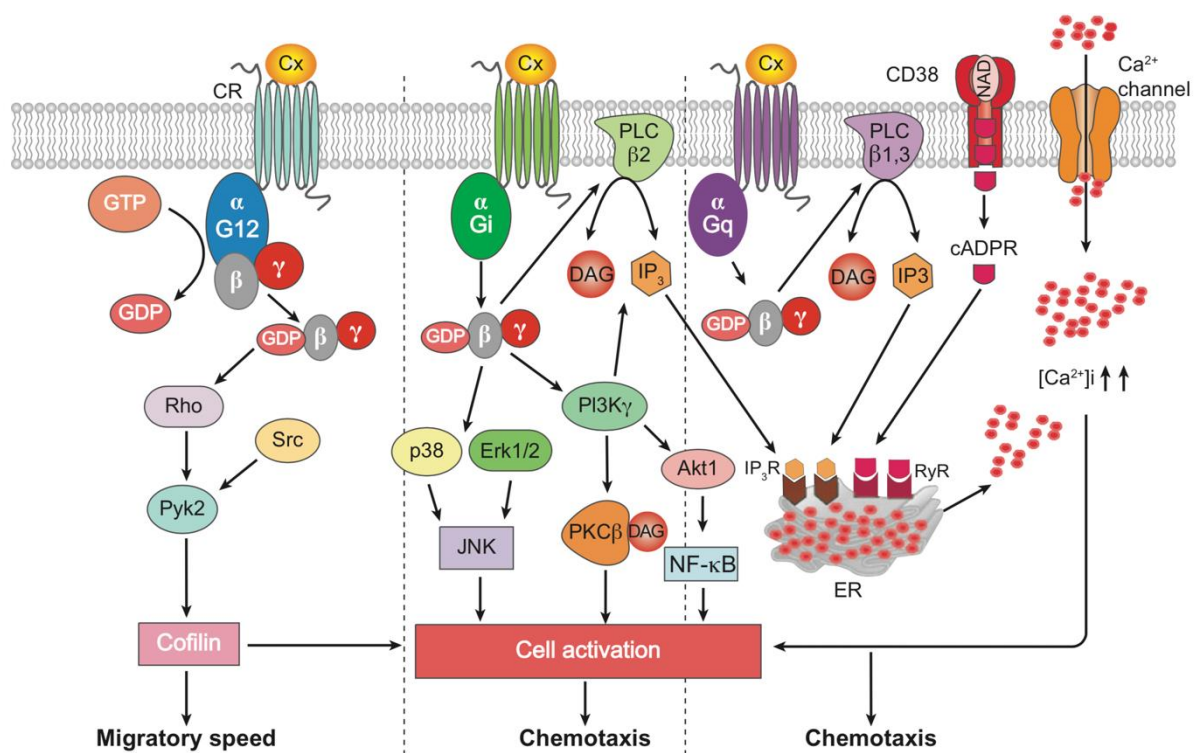


Figure 14 : Intégration du signal chimiokinique et lien avec le calcium dans les DC en réponse à CCL21. Trois axes majeurs sont décrits pour la signalisation médiée par CCR7. Deux axes dépendants des protéines $G\alpha_i$, sensibles à la toxine pertussique activent respectivement la PI3K et les MAPK p38, ERK et JNK. Un troisième axe induit une signalisation calcique via les $G\alpha_q$ et la production d'IP $_3$ par les PLC β . L'IP $_3$ se fixe aux IP $_3$ R du RE et déclenche un relargage de Ca^{2+} des stocks réticulaires. Un dernier axe insensible à la toxine pertussique signale via les $G\alpha_{12}$ et module la vitesse de migration. Figure issue de (Randolph, Ochando and Partida-Sánchez, 2008).

3.2. Régulation de l'influx calcique.

L'étude des flux calciques dans les DC est complexe. Les variations de concentration de Ca^{2+} cytosolique peuvent résulter de plusieurs flux, le Ca^{2+} pouvant venir de l'extérieur ou des organelles vers le cytosol. Le calcium est le cation divalent possédant la plus importante différence de gradient électrochimique entre le milieu extracellulaire et l'intérieur des cellules, les concentrations cytosoliques étant en moyenne 10.000 à 25000 fois plus faibles que celles du milieu extracellulaire. C'est pourquoi l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules est contrôlée par l'ouverture et la fermeture de canaux passifs perméables au Ca^{2+} . Cependant, cette entrée massive génère rapidement une dépolarisation membranaire suffisante pour inhiber l'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol. L'entrée calcique est aussi négativement contrôlée par l'ouverture de canaux induisant une dépolarisation forte de la membrane en induisant l'entrée de Na^+ . Parmi ces canaux, les plus étudiés dans le système immunitaire sont TRPM4 (Barbet *et al.*, 2008) et TRPM2. Les flux calciques sont maintenus par l'activation de canaux voltage-dépendant générant un efflux, principalement de potassium (K^+), favorisant, une hyper polarisation de la membrane et la continuité de l'entrée calcique. Mais d'autres processus entrent en jeu. Par exemple, le Ca^{2+} est activement exclu des cellules par l'action des canaux échangeurs de Na^+/Ca^+ (NCX) et une altération de leur fonction augmente la concentration de Ca^{2+} cytosolique (Yan *et al.*, 2015). Ce processus est fortement augmenté dans les DC traitées par les glucocorticoïdes (GC) via l'induction de l'expression des NCX3 (Heise *et al.*, 2011). En outre, le Ca^{2+} est activement pompé dans les organelles. En particulier, la sarcoendoplasmatic Ca^{2+} -ATPase (SERCA), exprimée à la surface du réticulum endoplasmique (RE) capture le Ca^{2+} cytosolique et le stocke dans le RE. La délétion ou l'inhibition de fonction de la pompe SERCA augmente la migration des DC (Hong *et al.*, 2016).

Le Ca^{2+} joue un rôle majeur sur la vitesse de migration / chimiotaxie des cellules (Wei *et al.*, 2012) et notamment des DC (Sáez *et al.*, 2018). L'entrée calcique dans le cytosol des cellules est issue de deux compartiments. L'entrée de Ca^{2+} depuis l'extérieur de la

cellule est médiée par l'ouverture de canaux situés sur la membranes plasmique (Figure 15). Ces canaux s'ouvrent en réponse à des ligands (*e.g.* P2X7 lie l'ATP), le stress mécanique (Piezo1) ou à des changements de température (TRPV). L'autre entrée de Ca^{2+} dans le cytosol provient de la vidange des organites, et notamment du RE (Figure 15). Compte tenu de sa liaison directe avec la signalisation des ChR, nous détaillerons plus en avant la vidange du Ca^{2+} réticulaire et son effet sur la migration dans la partie suivante.

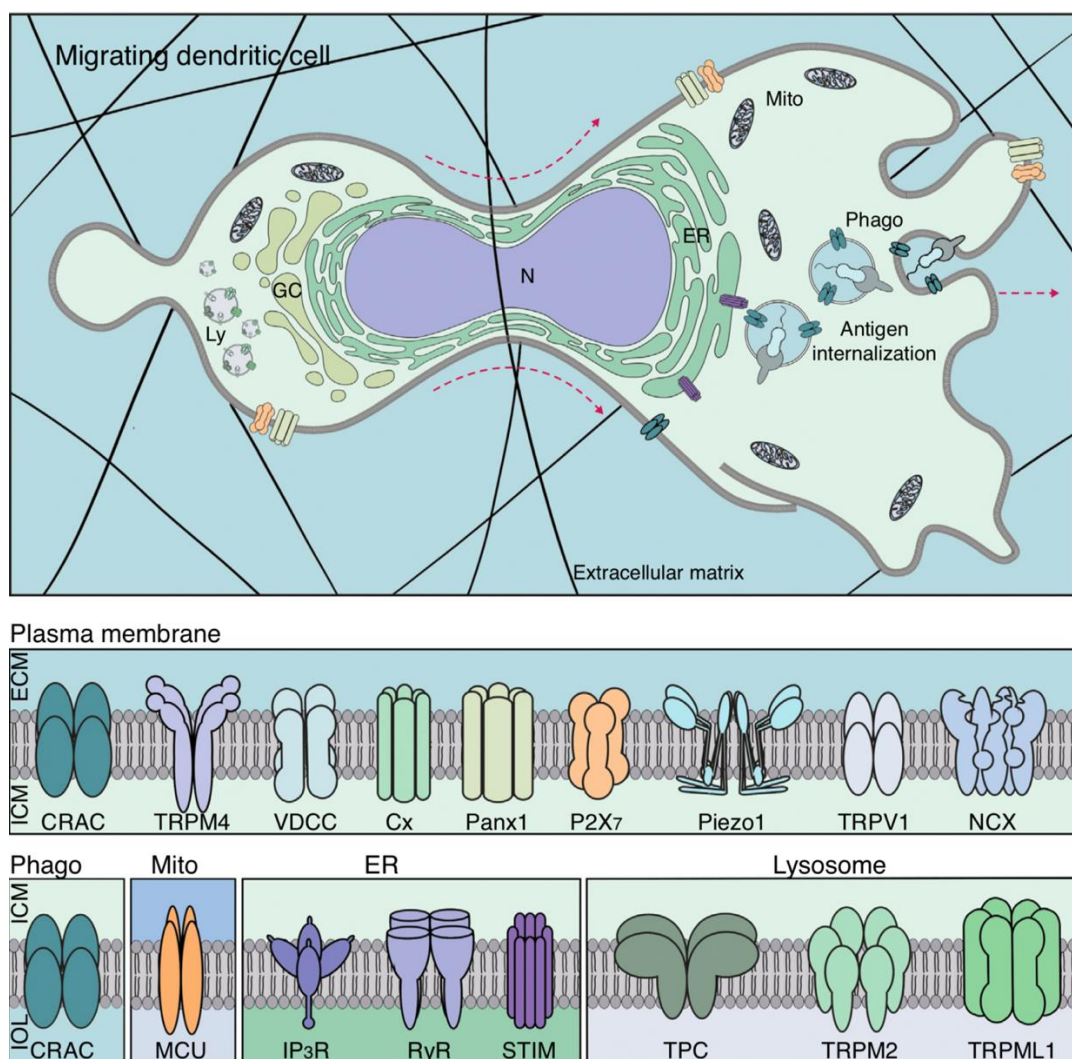


Figure 15 : Canaux calciques ayant une importance pour la migration des DC. Les canaux sont représentés dans la membrane de l'organe à laquelle ils sont associés. Phago : Phagosomes ; Mito : mitochondries ; Lyso : Lysosomes ; N : noyau ; GC : appareil de golgi. Figure issue de (Sáez *et al.*, 2018)

3.3. Reticulum endoplasmique et Store Operated Calcium Entry (SOCE)

Le SOCE est un flux qui couple deux stocks calciques, à savoir le stock intra-RE et le stock extracellulaire. En effet, la signalisation via les ChR et les protéines $G\alpha_i$ ou $G\alpha_q$ va stimuler la production d'IP3 ou d'ADP-ribose cyclique (cADPR). Ces seconds messagers vont provoquer la vidange des stocks calciques du RE et, par suite, l'ouverture de canaux calciques membranaires. Le RE vidange son calcium principalement via la fixation de deux familles de récepteurs : 1) Les récepteurs à la ryanodine (RyR), activés notamment par la fixation de cADPR (synthétisée et hydrolysée par CD38 à partir du NAD^+) ou du cAMP. CD38 (Malavasi *et al.*, 2008) et les RyR sont exprimés dans les DC mais leur rapport à la migration de ces cellules reste peu documenté et 2) les IP3R.

3.3.1. IP3R

Les IP3R sont parmi les plus gros canaux ioniques connus chez les vertébrés et possèdent une conductance importante, permettant à un petit nombre de récepteurs de vidanger efficacement le RE (Prole and Taylor, 2019) (Figure 16). C'est une famille de récepteurs composée de trois membres ; à savoir l'IP3R1, 2 et 3. On considère que l'affinité des IP3R pour l'IP3 varie avec : $IP3R2 > IP3R1 > IP3R3$ (Iwai *et al.*, 2007). Dans les DC, tous les IP3R sont exprimés. Il semble que ces récepteurs soient au centre de la régulation de migration des DC car la chélation du Ca^{2+} extracellulaire ne réduit pas la migration des DC d'avantage que ne le fait l'inhibition de leur expression par des ARN interférents (Solanes *et al.*, 2015). Par ailleurs, dans les DC immatures, la délétion des IP3R réduit la vitesse de migration, mais la seule la délétion de l'IP3R1 réduit la persistance de migration, c'est-à-dire que ces cellules migrent moins longtemps en ligne droite dans des expériences de migration *in vitro*. Les auteurs concluent ici que la vitesse de migration et la persistance sont des mécanismes à part entière et qu'ils pourraient être régulés de manière différente par les différents isoformes d'IP3R. Finalement, sur la base d'études menées dans des cellules canines (Hours and Mery,

2010), les auteurs confirment que IP3R1 interagit physiquement avec la Myosine IIA et que ce récepteur module particulièrement la phosphorylation des MLC. Cela a pour effet de réduire la migration malgré une bonne contraction de la Myosine IIA. Les auteurs concluent que l'IP3R1 joue un rôle central dans la régulation de la migration des DC immatures. Ce récepteur aiderait au couplage fonctionnel de la localisation de la myosine IIA avec la migration rapide et agirait en relarguant le Ca^{2+} du RE. En parallèle, d'autres travaux montrent que l'inhibition des IP3R réduit la chimiotaxie des DC matures mais pas des immatures (Yang *et al.*, 2014). Ces études montrent que Akt2 est essentielle pour la chimiotaxie des DC activées envers CCL21, et que la délétion d'Akt2 diminue l'expression de l'IP3R2 spécifiquement. En outre, la délétion d'Akt2 inhibe partiellement l'acidification du pH cellulaire, pouvant amener à une présentation antigénique altérée (Bhandaru *et al.*, 2012). Finalement, il est à noter que BCL-2 interagit directement avec les IP3R pour inhiber leurs fonctions (Rong *et al.*, 2009; Monaco *et al.*, 2012). Les IP3R contrôlent donc la chimiotaxie des DC matures et régulent la vitesse de migration des DC immatures.

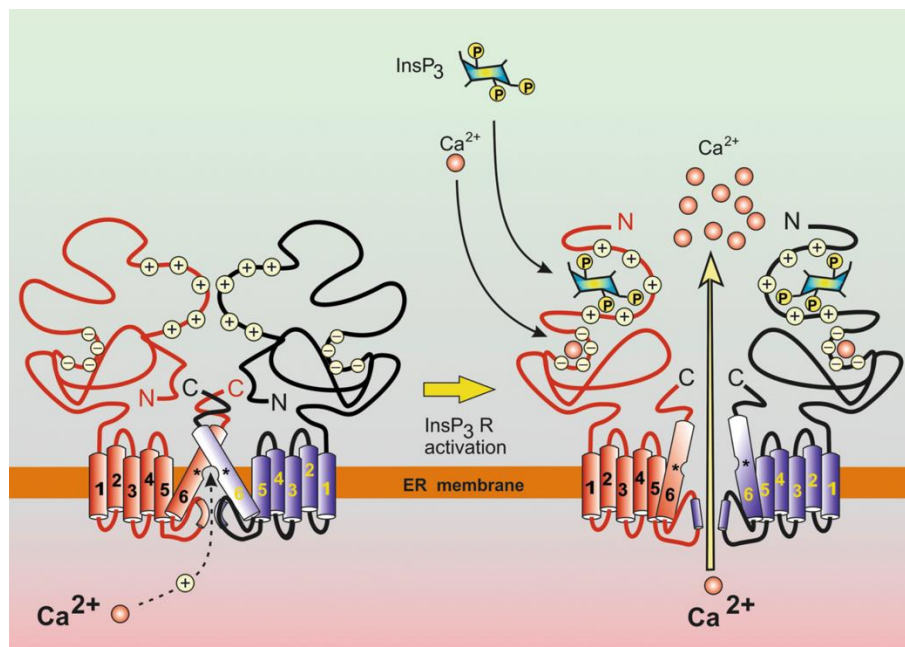


Figure 16 : Structure simplifiée des IP3R à la surface du RE. Les IP3R sont des protéines transmembranaires de la membrane du RE. Elles fixent de l'IP3 et du Ca^{2+} au niveau de leur partie cytosolique. Cette fixation induit l'ouverture du canal. Figure issue de (Berridge, 2016).

3.3.2. ORAI

Les canaux « Calcium release-activated calcium channel proteins » (CRAC, constitués des protéines ORAI) (Feske *et al.*, 2006; Prakriya and Lewis, 2006) sont une des portes d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules. Ce sont des canaux calciques de la membrane plasmique qui fonctionnent en homo / hétéro-tétramères (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2008). La structure cristallographique décrit, elle, une structure hexamérique mais dont la crédibilité *in vivo* reste discutée (Hou *et al.*, 2012; Yen and Lewis, 2019). On retrouve trois isoformes d'ORAI à savoir ORAI1, 2 et 3. Une majorité des protéines ORAI1 (60%) est retrouvée dans les espaces sous membranaires à l'homéostasie (Hodeify *et al.*, 2012). Après induction d'un stress réticulaire via un traitement à la thapsigargine, la majorité de ces protéines se retrouve localisée à la membrane plasmique. Les courants qu'ils génèrent sont bien caractérisés dans les LT (Courants I_{crac}) (Alansary *et al.*, 2014; Lewis, 2020). Ils sont ouverts lors de la vidange du RE via leur interaction avec des protéines associés à la membrane de cet organite. Transcriptionnellement, les niveaux d'ORAI1 sont contrôlés négativement par Ampk. Les DC délétées en Ampk ont une meilleure chimiotaxie envers CXCL12 mais pas envers CCL21 (Nurbaeva *et al.*, 2012) (Tableau 1). De plus, ORAI1 est glycosylé et ces modifications peuvent influencer sa fonction (Hogan, Lewis and Rao, 2010). ORAI1 est stabilisé à la membrane plasmique par l'action d'une protéine induite en réponse aux GC, la serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1). SGK1 phosphoryle et inhibe NEDD4-L, une E3 ubiquitine ligase capable d'induire la dégradation d'ORAI1. SGK1 doit être adressée à la membrane plasmique pour être active sur NEDD4-L (une fonction dépendante de GILZ dans les cellules rénales) (Soundararajan *et al.*, 2010). En outre SGK1 doit être phosphorylée pour être activée, entre autre par PDK1, dont la délétion réduit la macropinocytose mais pas la maturation des DC (Zaru, Mollahan and Watts, 2008). Finalement, un isoforme de SGK, la protéine SGK3 a été montrée comme essentielle à la chimiotaxie des DC immatures et matures envers CXCL12 et CCL21 respectivement (Schmid *et al.*, 2012). Par ailleurs, SGK1 elle-même, via sa régulation de

NFkB (Eylenstein *et al.*, 2012), favorise l'expression d'ORAI1 (Eylenstein *et al.*, 2011). D'autres isoformes d'ORAI ont été mis en cause dans la régulation de la migration des DC, en particulier ORAI2. Régulé négativement à l'homéostasie par LRRK2, ORAI2 favorise la chimiotaxie des DC mais pas leur maturation (Yan *et al.*, 2019). Cependant, le rôle d'ORAI2 dans les cellules, y compris les DC, n'est pas similaire à celui d'ORAI1, bien au contraire. Dans les LT, ORAI2 forme des hétéromères avec ORAI1 et limite l'entrée de Ca^{2+} médiée par ORAI1. En effet, ORAI2 est capable de faire entrer le Ca^{2+} , mais de manière moins efficace qu'ORAI1. C'est la délétion d'ORAI1 et 2 qui inhibe complètement le SOCE (Vaeth *et al.*, 2017). Hormis peut-être dans les cellules tumorales (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010; Faouzi *et al.*, 2011), le rôle d'ORAI3 dans l'entrée de Ca^{2+} dépendant du RE reste peu exploré, mais ORAI3 semble peu impliqué dans ces processus. Une possibilité est qu'ORAI3 soit plus impliqué dans une entrée de Ca^{2+} indépendante des stocks du RE. ORAI1 et 3 en pentamère forment des canaux (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2008) dont l'ouverture est dépendante des récepteurs muscariniques (Mignen and Shuttleworth, 2000). Ces canaux sont dépendants de la présence de STIM1, même faible, à la membrane plasmique (Shuttleworth, Thompson and Mignen, 2007). En conclusion, certains facteurs sont importants pour la chimiotaxie et pour la maturation, quand d'autres impactent un processus plus qu'un autre. Il manque, dans l'ensemble, un travail intégratif s'appuyant sur la délétion conditionnelle des facteurs et des tests standardisés (de chimiotaxie typiquement). En outre, en ce qui concerne les ORAI, aucune étude n'utilise des systèmes de migration confinés, empêchant de conclure sur leur impact sur la vitesse des DC et la persistance de leur migration.

3.3.3. STIM

La vidange en Ca^{2+} du RE déclenche le SOCE. Ce processus met en jeu les protéines stromal interaction molécules : STIM. C'est l'interaction de STIM et ORAI qui aboutit à l'ouverture des canaux ORAI (Smyth *et al.*, 2010) (Figure 17). Les protéines STIM sont

des protéines transmembranaires situées sur le RE. Elles sont retrouvées dans deux états fonctionnels. Lorsque le RE est rempli de Ca^{2+} , ce cation est fixé à la partie intraluminale des STIM (EF-hand, Figure 17). Ceci impose une conformation fermée de cette protéine et l'empêche d'interagir avec les canaux ORAI. En revanche, la vidange du RE provoque la dissociation du Ca^{2+} de la partie intraluminale des STIM et induit une modification conformationnelle de ces protéines. L'exposition des domaines « CRAC activation domain / STIM-Orai activating region » (CAD) /SOAR) de STIM le conduit à accroître son affinité pour les phosphoinositides membranaire et les domaines C-ter d'ORAI (Bhardwaj, Hediger and Demaurex, 2016). L'interaction de ces protéines aboutit à une oligomérisation des ORAI et des STIM à la membrane plasmique. Cette conformation crée des entrées locales de Ca^{2+} dit « hot spots » (Wu *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2012; Nunes-Hasler *et al.*, 2017). La diffusion de ces hot spots est inhibée par la création d'un réseau d'actine permettant d'induire une entrée locale de Ca^{2+} (Hsieh *et al.*, 2017). Le réseau cortical d'actine est en retour contrôlé par PERK, une protéine de la membrane du RE, sans laquelle le réseau cortical d'actine empêche l'interaction STIM/ORAI. PERK agit en interagissant physiquement avec les filaments d'actine (van Vliet *et al.*, 2017). Chez l'humain, des mutations retrouvées au niveaux d'ORAI ou STIM sont associées à des pathologies auto-immunes, semblables au syndrome d'immunodéficience combiné sévère, dites « CRAC-channelopathies ». Il existe deux isoformes de STIM chez la souris, SITM1 et STIM2, qui présentent des différences d'affinité de la EF-hand (Figure 17). La EF-hand de STIM1 est sensible à des concentrations en Ca^{2+} inférieures à $200\mu\text{M}$ quand celle de STIM2 détecte des concentrations inférieures à $400\mu\text{M}$. En outre, STIM2 se comporte, même libéré du Ca^{2+} , bien plus comme un monomère que STIM1 qui s'agrège rapidement, favorisant l'interaction avec ORAI (Zheng *et al.*, 2008). En outre, si la délétion de STIM1 inhibe fortement le SOCE, celle de STIM2 n'a que peu d'effet et au contraire, la surexpression de STIM2 inhibe le SOCE (Soboloff *et al.*, 2006). Ceci porte à croire que STIM2 jouerait un rôle régulateur du SOCE dans les cellules. L'activation de STIM2 à des variations de

Ca²⁺ proche de la normale dans le RE qui pourraient éviter l'induction de SOCE aspécifique. En accord, la délétion de STIM1 seul tend à réduire la sortie de Ca²⁺ du RE lors d'un stress réticulaire. Cela tend à montrer que le Ca²⁺ sort plus difficilement du RE en présence de STIM2 seul (Vaeth *et al.*, 2015). STIM2 agirait en interagissant physiquement avec STIM1 au niveau des hot-spots (Soboloff *et al.*, 2006). Cependant, dans d'autres cellules, notamment les DC qui l'expriment fortement (Bandyopadhyay, Pingle and Ahern, 2011), STIM2 semble important pour l'induction du SOCE, et agirait en association particulière avec ORAI2. De plus il y aurait une colocalisation forte de l'actine filamenteuse avec STIM2 et ORAI2 à l'interface des cellules en contact avec des billes recouvertes d'un ligand des intégrines. En outre, d'autres études démontrent que la délétion de STIM1 et 2 dans les DC n'interfère en rien, ni sur leur différenciation, ni sur leur endocytose médié par les récepteurs, ni sur leur capacité à polariser les réponses T CD4 (Vaeth *et al.*, 2015). Les auteurs de cette étude concluent que la signalisation calcique est essentielle à la fonction des DC mais pas le SOCE. Cependant, ces travaux s'appuient sur des cultures cellulaires issues de souris délétées pour STIM1 et STIM2. Tout effet d'une modulation négative de STIM2 sur ces fonctions n'est alors plus détectable. En outre ces auteurs ne regardent pas la capacité des DC à migrer, ni leur capacité de présentation croisée. D'autres travaux démontrent que l'inhibition de l'expression de STIM1 et d'ORAI1 réduit la maturation des DC en réponse à différents signaux d'activation (Félix *et al.*, 2013). D'autres encore démontrent que l'inhibition pharmacologique des STIM réduit la chimiotaxie des DC envers CCL21 (Matzner *et al.*, 2008) (Tableau 1), de même que la délétion conditionnelle de STIM1 réduit la chimiotaxie des DC envers CCL21 et CXCL12 (Nunes-Hasler *et al.*, 2017) (Tableau 1). Le rôle des STIM dans les fonctions des DC reste donc activement discuté. Cependant, outre des modulations de leur expression, une clef pour comprendre leur rôle réside peut-être dans les interactions qu'ils établissent avec d'autres protéines retrouvées à la surface du RE. Outre les acteurs bien décrits comme la « STIM-activating enhancer » STIMATE (Jing *et al.*, 2015), STIM1 a été démontré comme engageant des interactions

avec UNC93B1 (Maschalidi *et al.*, 2017), STING (Srikanth *et al.*, 2019) et Tmem178 (Decker *et al.*, 2015), CRACR2A et junctate (Lewis, 2020). STIM1 retient STING à la membrane du RE et inhibe ses fonctions sur la production d'IFN de type I. Ceci pourrait en partie expliquer que les patients mutés pour STIM1 développent des auto-immunités. En outre, dans les DC, UNC93B1, protéine partenaire de Ii (CD74), fortement impliquée dans la présentation antigénique, favorise le bon fonctionnement de STIM1. De ce fait, la délétion de STIM1 réduit fortement la capacité des DC à présenter les antigènes aux LT OT I. Cela dessine une nouvelle fonction de STIM1 comme un élément central dans la régulation de la migration des DC mais aussi dans leur capacité à polariser des réponses effectrices et cytotoxiques. Finalement, on peut se demander si STIM1 n'interagit pas aussi avec la protéine SGK1 dans la membrane du RE. Comme nous le disions, SGK1 est un élément central dans la régulation d'ORAI1, (Lang *et al.*, 2019) notamment dans les macrophages (Eylenstein *et al.*, 2011) et est elle aussi associée à la membrane du RE (Arteaga *et al.*, 2006). Il serait intéressant de voir si c'est par une interaction avec STIM1 qu'elle se stabilise dans la membrane du RE avant d'être dégradée. Finalement, il est aussi possible qu'un des éléments contrôlant la fonction de STIM1 soit son insertion dans la membrane plasmique (Shuttleworth, Thompson and Mignen, 2007).

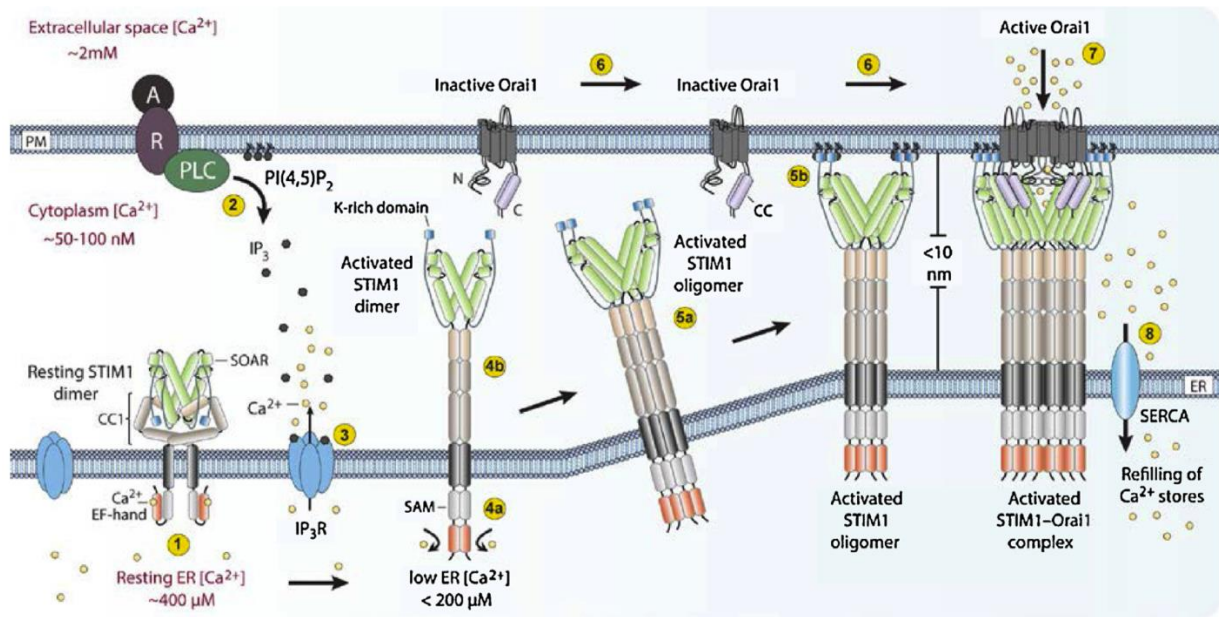


Figure 17 : Schéma illustrant l'entrée de calcium induite par le SOCE. A l'état inactif (1), les dimères de STIM1 sont repliés sur eux-mêmes via l'interaction d'importante quantité de Ca²⁺ avec la EF-hand située dans la lumière du RE. Lors de la vidange du RE, ici via la fixation d'IP₃ (2) aux IP₃R (3), la EF-hand se libère et module la conformation de STIM1 qui se déplie et libère deux unités fonctionnelles : le SAM (4a) et la partie cytosolique (4b), à présent capables de s'agréger avec d'autres dimères (5a). Ces agrégats sont capables de lier les ORAI1 à la membrane plasmique (6) et de les fixer en un point pour les activer et induire l'influx calcique de l'extérieur vers le cytosol (7). Finalement, le Ca²⁺ est re-pompé dans le RE via les pompes SERCA (8). Figure issue de (Bhardwaj, Hediger and Demaurex, 2016).

* en comparaison des cellules contrôles	* augmenté	* diminué	* inchangé	non regardé					
	UNC93B1	STIMI	STIM2	ORAI1	ORAI2	ORAI3	SGK1	SGK3	PDK1
statut	déletion	déletion	WT	déletion	WT	?	déletion	déletion	déletion
vitesse de migration iDC									
chimiotaxie CXCL12 iDC									
chimiotaxie CCL21 mDC									
SOCE thapsigargine		iDC and mDC							
SOCE CXCL12 iDC									
SOCE CCL21 mDC									
macropinocytose									
phagocytose									
regulation associée	STIMI								
activation									
études	Maschalidi 2017	Nunes-Hasler 2017 matzner 2008	Yan 2019	felix 2013	Yan 2019		Yang (phD)	Schmid 2012	Zaru 2007
	PDK1	AKT1	AKT1	AKT2	ETS1	Ampk	trpm4	IP3R1	GILZ
statut	surexpression	déletion	surexpression	déletion	déletion	déletion	déletion	déletion	déletion
vitesse de migration iDC									
chimiotaxie CXCL12 iDC									
chimiotaxie CCL21 mDC							Depend de l'activation		
SOCE thapsigargine									
SOCE CXCL12 iDC									
SOCE CCL21 mDC									
macropinocytose									
phagocytose									
regulation associée							PLCB2		ORAI1 / 2
activation									
études	Zaru 2007	Park 2006	Park 2006	bhandaru 2012 Yang 2014	Yang 2014	Nurbaeva 2012	Barbet 2008	solanes 2014	Vetillard Unpublished

Tableau 1 : Effets de la modulation des ORAI, des STIM et de leurs facteurs associés sur les fonctions des DC. Selon les études, la « diminution » peut être obtenue par l'utilisation d'ARN interférents, délétion génétique ou inhibition pharmacologique.

3.4. Autres médiateurs des flux calciques et effets de leur modulation sur la migration des DC

Les DC peuvent maintenir une migration rapide via une boucle paracrine de sécrétion d'ATP. La fixation de l'ATP sur le récepteur P2x7 induit une signalisation calcique modulant la vitesse des DC. Ce processus implique une relocalisation du cytosquelette d'actine à l'arrière de la cellule dépendant de la calmoduline (Saéz *et al.*, 2017). Un même procédé est mise en place lors de l'inflammation et détermine la capacité des DC à coloniser leur milieu via des boucles paracrines de GABA (Bhandage, Kanatani and Barragan, 2019). Les lysosomes jouent aussi un rôle fondamental dans la migration

et la présentation antigénique. Ils se relocalisent à l'arrière des DC migrant rapidement (Chabaud *et al.*, 2015; Bretou *et al.*, 2017) et participent aux relargages locaux de Ca^{2+} , via TRPML1, essentiels à la contraction de la myosine IIA (Bretou *et al.*, 2017). Ces organites sont retrouvés au contact du RE d'une manière STIM1 dépendante (Nunes-Hasler *et al.*, 2017) et participent aussi à la régulation de la maturation et de la chimiotaxie des DC via l'expression de TRPM2 dans les lysosomes (Sumoza-Toledo *et al.*, 2011). Finalement, d'autres canaux exprimés à la surface des lysosomes jouent un rôle dans la migration des DC en modulant l'homéostasie du zinc (*e.g.* SLC39a8 aussi appelé ZIP8) (Feske, Wulff and Skolnik, 2015).

Les mitochondries semblent jouer un rôle crucial dans la migration des DC elles aussi. En effet, l'induction de stress réticulaire induit une relocalisation des mitochondries au contact du RE (Bravo *et al.*, 2011). Or ces organites expriment plusieurs canaux (MCU / VDAC) dont la modulation pourrait impacter directement la migration des DC. Ces canaux permettent aux mitochondries de se charger massivement en Ca^{2+} , limitant la disponibilité de ce cation dans le cytosol. Une inhibition de l'expression des MCU a déjà démontré une modulation de la contractilité de l'actine dans les cellules en cours de migration via la Myosine IIA (Prudent *et al.*, 2016). En outre, il est à noter que les mitochondries se fragmentent en réponse à la thapsigargine, phénomène inhibé par la surexpression de GILZ (André *et al.*, 2016).

Nous avons donc vu que l'influx de Ca^{2+} cytosolique contrôle la chimiotaxie et la vitesse de migration des DC et que la vitesse de migration et la chimiotaxie sont des processus contrôlés de manière différente et indépendante dans les DC. Pour mieux comprendre notre hypothèse de travail concernant l'implication de la protéine GILZ dans le contrôle de la migration des DC, voyons plus en avant cette protéine.

4. La protéine GILZ.

4.1. GILZ et sa modulation

4.1.1. Gène et expression tissulaire

La protéine GILZ (D'Adamio *et al.*, 1997) est codée par le gène Transforming growth factor (TGF) β stimulated clone 22 domain family protein 3 (*Tsc22d3*), situé sur le chromosome X. Les produits du gène *Tsc22d3* sont deux ARN dont des variants d'épissage peuvent être traduits en 5 isoformes dits GILZ 1, 2, 3, 4 et Long GILZ (Figure 18). GILZ1, 3, 4 partagent un domaine N-terminal (N-ter) identique, différent de celui de GILZ2 et Long GILZ qui sont des produits d'un décalage du cadre de lecture utilisant un codon AUG non-canonique (Soundararajan *et al.*, 2007; Vétillard and Schlecht-Louf, 2018). Cependant, hormis GILZ 3, tous les isoformes partagent des structures très conservées communes en C-ter : un domaine riche en prolines (Proline rich region, PRR); un domaine leucine-zipper (LZ) suivi d'un domaine TGF-stimulated clone (TSC). Le terme « GILZ » se réfère usuellement à l'isoforme GILZ1 (Hamdi *et al.*, 2007; Cathelin, Met and Svane, 2013; Calmette *et al.*, 2014, 2016; Yang *et al.*, 2019) et nous adopterons cette notation simplifiée pour la suite de ce manuscrit. Le promoteur de *Tsc22d3* possède des séquences de fixation de facteurs de transcription participant à la régulation de son expression. On retrouve des séquences glucocorticoid responsive elements (GRE) et forkhead responsive elements (FHRE) liant fortement l'expression de GILZ à la signalisation induite par les GC. Cloné à plusieurs reprises (Asselin-Labat *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2017), le promoteur de *Tsc22d3* révèle aussi la présence d'autres sites fixant des FT telles que STAT, NFAT, c-myc, Oct-1, SRE et GATA (Asselin-Labat *et al.*, 2005; Köberle *et al.*, 2012). GILZ est aussi régulé de manière post-traductionnelle. En particulier, GILZ peut être poly-ubiquitinylé (He *et al.*, 2018), et cela participe à sa demi-vie très courte (2-3h). De plus, la présence d'un domaine LZ pourrait permettre à GILZ de s'homodimériser (Mittelstadt and Ashwell, 2001; Di Marco *et al.*, 2007) mais

aussi de former des hétéro-dimères avec ses isoformes et d'autres protéines, permettant de réguler sa fonction. GILZ est exprimé de façon ubiquitaire (D'Adamio *et al.*, 1997; Cannarile *et al.*, 2001) et notamment par les DC où son expression est plus forte dans les cDC1 que les cDC2 et pDC de la rate (Calmette *et al.*, 2016). GILZ est aussi exprimé dans les DC de culture murines (Lebson *et al.*, 2011; Calmette *et al.*, 2014, 2016) et son niveau d'expression est fortement augmenté en réponse aux GC de synthèse (Cannarile *et al.*, 2001; Berrebi *et al.*, 2003; Godot *et al.*, 2006; Calmette *et al.*, 2014).

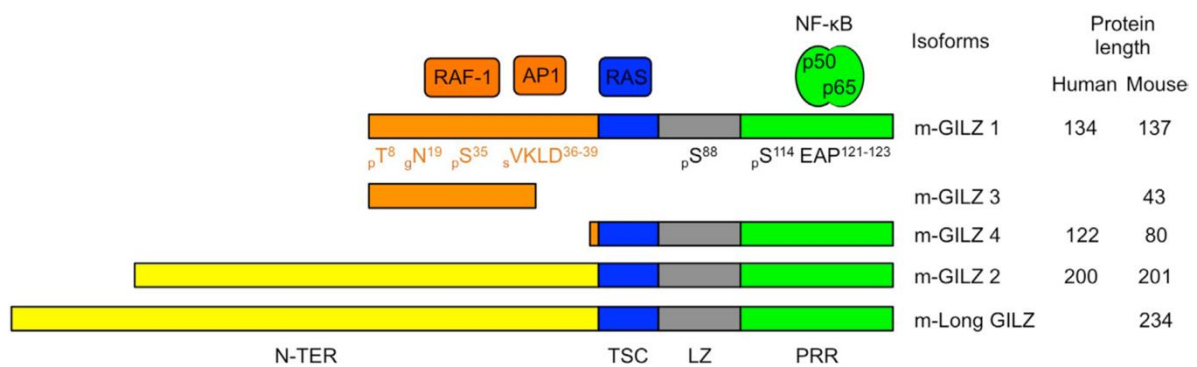


Figure 18 : Schéma représentant la structure protéique conservée entre les différents isoformes de GILZ. Hormis GILZ3, tous les isoformes de GILZ partagent un domaine C-terminal (C-Ter) commun. Le C-Ter, via sa partie PRR interagit avec la sous unité p65 de NFkB, et via sa partie TSC avec RAS. Le N-Ter varie selon le codon de départ utilisé pour transcrire le gène *Tsc22d3*. Le codon canonique donne naissance à un N-Ter (orange) capable d'interagir avec AP1 et RAF-1. Figure tirée de (Vétillard and Schlecht-Louf, 2018).

4.1.2. Modulation de l'expression de GILZ

L'expression de GILZ est régulée par différents facteurs inducteurs. On peut ici citer les GC endogènes (Perez *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2019) et ceux de synthèse comme la dexaméthasone (Dex) (Cannarile *et al.*, 2001; Berrebi *et al.*, 2003; Godot *et al.*, 2006), le TGF- β , l'IL10, la vitamine D3 (Zimmer *et al.*, 2012) et le hepatocyte growth factor (HGF) (Benkhoucha *et al.*, 2014). De même, un cocktail de maturation utilisé pour activer les DC de cultures humaines à visée vaccinale (TNF- α , IL-1 β , IL6, PGE2) induit l'expression de GILZ (Cathelin, Met and Svane, 2013). Son expression est en revanche réduite dans

la microglie de souris traitées par des antibiotiques, suggérant un rôle inducteur du microbiote (Thion *et al.*, 2018). Le LPS (Zimmer *et al.*, 2012; Calmette *et al.*, 2016) et la mifépristone (inhibiteur des récepteurs aux GC) (Yang *et al.*, 2019) ont été montrés comme capables de diminuer l'expression de GILZ. (Figure 18)

Finalement, l'expression de GILZ est aussi régulée en contexte pathologique. Ainsi, des facteurs sécrétés induiraient l'expression de GILZ dans les DC associées au lymphome B chez la souris (Lebson *et al.*, 2011). De plus, GILZ est un des transcrits les plus exprimés spécifiquement dans les DC infiltrant les tumeurs et son expression corrèle avec les taux de corticoïdes endogènes circulants (Yang *et al.*, 2019). Ces études corroborent des travaux démontrant une expression forte de GILZ dans les macrophages de patients atteints de lymphome de Burkitt (Berrebi *et al.*, 2003). En outre, l'expression de GILZ est modulée lors d'infections virales. Ainsi, chez la souris (Das *et al.*, 2015) et l'Homme (Webster Marketon, Corry and Teng, 2014) son expression est réduite au cours d'infections virales par Chikungunya et le virus syncycial respiratoire mais activement maintenue au cours de l'infection médiée par l'Infectious Bursal Virus (He *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'expression de GILZ est significativement réduite dans les DC circulantes de patients présentant une allergie respiratoire (Karaki *et al.*, 2014), ce qui est corrigé par un traitement avec des GC par voie orale. Par contre, GILZ est surexprimé dans la synovie de patients ayant une polyarthrite rhumatoïde active (Beaulieu *et al.*, 2010). Finalement, l'expression de GILZ est fortement modulée dans des pathologies cutanées. En effet, son expression est diminuée dans les lésions lors de la dermatite atopique (Baek *et al.*, 2018) et dans le psoriasis (Jones *et al.*, 2015). Il est aussi intéressant de noter que les anticorps anti-IL17A chez l'Humain augmentent significativement l'expression de GILZ tout en améliorant le psoriasis (données issues des bases de données publiées par (Krueger *et al.*, 2013)). Pour finir, l'expression de GILZ dans les pDC et les DC myéloïdes en réponse à la prednisolone est inversement corrélée avec l'activité du lupus chez l'Homme (Jones *et al.*, 2016). Ces derniers résultats rendent GILZ particulièrement attractif comme cible thérapeutique dans le psoriasis

(Sevilla and Pérez, 2019) et le lupus (Flynn, Dankers and Morand, 2019). Ils dessinent aussi un axe de régulation privilégiée de GILZ avec L'IL17, dont GILZ module négativement l'expression dans les LT (Ngo *et al.*, 2013; Yosef *et al.*, 2013).

4.2. Rôle de GILZ dans les DC

4.2.1. Phénotype et sécrétion cytokinique

Les GC de synthèse, très utilisés pour comme inducteurs de tolérance immunitaire, sont connus pour induire une modulation fonctionnelle des DC. En particulier, ces traitements font diminuer les niveaux d'expression des molécules de costimulation (CD80/83/86) et de CMH II et induisent l'expression de protéines régulatrices telles que PD-L1 et la production d'IL10. Les travaux de notre laboratoire ont contribué à démontrer d'une part que les GC induisent une surexpression de GILZ dans les DC Humaines (Cohen *et al.*, 2006; Hamdi *et al.*, 2007) et murines (Calmette *et al.*, 2014) et d'autre part que cette surexpression est nécessaire pour la différenciation tolérogène. En effet, des DC Humaines dérivées de monocytes et traitées à la Dex, au TGF β ou à l'IL10 augmentent l'expression de GILZ et adoptent un phénotype tolérogène (forte expression de PD-L1/ILT-3 et diminution de CD80/83). Cependant, l'utilisation d'un ARN interférant pour GILZ (siGILZ) inhibe l'effet de la Dex et de l'IL10. En parallèle, l'induction de l'expression de GILZ par les DC via un vecteur d'expression suffit pour leur conférer un phénotype tolérogène (Cohen *et al.*, 2006). Finalement, l'inhibition de GILZ empêche la modulation fonctionnelle des DC matures traitées par la Dex ou l'IL10. En effet, les DC matures traités avec un siGILZ pour GILZ ne diminuent pas leur expression de chimiokines pro-inflammatoires (CCL3/5 et CXCL8) lorsque traitées par la Dex ou l'IL10 (Cohen *et al.*, 2006). Ces résultats sont à mettre en regard de la migration des DC, car des boucles paracrines de sécrétion de chimiokines ont été décrites comme importantes pour l'induction de CCR7 (Del Prete *et al.*, 2004; Tiberio *et al.*, 2018). Outre l'effet sur leur phénotype, la délétion de GILZ dans les DC impacte aussi fortement leurs capacités de capture antigénique. Finalement, l'expression

endogène de GILZ est aussi capable d'inhiber l'activation de DC maturées par un cocktail pro inflammatoire. En effet, les DC traités avec un siGILZ dans ces études accroissent l'expression de CD86 et la sécrétion d'IL12 mais diminuent celle de PD-L1 (Cathelin, Met and Svane, 2013). Dans l'ensemble, ces études montrent que GILZ joue un rôle important dans la fonction des DC immatures et dans leur maturation en réponse à des signaux d'activation. En effet, si l'expression endogène de GILZ ne semble pas impacter leur phénotype à l'état basal (Calmette *et al.*, 2016), sa délétion augmente significativement leur réponse aux signaux d'activation et leur production d'IL1/12 et 23 dans certaines études (Jones *et al.*, 2015). Ces résultats sont contradictoires avec les résultats de notre équipe (Calmette *et al.*, 2016). Cependant, les modèles murins varient dans ces études. Jones *et al.* utilisent un modèle GILZ^{ko} total induit par un traitement au tamoxifène, tandis que nous utilisons un modèle de délétion conditionnelle dans les DC (CD11c-GILZ^{ko}). Il est aussi à noter que le marqueur de tolérance le plus souvent associé aux DC sur-exprimant GILZ est l'expression forte de PD-L1 (Cohen *et al.*, 2006; Hamdi *et al.*, 2007; Cathelin, Met and Svane, 2013; Benkhoucha *et al.*, 2014). Ces résultats ne sont pas retrouvés à l'homéostasie, *in vitro* et *in vivo* dans les modèles de surexpression constitutive de GILZ (GILZ^{hi}) (Calmette *et al.*, 2014). Cependant, après interaction avec les LT les DC GILZ^{hi} ont une expression réduite de CMH II et produisent plus d'IL10 que les DC WT. Cela suggère que les techniques de surexpression de GILZ pourraient moduler l'induction du phénotype tolérogène des DC et que l'acquisition du phénotype tolérogène par les DC surexprimant constitutivement GILZ pourrait nécessiter l'interaction spécifique d'antigène avec les LT. Ceci pourrait expliquer le faible impact de la délétion ou de la surexpression de GILZ sur le phénotype des DC de culture murines n'ayant pas été en contact avec les LT (Calmette *et al.*, 2014, 2016; Jones *et al.*, 2015).

4.2.2. Capture antigénique et présentation

Les DC GILZ^{ko} (Calmette *et al.*, 2016) et traitées par un siGILZ (Lebson *et al.*, 2011) ont démontrés des capacités accrues de capture antigénique *in vitro* et *in vivo* (Calmette

et al., 2016) (Figure 19). En revanche les DC qui surexpriment GILZ présentent un léger retard de capture antigénique par rapport à leurs contrôles (Calmette *et al.*, 2014). GILZ semble réguler préférentiellement la macropinocytose des DC car les DC GILZ^{ko} capturent plus le Dextran-FITC (70kDa) que les DC WT, une molécule capturée par macropinocytose, mais pas le zymosan, internalisé par endocytose médiée par les récepteurs. En outre, la macropinocytose accrue est normalisée après activation, à l'image de l'inhibition de la macropinocytose induite par la maturation des DC (West, MA *et al.*, 2004; Chabaud *et al.*, 2015; Vargas, Chabaud, *et al.*, 2016). Finalement, *in vivo*, GILZ n'accroît la macropinocytose que dans les cDC1 après injection de Dextran-FITC par voie intraveineuse, cellules où précisément son expression est la plus forte à l'homéostasie (Calmette *et al.*, 2016). Cet accroissement de capture n'améliore toutefois pas la présentation antigénique à un hybridome TCD4 et réduit leur capacité à activer un hybridome T CD8 *in vitro*.

Nous avons donc vu que GILZ régule la capacité de macropinocytose de DC et leur activation et que la surexpression de GILZ favorise la production d'IL10, une cytokine anti-inflammatoire importante dans la polarisation des LT, particulièrement des Treg. Voyons maintenant l'impact de l'expression de GILZ par les DC sur l'activation des réponses T.

4.2.3. Activation des lymphocytes T

L'ensemble de données de la littérature converge vers la conclusion que l'expression forte de GILZ dans les DC favorise la prolifération de LT au détriment de l'activation de LT effecteurs Th1 / Th17 (Hamdi *et al.*, 2007; Cathelin, Met and Svane, 2013; Calmette *et al.*, 2014; Karaki *et al.*, 2014). Les travaux pionniers de l'équipe, confirmés par d'autres, ont établi que les DC traitées avec de la Dex induisent une plus faible prolifération des LT CD4 et CD8 que les DC WT envers des antigènes de rappel (Hamdi *et al.*, 2007; Cathelin, Met and Svane, 2013), due à la prolifération de LT FoxP3+ IL-10+ capables de

supprimer les réponses effectrices (Figure 19). En outre, le traitement des DC par un siGILZ, ou l'inhibition de l'IL10 via l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette cytokine, abroge l'expansion des Treg (Hamdi *et al.*, 2007; Karaki *et al.*, 2014). De plus, les DC GILZ^{hi} chargées avec de l'ovalbumine induisent une prolifération et une activation de LT CD4 OT II naïfs (spécifiques de l'ovalbumine) moindre que les DC contrôles *in vivo* (Calmette *et al.*, 2014). De même, chez la souris porteuse de tumeur, en réponse spécifique à la protéine HA du virus de la grippe, les DC traitées avec un siGILZ induisent une plus forte production d'IFN γ par les LT spécifique de l'antigène HA que les DC WT (Lebson *et al.*, 2011). De façon complémentaire, si les DC WT traitées à l'HGF induisent une faible production d'IFN γ et d'IL17 par les LT CD4 et une accumulation de LTreg CD25⁺ FoxP3⁺ plus importante que les DC WT non traitées, cet effet est aboli lorsque les DC sont GILZ^{ko} (Benkhoucha *et al.*, 2014). La surexpression constitutive de GILZ dans les DC induit une accumulation de Treg ICOS-L⁺ chez la souris âgée, en l'absence de challenge immun spécifique (Calmette *et al.*, 2014), ce qui laisse penser qu'à l'homéostasie, la régulation fine de son expression dans les DC est nécessaire à la mise en place des stocks de Treg. Cependant, l'effet de sa délétion constitutive dans les DC sur l'homéostasie de Treg n'est pas connu.

En accord avec ces données, la surexpression de GILZ dans les DC à un effet bénéfique dans l'allergie respiratoire chez l'homme (Karaki *et al.*, 2014) et l'EAE chez la souris (Benkhoucha *et al.*, 2014). La surexpression de GILZ dans les DC au cours des pathologies cancéreuses (Lebson *et al.*, 2011) (Yang *et al.*, 2019) à un effet négatif sur la survie et sur la réponse aux traitements.

GILZ à un effet complexe sur l'établissement des réponses T CD8. En effet, la surexpression de GILZ favorise l'expansion de LT reg au détriment de LT effecteurs. Cependant, si sa délétion, ou son inhibition via des siGILZ, suffit à conférer aux DC de bonnes capacités d'activation des réponses T effectrices, elle pourrait ne pas suffire pour augmenter leur capacité de présentation croisée.

4.2.4. Mécanismes

GILZ est une protéine dont l'action passe par deux mécanismes principaux. Premièrement GILZ est capable d'interagir physiquement avec des protéines impliquées dans l'immunité. En particulier, GILZ est capable de fixer la sous unité p65 de NFkB, inhibant ainsi sa fonction (Ayroldi *et al.*, 2001; Berrebi *et al.*, 2003; Di Marco *et al.*, 2007). Ceci a conduit plusieurs équipes à produire des peptides correspondant à la séquence de GILZ impliquée dans la fixation à p65 pour tenter d'inhiber sa fonction. (Srinivasan and Janardhanam, 2011; Gu *et al.*, 2018). En outre, GILZ est aussi capable d'interagir directement avec AP-1 (Mittelstadt and Ashwell, 2001), C/EBP (Pan *et al.*, 2014) et FoxO3, dont il inhibe la translocation nucléaire (Asselin-Labat *et al.*, 2005; De Laté *et al.*, 2010). L'interaction avec FoxO est intéressante car le promoteur de *Tsc22d3* contient des séquences régulatrices fixant spécifiquement cette famille de protéines. En inhibant la fonction de FoxO3, GILZ protège les LT de l'apoptose induite par la privation en IL2 (Asselin-Labat *et al.*, 2005). GILZ protège également les cellules de la mort induite par le stress réticulaire. L'effet protecteur de GILZ semble aussi passer par la modulation fonctionnelle des mitochondries dans les cellules tumorales. Les cellules GILZ^{hi} ont un métabolisme mitochondrial fortement augmenté et la délétion de l'ADN mitochondrial inhibe l'effet protecteur de GILZ vis-à-vis de l'apoptose induite par le stress réticulaire. Cependant, l'expression de GILZ favorise la mort cellulaire induite par des molécules pro-oxydantes (André *et al.*, 2016, 2017). GILZ a donc des fonctions pro ou anti-apoptotique selon les contextes. GILZ interagit aussi avec des protéines impliquées dans la transduction du signal chimiokine et la chimiotaxie des DC, notamment Ras, Raf-1, et mTORC2. Ces interactions inhibent directement la signalisation induite par les voies MEK/ERK-1/2, p38 et mTORC2/AKT (Ayroldi *et al.*, 2002, 2007; Joha *et al.*, 2012; Calmette *et al.*, 2016), suggérant un impact de GILZ sur la survie, mais aussi la chimiotaxie des DC. En outre, son interaction avec le facteur de transcription PU.1 (Ricci *et al.*, 2017), permet aux neutrophiles traités par les GC de migrer *in vivo*. La délétion de GILZ dans ce modèle inhibe la migration de ces cellules

en empêchant l'expression de l'annexine1, dépendante de PU.1. GILZ pourrait donc jouer un rôle direct, via plusieurs mécanismes, sur la migration des DC.

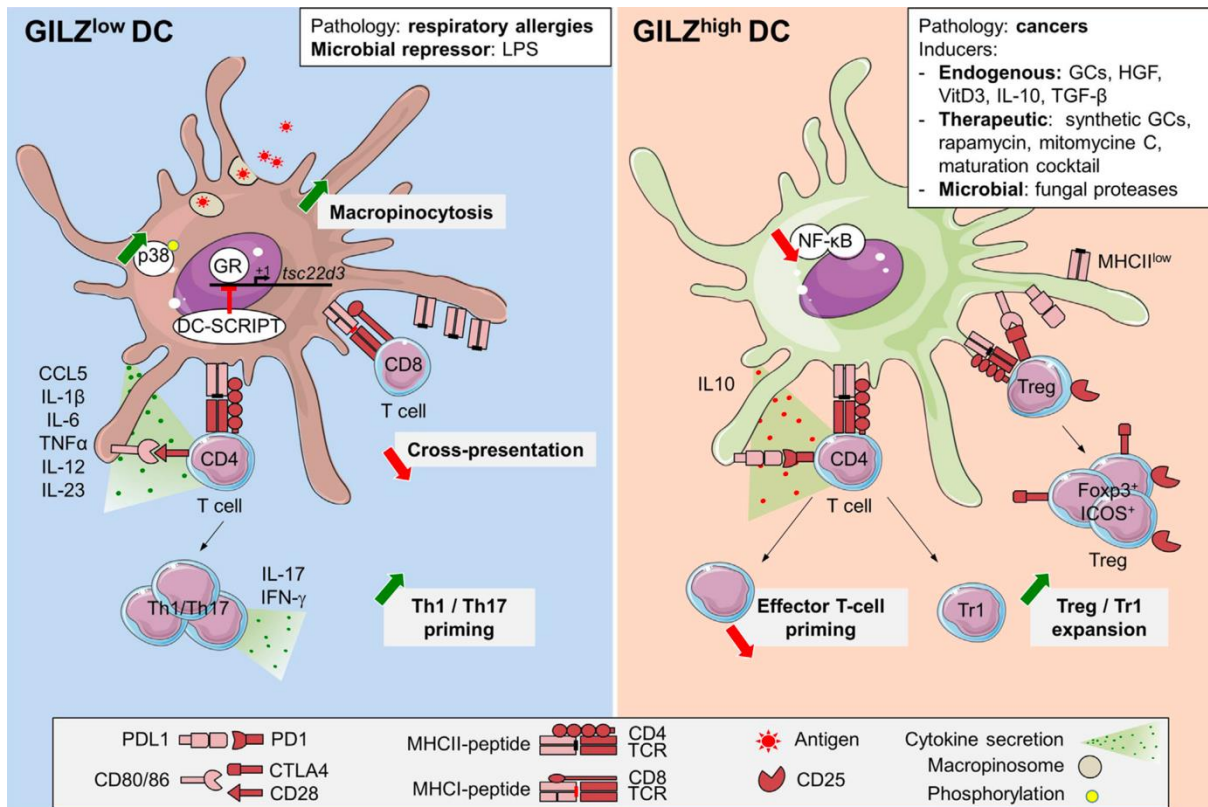


Figure 19 : Fonctions de GILZ dans les DC. Les DC exprimant faiblement GILZ (GILZ^{low}) ont un phénotype et des fonctions pro-inflammatoires. Elles sont efficaces pour promouvoir les réponses Th1/Th17 et T CD8, mais ont une présentation croisée réduite. En outre, elles présentent une macropinocytose plus élevée que les DC WT. En parallèle, les DC qui surexpriment GILZ (GILZ^{high}) de manière constitutive ou en réponse à des signaux inducteurs, expandent les Treg au détriment des LT effecteurs et sécrètent plus d'IL10 que leurs contrôles. Figure tirée de (Vétillard and Schlecht-Louf, 2018).

4.3. Rôle de GILZ sur la régulation des flux ioniques

Des travaux montrent que GILZ est aussi capable de réguler les flux ioniques, notamment dans le rein. GILZ est surexprimé en réponse à l'aldostérone dans le rein, une hormone majeure dans le contrôle de l'homéostasie ionique (Robert-Nicoud *et al.*, 2001; Soundararajan *et al.*, 2005; Fiol, Mak and Kültz, 2007). L'étude de Fiol *et al* démontre que GILZ et TSC22D2, une protéine structurellement proche, sont induits de manière compétitive dans le rein. En effet, GILZ est induit en réponse à l'aldostérone

et TSC22D2 en réponse au stress hyperosmotique. En retour le stress hyperosmotique inhibe l'effet de l'aldostérone sur l'expression de GILZ mais uniquement de manière transitoire. Ces auteurs rappellent en outre que l'aldostérone favorise le transport de Na^+ (Fiol, Mak and Kültz, 2007), électrolyte transporté via les canaux Epithelial Na Channel (ENaC). GILZ favorise l'expression membranaire des EnaC en inhibant la phosphorylation de ERK (Soundararajan *et al.*, 2005) (Figure 20). Une seconde étude montre ensuite que GILZ-1 est le plus efficace des isoformes de GILZ pour induire l'expression des EnaC (Soundararajan *et al.*, 2007). L'aldostérone induit aussi l'expression de SGK1 et fait augmenter l'expression membranaire des EnaC. Il est intéressant de noter que la stabilité membranaire des EnaC est contrôlée par la protéine Nedd4-L, capable de les dégrader via une ubiquitinylation. ERK phosphoryle les EnaC et permet ainsi le recrutement de Nedd4-L. SGK1, en phosphorylant Nedd4-L inhibe ce processus en induisant la dégradation de Nedd4-L (Debonneville *et al.*, 2001; Arroyo *et al.*, 2011). Finalement, les EnaC sont physiquement associés à Raf-1, ERK et Nedd4-L, et GILZ favorise l'association de SGK1 à ces complexes, inhibant leur fonction sur les ENaC (Soundararajan *et al.*, 2009). Mécaniquement, GILZ préserve SGK1 d'un adressage au RE associé à sa dégradation (Soundararajan *et al.*, 2010). On peut à ce titre se demander si GILZ exerce aussi ces fonctions sur la régulation d'ORAI médiée par SGK1. En outre, il est à noter que SGK1 phosphoryle WNK1 et est impliqué, avec CDC42 et Akt, dans la capture antigénique aspécifique des macrophages (Ding, Zhang, Biswas, *et al.*, 2017; Ding, Zhang, Kim, *et al.*, 2017). Finalement, d'autres études montrent que les souris GILZ^{ko} sont hyperkaliémiques (Rashmi *et al.*, 2017) et présentent des troubles en électrolytes circulants très similaires à ceux des souris WNK4^{hi} , protéine dont la fonction est inhibée par WNK1 (Yang *et al.*, 2007). La délétion de SGK1 induit elle aussi une hyperkaliémie chez les souris (Huang *et al.*, 2004), et ses fonctions peuvent impacter la localisation subcellulaire de certains canaux (Palmada *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2003). Il est aussi intéressant de noter qu'un axe SGK1 / IL17A a été

décrit. En effet, la délétion de SGK1 dans les LT inhibe la différenciation des LTh17 via l'inhibition de la réabsorption de sodium (Wilck *et al.*, 2019).

En conclusion, le couple GILZ/SGK1, en association avec WNK1, semble jouer un rôle important dans la régulation des flux ioniques en modulant l'expression et la localisation de certains canaux (Figure 20). Ces données suggèrent que ces mécanismes puissent être impliqués dans la régulation des flux calciques dans les DC, en particulier compte tenu du rôle de SGK1 sur les canaux ORAI dans ces cellules. Finalement, le rôle démontré de GILZ sur la réponse au stress réticulaire (André *et al.*, 2016, 2017) laisse penser que ce facteur pourrait impacter plus largement la réponse calcique dans les cellules, y compris au cours de réponses impliquant le SOCE, telles que la migration des DC.

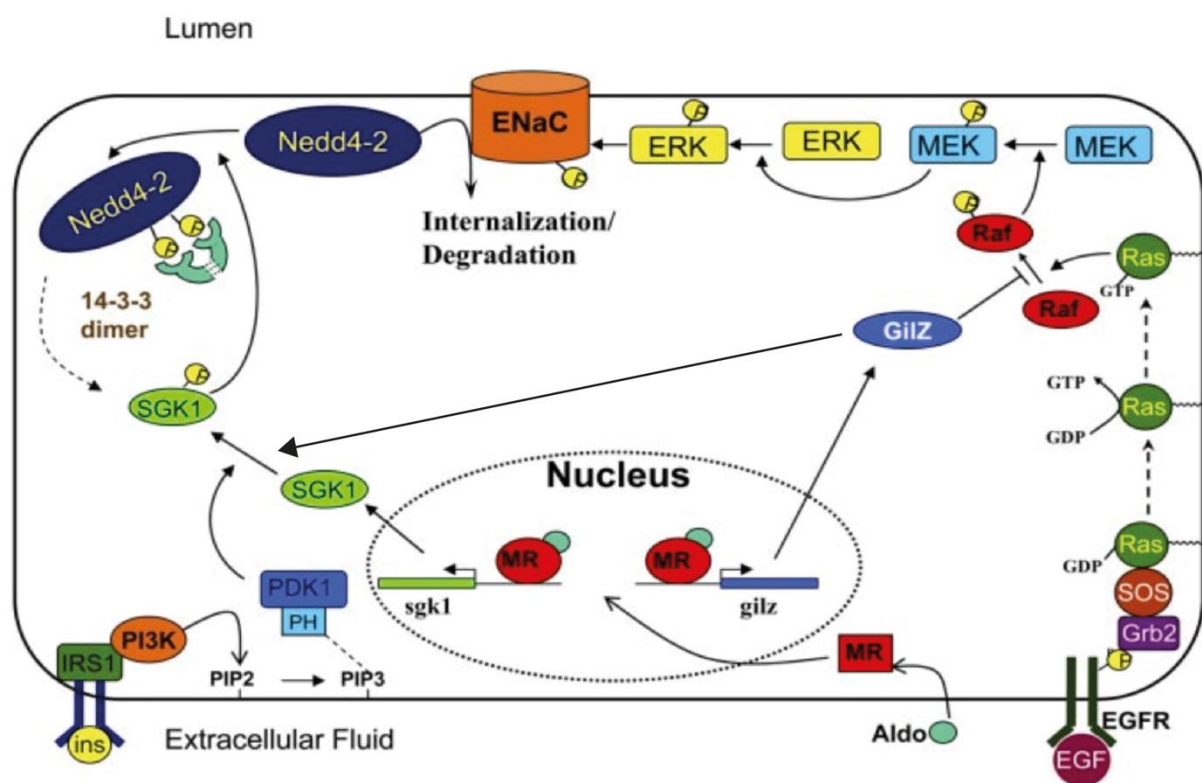


Figure 20 : Schéma des actions connues de GILZ sur la régulation des canaux ENaC dans le rein. SGK1 et GILZ sont induits en réponse aux corticoïdes comme la Dex et l'aldostérone. GILZ inhibe Ras et Raf-1 altérant ainsi la phosphorylation des ENaC par ERK. En parallèle, GILZ préserve SGK1 d'un adressage au RE associé à sa dégradation, phosphoryle et inhibe la fonction de Nedd4-L. Nedd4-L est une E3 ubiquitine ligase induisant la dégradation des ENaC phosphorylés. Figure adaptée de (Rashmi *et al.*, 2017)

En conclusion, GILZ pourrait réguler la migration des DC en contrôlant à la fois la signalisation via les ChR, la réponse des MAPK et la voie Akt. De plus GILZ pourrait contrôler l'entrée calcique cytosolique en modulant la fonction de la protéine SGK1. Finalement, son impact sur la macropinocytose laisse penser que la délétion de GILZ pourrait induire un biais dans la compétition macropinocytose / migration des DC immatures et limiter leur vitesse de migration.

5. Objectifs de la thèse

Le contexte général de mon travail a été l'étude des mécanismes qui régulent la coordination des fonctions de migration des DC *in vivo*. En effet, la migration est essentielle dans toutes les étapes de la vie et de la fonction des DC et doit être finement régulée. Ainsi, les DC immatures alternent des phases de migration non orientée et d'arrêts associées à la capture antigénique, notamment la macropinocytose. Les DC matures inhibent la macropinocytose pour migrer vers les GL en suivant des gradients de chimiokines (CXCL12/CCL21) et activer les réponses lymphocytaires T.

Mon laboratoire a développé deux modèles murins d'intérêt pour l'étude de la migration des DC. Le premier est un modèle de délétion conditionnelle de la protéine GILZ dans les DC (GILZ^{ko}), initialement développé pour étudier les mécanismes d'induction de DC tolérogènes. De façon inattendue, les DC GILZ^{ko} se sont avérées affectées dans leur fonction de macropinocytose, suggérant une possible altération plus générale des processus dépendant d'actine, dont la migration. Le second est un modèle de souris knock-in exprimant une forme mutée de CXCR4 (CXCR4⁺¹⁰¹³) identifiée chez des patients atteints de syndrome WHIM. Ce récepteur présente un gain de fonction suite à la liaison de son ligand CXCL12, et offre la possibilité d'étudier l'importance de la régulation de la signalisation en aval de CXCR4, et notamment sa désensibilisation, pour la biologie des DC. Les patients atteints de syndrome WHIM ayant des lésions cutanées profuses causées par les papillomavirus humains, l'étude des DC cutanées dans ce modèle nous a paru pertinente.

Dans ce contexte, mon premier objectif a été de déterminer si les DC cutanées GILZ^{ko} et CXCR4⁺¹⁰¹³ présentaient des altérations de leur capacité de migration vers les GL en utilisant des expériences de FITC painting [publications 1 & 2]. Dans les deux cas, des défauts de migration ont été identifiés.

Mon deuxième objectif a été d'explorer les mécanismes expliquant ces défauts. Pour cela, j'ai notamment cherché à comprendre quel(s) paramètre(s) de la migration des DC était affecté(s) en étudiant leur vitesse de migration en micro-canaux et/ou leur

chimiotaxie en chambre de transwell. Dans le modèle $GILZ^{ko}$, une étude transcriptomique des DC combinée avec une analyse de la littérature nous a conduits à explorer l'hypothèse d'une altération de la régulation de la réponse calcique [publication 2]. Dans le modèle $CXCR4^{+/1013}$, nos résultats suggèrent que l'effectif réduit de DC cutanées migrant aux GL pourrait résulter d'un piégeage de ces cellules dans le derme riche en CXCL12 [publication 1].

Enfin, mon dernier objectif a été d'étudier les conséquences physiopathologiques de ces défauts de migration des DC cutanées. J'ai donc étudié les réponses immunitaires anti-tumorales et au cours de la DTH dans les souris $GILZ^{ko}$, et notamment l'accumulation des Treg. Mes résultats montrent une exacerbation de l'inflammation cutanée dans le modèle de DTH chez les souris $GILZ^{ko}$, associée à une réduction de l'effectif de Treg. Dans les tumeurs, le moindre effectif de Treg rapporté dans les souris $GILZ^{ko}$ ne suffisait pas à réduire la croissance tumorale. Ces données, encore incomplètes, ne seront pas présentées dans ce manuscrit [en préparation]. Dans le modèle $CXCR4^{+/1013}$, les DC migrantes retrouvées dans les GL présentaient un phénotype hyperactivé, suggérant que seules les DC les plus matures pourraient se libérer du signal exacerbé induit par CXCL12 présent dans le derme pour rejoindre les GL. Ceci était associé à une inflammation cutanée accrue dans un modèle de dysplasie induite par HPV16 [publication 2].

II. RESULTATS

Article 1

Titre :

La signalisation via CXCR4 contrôle la localisation et l'activation des cellules dendritiques à l'homéostasie et au cours de l'inflammation.

Situation : en révision pour le journal Blood.

Participation : Co-premier auteur. J'ai réalisé et analysé les expériences de FITC painting présentées dans le manuscrit après avoir validé le protocole. J'ai participé aux expériences dont sont issues les figure 5, 6 et 7 du manuscrit, incluant l'analyse des DC cutanées et des GL. J'ai contribué à la rédaction des parties du manuscrit correspondantes et vais réaliser les expériences demandées dans le cadre de la révision.

Rationnel de l'étude :

Les DC expriment toute le ChR CXCR4, mais son rôle dans leur biologie reste peu étudié. Pour analyser ce rôle, nous avons utilisé des souris knock-in pour une version mutée de CXCR4 (*Cxcr4^{+/1013}*) retrouvée chez les patients atteints de syndrome WHIM (SW). Cette mutation entraîne la perte de la partie C-terminale du ChR, empêchant sa désensibilisation à la suite de la fixation de CXCL12 et cause un gain de fonction. Ce modèle permet de mieux comprendre le rôle de la signalisation de CXCR4 dans la fonction des pDC et des cDC.

Résultats :

Premièrement, cette étude montre que les pDC, mais pas les cDC, sont réduites en nombre et fréquence dans le sang de patients atteints de SW, en contradiction partielle (pour les cDC) avec l'étude de Tassone et al. (Tassone *et al.*, 2010). Ces résultats sont retrouvés chez la souris *Cxcr4^{+/1013}*. Le fait que le % de pDC est accru dans la moelle osseuse de souris *Cxcr4^{+/1013}* comparativement à leurs contrôles et que l'inhibition

compétitive (AMD3100) de la fixation de CXCL12 normalise rapidement (2h) le nombre de pDC dans le sang, suggèrent que la désensibilisation de CXCL12 est importante pour la sortie des pDC de la moelle, mais pas pour leur développement. Fonctionnellement, la désensibilisation de CXCR4 ne semble pas contrôler la capacité des pDC murines à s'activer et produire les IFN I, ni à activer les cellules NK dans un modèle d'inflammation induite par une injection de CpG. Cependant la fonction de CXCR4 serait importante dans le contrôle de l'activation des pDC en réponse aux monoamines, du moins chez l'Homme (Smith *et al.*, 2017). Concernant les cDC, cette étude démontre que le nombre de cDC circulantes dans le sang de patients WHIM et des souris *Cxcr4^{+/-1013}* sont conservés par rapport aux donneurs sains et aux souris CTRL. De plus, un nombre similaire de cDC résidentes différenciées est retrouvé dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, suggérant que la désensibilisation de CXCR4 n'est pas essentielle au développement et à la différenciation des cDC. En revanche, la migration des DC cutanées vers les GL, étudiée par FITC painting, est réduite dans les souris *Cxcr4^{+/-1013}*. Ceci est associé à une activation accrue des DC *Cxcr4^{+/-1013}* en comparaison de leurs contrôles.

Le SW est associé avec une susceptibilité accrue des patients à la pathogenèse causée par les Human Papilloma Virus (HPV) muqueux et cutanés. Des modèles murins de pathogenèse associée aux HPV existent, comme la souris K14-HPV16 (Arbeit *et al.*, 1994) . Ces souris expriment les protéines précoces « early » du virus HPV16 dans les kératinocytes. Ces souris développent des dysplasies et des lésions cutanées. Nous avons donc développé un modèle de souris K14-HPV-*Cxcr4^{+/-1013}* pour étudier l'impact du gain de fonction de CXCR4 sur l'homéostasie cutanée et notamment la migration et l'activation des DC. Dans le contexte de l'inflammation chronique, il n'y a pas d'effet majeur du gain de fonction de CXCR4 sur l'activation ni l'effectif des DC dans la peau, mais celle-ci est plus épaisse chez les souris K14-HPV-*Cxcr4^{+/-1013}* que chez les souris K14-HPV suggérant une augmentation de l'inflammation chronique. Comme à l'homéostasie, le gain de fonction de CXCR4 diminue la migration des DC depuis la

1 **CXCR4 signaling controls dendritic cell location and activation in steady**
2 **state and inflammation**

3 Carmen Gallego^{1*}, Mathias Vétillard^{1*}, Joseph Calmette^{1#}, Mélanie Roriz^{1#}, Viviana Marin-
4 Esteban¹, Maximilien Evrard², Marie-Laure Aknin³, Nicolas Pionnier¹, Manon Lefrançois¹,
5 Françoise Mercier-Nomé³, Yves Bertrand⁴, Felipe Suarez⁵, Jean Donadieu^{6,7}, Lai Guan Ng²,
6 Karl Balabanian^{1,8}, Françoise Bachelerie¹ & Géraldine Schlecht-Louf¹

7 **Authors' affiliations**

8 ¹UMR996 - Inflammation, microbiome and immunosurveillance, Inserm, Université Paris-
9 Saclay, Clamart, France; ²Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology
10 and Research, Biopolis, Singapore and School of Biological Sciences, Nanyang Technological
11 University, Singapore; ³IPSIT SFR-UMS, Chatenay-Malabry, France; ⁴Institut d'Hématologie
12 et Oncologie Pédiatrique - Hématologie et immunologie pédiatrique, Hôpitaux Civils de Lyon,
13 Lyon, France; ⁵Laboratory of molecular mechanisms of hematologic disorders and therapeutic
14 implications, Imagine Paris, France ; ⁶Service d'hématologie-immuno-oncologie pédiatrique
15 registre des neutropénies APHP - Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, Paris, France;
16 ⁷Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, F-75012 Paris,
17 France; ⁸Université de Paris, Institut de Recherche Saint-Louis, EMiLy, INSERM U1160,
18 Paris.

19 *CG and MV share the first author position.

20 #JC and MR share the second author position.

21 **Corresponding author**

22 Géraldine Schlecht-Louf, INSERM UMR 996, 32 rue des Carnets, 92140 Clamart, France.

23 Phone: +331 4128 8018

24 Fax: +331 4632 7993

25 geraldine.schlecht-louf@universite-paris-saclay.fr

26 **Conflict of interest statement**

27 The authors have declared that no conflict of interest exists.

28 **Keywords**

29 Dendritic Cells, CXCR4, WHIM, Human papillomavirus, Primary immunodeficiency

30 **Short title**

31 CXCR4 signaling controls DC subset biology

32 **Financial support**

33 This work was supported by grants from the ERA-Net Infect-ERA “HPV-MOTIVA” (to FB
34 and GSL), MSCA-ITN-2014-ETN - Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Networks
35 (ITN-ETN) “ONCOgenic Receptor Network of Excellence and Training” (to FB and GSL), the
36 “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” (to GSL) and ANR PRC grant ANR-17-
37 CE14-0019 (to KB).

38 CG was supported by the MSCA-ITN-2014-ETN - Marie Skłodowska-Curie Innovative
39 Training Networks (ITN-ETN) “ONCOgenic Receptor Network of Excellence and Training”
40 and the Fondation pour la Recherche Médicale. MV and JC were supported by a doctoral
41 fellowship from the Doctoral School “Innovation Thérapeutique du fondamental à l’appliqué”
42 (ED 569). MV was supported by the “Ligue contre le Cancer”. NP was supported by a post-
43 doctoral fellowship from the Région Ile de France (DIM Maladies Infectieuses, Parasitaires et
44 Nosocomiales Emergentes).

45 **Text word count**

46 Abstract word count: 200

47 Number of words in the main text: 9617

- 48 Number of figures: 7
- 49 Number of tables: 0
- 50 Supplemental material: 1 table and 5 figures

51 **Abstract**

52 Proper dendritic cell (DC) location warrants their function and requires tightly controlled action
53 of chemokine receptors. All DC subsets express CXCR4, but the genuine contribution of this
54 receptor to their biology remains overlooked. To address this question, we took advantage of
55 natural CXCR4 mutants resistant to CXCL12-induced desensitization and harboring a gain of
56 function that cause the WHIM Syndrome (WS), a rare immunodeficiency associated with high
57 susceptibility to Human Papillomavirus (HPV) pathogenesis. We report reduction of circulating
58 pDC in WHIM patients, while conventional DC are preserved. This pattern is reproduced in an
59 original mouse model of the WS, enabling us to show that circulating pDC defect can be
60 corrected upon CXCR4 blockade and that pDC differentiation and function are preserved
61 despite CXCR4 dysfunction. We further identify proper CXCR4 signaling as a critical
62 checkpoint for DC migration from skin to lymph nodes, with corollary alterations of DC
63 activation state and tissue inflammation in a model of HPV-induced dysplasia. Beyond
64 providing new hypotheses to explain WHIM patient susceptibility to HPV pathogenesis, our
65 work unravels that proper CXCR4 signaling sets up a migration threshold controlling DC egress
66 from CXCL12-containing environments and highlights the critical and subset-specific
67 contribution of CXCR4 signaling to DC biology.

68 **Introduction**

69 Dendritic cells (DC) are key immune players controlling tolerance and immunity (1). Three
70 main DC subsets have been identified in both human and mouse, based on ontogenic,
71 phenotypic and functional criteria (2-5). They encompass plasmacytoid DC (pDC) and
72 conventional DC (cDC) that are further subdivided in type 1 and 2 cDC according to the T-cell
73 responses they induce (3, 4). DC originate in the bone marrow (BM), either as fully
74 differentiated pDC that arise from both lymphoid and myeloid progenitors (5-7) or as myeloid-
75 derived cDC precursors (pre-cDC) that complete their differentiation after reaching peripheral
76 tissues (PT) or lymphoid organs (LO) (3, 8). Langerhans cells (LC) (9) and DC derived from
77 monocytes in inflammatory settings (10) form additional DC-like subsets that collaborate with
78 bona fide DC to shape innate and adaptive immune responses. pDC act as circulating sentinels
79 that enter either the T-cell area of secondary lymphoid organs (SLO) or PT (11) and play a
80 prominent role in antiviral immunity upon interferon (IFN) secretion. Within PT, cDC and LC
81 collect antigens and sense potential dangers, before trafficking to SLO as migratory (mig) DC
82 and LC, where they reach the T-cell zone to prime and polarize adaptive immune responses
83 together with resident DC (resDC) and pDC (12, 13). These functions critically depend on the
84 appropriate distribution of pDC and pre-cDC across tissues, as well as on cDC and LC
85 patrolling and directed migration to the LN (14). While CCR7 and its ligands CCL19 and
86 CCL21 form the main chemokine (CK) receptor-CK axis controlling pDC and cDC migration
87 to and inside SLO (13, 15-17), additional CK and their receptors are proposed to regulate their
88 location at steady state and in inflammatory settings (11, 13), among which CXCR4 and its sole
89 CK ligand CXCL12 (12, 13, 18-20).

90 CXCR4 is a Gai protein-coupled receptor (12), broadly expressed including in all DC subsets,
91 whose activation by CXCL12 is essential for myelopoiesis (21). The widespread CXCL12 (22)
92 is highly produced by stromal cells (e.g. dermal fibroblasts and BM-derived mesenchymal
93 cells) as well as by endothelial cells and DC (23-28). Genetic deletion and pharmacological

94 blockade have shed light on CXCR4 role in pDC differentiation (29, 30), pDC and pre-cDC
95 retention in the BM (31, 32) and pDC (33), LC (34) and cDC migration (12, 26, 35). Additional
96 insights regarding the importance of CXCR4 in DC were obtained from the WHIM syndrome
97 (WS), a rare immunodeficiency mainly caused by heterozygous autosomal *CXCR4* mutations
98 that lead to CXCR4 carboxyl-terminal domain truncation and subsequent gain of function and
99 impaired desensitization (25, 36, 37). WS manifests by panleukopenia (38, 39) and profuse
100 intractable cutaneous as well as genital Human Papillomavirus (HPV)-induced warts that often
101 evolve towards carcinoma (25, 40, 41, 42, 43, 44). Tassone et al. reported quantitative defects
102 of DC in WHIM patients and suggested that poor type I IFN responses could contribute to their
103 susceptibility toward HPV pathogenesis (45). While these observations point to an important
104 contribution of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in DC biology, its specific role in DC
105 subsets as well as genuine contribution to their functions remain largely overlooked.
106 Here, we have used WS-associated CXCR4 dysfunction (i.e. gain of function and impaired
107 desensitization) as a tool to shed light on the contribution of the CXCL12/CXCR4 signaling
108 axis to DC subset homeostasis and function. We conducted our study using samples from both
109 WHIM patients and *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³ knock-in mice that replicate WS-associated immune-
110 hematological defects (25, 46). We report reduced numbers but preserved function of peripheral
111 pDC in the context of CXCR4 dysfunction, the former likely explained by their entrapment in
112 the BM. While cDC were quantitatively preserved in both WHIM patients and *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³
113 knock-in mice, LC and dermal DC migration to LN was markedly reduced at steady state as
114 well as in a mouse model of HPV-induced dysplasia. In addition, *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³ migDC recovered
115 from LN were markedly more activated than their wildtype (WT) counterparts as a likely
116 consequence of the selective egress of only the most activated DC from the skin of *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³
117 mice. Altogether, our results unravel the critical and specific importance of proper CXCR4
118 signaling for pDC and cDC egress from CXCL12-containing environments and its profound
119 impact on host immune homeostasis.</sup></sup></sup></sup>

120 **Results**

121 **WHIM patients display quantitative defects in circulating pDC but not cDC**

122 We analyzed cDC1, cDC2 and pDC subsets in the blood of four unrelated WHIM patients and
123 nine healthy controls. Patients were panleukopenic as expected (Figure 1A, upper panel; (42)).
124 cDC and pDC counts and frequencies were differently affected in patients' blood. Those of
125 pDC were severely reduced (Figure 1, B and C), as previously reported (45). However, cDC1
126 and cDC2 frequencies were slightly increased and preserved, respectively, and no significant
127 quantitative defect was observed for these blood DC subsets (Figure 1, B and C), as opposed to
128 the reduced percentages and counts reported by Tassone et al. for the whole myeloid DC subset
129 (45). Thus, WS-associated mutations of CXCR4 were associated with a quantitative defect of
130 circulating pDC but not cDC subsets in the blood of the four patients we analyzed.

131 ***Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice reproduce WS-associated DC subsets alterations**

132 We next analyzed splenic DC subsets in knock-in *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice (Figure 2A) that harbor the
133 previously described WS-associated *CXCR4*¹⁰¹³ mutation (25) and model the gain of CXCR4
134 function and panleukopenia reported in patients (46). *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice displayed reduced
135 splenocyte numbers, as previously reported (Supplemental Figure 1A). Both pDC frequency
136 and cellularity were reduced in *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice (Figure 2, B and C). In contrast, the frequency
137 of splenic cDC was significantly increased in these mice (Figure 2B), resulting in an overall
138 preservation of their number (Figure 2C), with no significant alteration in the relative
139 proportion of cDC1 and cDC2 subsets (Supplemental Figure 1B). *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} pDC expressed
140 CD4, CD8 α , CD9 and CCR9 similarly as control pDC, but encompassed a subset of cells
141 expressing low levels of SiglecH (Supplemental Figure 2A), which might reflect a bias toward
142 myeloid pDC-like cells (7). *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} pDC and cDC displayed enhanced chemotaxis towards
143 CXCL12 in transwell assay, as T-cell (Supplemental Figure 2B) and other immune cells (46)
144 also did, which was blocked by the CXCR4-specific AMD3100 antagonist and was not

145 associated with altered CXCR4 cell surface expression level (Supplemental Figure 2C). Further
146 analyses in inguinal LN and thymus also revealed drastic reductions of pDC frequencies and
147 numbers in *Cxcr4^{+/-1013}* mice as compared to their controls while LN resDC and thymic cDC
148 frequencies were preserved (Figure 2, D-I and Supplemental Figure 1, C and D). Similar
149 reduction in pDC frequency and counts was observed in the blood *Cxcr4^{+/-1013}* mice, where
150 reduced pre-cDC counts were also found (Supplemental Figure 3). Thus, in accordance with
151 the observations made for blood DC of WHIM patients, *Cxcr4^{+/-1013}* mice display alterations in
152 the distribution of DC subsets, with a marked quantitative deficit of pDC, which prompted us
153 to further investigate the impact of CXCR4 signaling on their differentiation and trafficking in
154 vivo.

155 **CXCR4 dysfunction limits pDC egress from the BM while preserving their differentiation**

156 To determine whether the reduced peripheral *Cxcr4^{+/-1013}* pDC number resulted from a defect
157 in their production, we next analyzed BM pDC from *Cxcr4^{+/-1013}* and control mice. The
158 frequency of pDC was increased in the BM of *Cxcr4^{+/-1013}* mice, albeit their total numbers
159 remained similar to those of control mice (Figure 3, A and B) as a consequence of low BM
160 cellularity (Supplemental Figure 1E). Pre-cDC frequencies and numbers were preserved. These
161 data indicated that WS-associated CXCR4 dysfunction does not hamper pDC nor pre-cDC
162 differentiation. CXCR4 blockade upon injection of AMD3100 led to peripheral mobilization
163 of pDC and normalization of their circulating counts in *Cxcr4^{+/-1013}* mice (Figure 3C), consistent
164 with the hypothesis that *Cxcr4^{+/-1013}* pDC are trapped in the BM. Of note, medullar pDC from
165 *Cxcr4^{+/-1013}* and control mice similarly expressed low levels of CXCR4 (Supplemental Figure
166 4A), ruling out the hypothesis that *Cxcr4^{+/-1013}* pDC retention would result from increased
167 CXCR4 cell membrane expression. Moreover, the frequency of proliferating cells was reduced
168 among BM pDC from the *Cxcr4^{+/-1013}* mice, whereas that of apoptotic cells was increased as
169 compared to control mice (Supplemental Figure 4, B and C). These data supported the
170 hypothesis that BM *Cxcr4^{+/-1013}* pDC divide less and are more prone to apoptosis, as a potential

171 consequence of their retention in the BM. The latter process would account for the defect of
172 pDC counts in the circulation and SLO, as described for *Cxcr4*^{+/-1013} BM's neutrophils (46),
173 which confirms the reported role of CXCR4 in pDC egress from BM (31).
174 To further investigate the contribution of CXCR4 to pDC trafficking, homing to and residency
175 in LO, we established parabiosis between CD45.2 *Cxcr4*^{+/-1013} and CD45.1 control mice (Figure
176 3, D-F). While non-host chimerism was limited for pDC in the blood of parabionts (Figure 3E)
177 in accordance with their short half-life in circulation (47, 48), it was 2-fold higher in *Cxcr4*^{+/-1013}
178 parabionts than in WT ones. We interpreted this difference as a reflect of the reduced numbers
179 of circulating *Cxcr4*^{+/-1013} pDC (Fig. 3E). In contrast, such relative increase of WT over
180 *Cxcr4*^{+/-1013} pDC was observed neither in the BM nor in the spleen of *Cxcr4*^{+/-1013} parabionts,
181 raising the possibility that the CXCR4 dysfunction might affect pDC entry into these organs.
182 We addressed this question by calculating spleen/blood ratios (i.e. cells in (non-)host
183 organ/circulating cells in (non-)host blood) as previously done in (49), which allowed to
184 normalize for cell chimerism. These ratios were similar for *Cxcr4*^{+/-1013} and WT pDC whatever
185 the genetic background of the spleen, pointing to similar entry and residency of these cells in
186 this LO. This contrasted with non-classical Ly6C^{lo} monocytes ratios (Figure 3F) that confirmed
187 the previously reported impact of CXCR4 dysfunction on the trafficking of these cells (49).
188 Thus, the peripheral quantitative defects in pDC in the context of CXCR4 dysfunction likely
189 results from altered pDC egress from the BM, while their differentiation as well as entry and
190 residency in the spleen are preserved.

191 ***Cxcr4*^{+/-1013} pDC display efficient innate functions**

192 Most WHIM patients suffer from severe HPV-associated pathogenesis, suggesting impaired
193 anti-viral responses. We thus investigated the impact of CXCR4 dysfunction on pDC functions.
194 Upon TLR9 engagement by CpG DNA, pDC isolated from the spleen of *Cxcr4*^{+/-1013} mice
195 tended to produce less IFN- α than control pDC (Figure 4A, left panel). However, these cells
196 survived less in the culture (Figure 4A, right panel) and were more prone to death than control

197 pDC, as suggested by the higher level of cleaved caspase 3 they harbored (Figure 4B). In
198 addition, BM-derived pDC-like cells generated from *Cxcr4^{+/-1013}* and control mice produced
199 similar level of IFN- α upon TLR9 engagement (Figure 4C). Together, these experiments
200 suggest that *Cxcr4^{+/-1013}* pDC display preserved IFN- α responses.

201 We next tested the impact of CXCR4 dysfunction on the capacity of pDC to initiate innate
202 immune responses *in vivo*, in a model of CpG-induced inflammation in which pDC are
203 instrumental for both myeloid cell recruitment to the peritoneum and NK cell activation (50).
204 Upon CpG injection, both *Cxcr4^{+/-1013}* mice and their controls showed increased cellularity as
205 well as marked changes in the type of cells recovered in peritoneal lavages as compared to the
206 vehicle (Veh) treated mice (Figure 4, D and E). Albeit three-fold less pDC were present in the
207 peritoneum of *Cxcr4^{+/-1013}* than of WT CpG-injected mice, the recruitment of inflammatory
208 myeloid cells as well as the decrease in resident macrophages were in a similar range in these
209 mice (Figure 4F). Accordingly, the concentrations of inflammatory chemokines were similarly
210 increased in the sera of *Cxcr4^{+/-1013}* and WT CpG-injected mice (Figure 4G). Furthermore,
211 splenic pDC from these mice overexpressed MHC2 molecules and CD86 at equivalent levels
212 (Figure 4, H and I). Moreover, CD69⁺ activated NK cells were also detected at similar
213 frequency in these mice (Figure 4J). Thus, despite quantitative defect, *Cxcr4^{+/-1013}* pDC got
214 recruited into the peritoneum, activated and initiated a systemic inflammation upon TLR9
215 engagement *in vivo* as their WT counterparts did, supporting the conclusion that CXCR4
216 desensitization is dispensable for their innate functions.

217 **CXCR4 dysfunction promotes skin inflammation without affecting DC activation state**

218 Considering the skin-associated symptoms that manifest in WHIM patients, we next
219 investigated the impact of CXCR4 dysfunction on skin DC subsets and LC. We used K14-
220 HPV16 transgenic mice (51-53) that model the HPV-induced epidermal lesions and chronic
221 inflammation. The marked increase in flank epidermis thickness of HPV-transgenic mice was
222 worsened in the *Cxcr4^{+/-1013}* background (Figure 5A) and associated with higher numbers of

223 dermal CD3⁺ T cells as compared to HPV mice (53), which were CD3^{dim} as expected (54)
224 (Supplemental Figure 5, A-C).
225 These observations suggested an increased inflammation in the skin of K14-HPV16 *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³
226 (HPV+/1013) mice as compared to their WT counterparts (HPV). In epidermal sheets, LC
227 density was diminished in the context of HPV-induced dysplasia and their round morphology
228 with short dendrites reflected their activation, independently of CXCR4 functioning (Figure
229 5B). We next analyzed DC subsets and LC in skin cell suspensions (Supplemental Figure 5D).
230 pDC were very rare in the skin of these mice, whatever their genotype (not shown). HPV-
231 induced dysplasia led to an accumulation of both DC subsets and LC (Figure 5D). The
232 frequencies of cDC1, cDC2 and LC among CD45⁺ cells and their numbers per mg of tissue did
233 not differ according to CXCR4 genotype, albeit cDC1 and LC tended to accumulate more in
234 HPV+/1013 than in HPV mice (Figure 5, C and D). In the HPV context, MHC2 molecules
235 expression levels were decreased in cDC2 and LC, while such reduction was observed in cDC1
236 from HPV but not HPV+/1013 mice (Figure 5, E and F, upper panels). CD80 expression levels
237 were upregulated in cDC1, cDC2 and LC from HPV and HPV+/1013 mice, as those of CD86
238 in LC and cDC1 (Figure 5, E and F, middle and lower panels). Taken together, these results
239 show that skin DC compartment is generally preserved in the *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³ context, in terms of
240 both quantity and activation state, despite the worsening of HPV-associated skin inflammation
241 in the context of CXCR4 dysfunction.</sup></sup>

242 **Skin DC and LC migration is impaired by CXCR4 dysfunction**

243 We next assessed the impact of CXCR4 dysfunction on the migration of skin DC to draining
244 lymph nodes (SDLN) (Figure 6A). Both the frequency and number of migDC were reduced in
245 the SDLN of *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³ (extending results presented in Figure 2D) and HPV+/1013 mice as
246 compared to their control counterparts (Figure 6, A-C). To address whether the reduction in
247 migDC numbers resulted from a defect in *Cxcr4*<sup>+/¹⁰¹³ DC migration to SDLN, we performed
248 FITC painting experiments in *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³ and WT mice (Figure 6D). In support of this}</sup></sup>

249 hypothesis, the number of FITC-positive (FITC⁺) migDC1 and migDC2 + LC recovered from
250 the SDLN of *Cxcr4^{+/-1013}* mice was strongly reduced (Figure 6E), similarly to that of the FITC-
251 negative (FITC⁻) DC. This diminution was not associated with reduced CCR7 or CXCR4
252 expression levels (Figure 6F). Altogether, these results point to a role for CXCR4 in skin DC
253 migration to and/or entry in SDLN from *Cxcr4^{+/-1013}* mice, both at steady state and in the course
254 of acute (i.e. FITC-treatment associated) as well as chronic (i.e. HPV-induced) inflammation.

255 **CXCR4 dysfunction fosters the arrival of highly activated migDC to SDLN**

256 We further questioned the role of CXCR4 in the activation state of migDC. MigDC from HPV
257 mice displayed reduced MHC2 molecules levels as compared to WT mice (Figure 7, A and B),
258 in accordance with the tolerogenic phenotype previously reported in HPV-transgenic mouse
259 models (55, 56). ResDC and pDC from HPV mice also displayed lower MHC2 molecules levels
260 than their controls (Figure 7, B and C), pointing to a systemic effect of HPV-induced
261 inflammation on DC subset activation state. In marked contrast, MHC2 molecules levels were
262 not decreased in migDC, resDC and pDC from HPV^{+/1013} mice. Moreover, migDC from
263 HPV^{+/1013} mice displayed an activated phenotype with higher expression levels of CD80 and
264 CD86 than those from HPV mice. Such increase of costimulatory molecules as well as CCR7
265 expression affected both migDC1 and migDC2 + LC cells, albeit it was statistically significant
266 only in migDC1 (Figure 7 D). Remarkably, this pattern was also found in migDC from
267 *Cxcr4^{+/-1013}* mice, suggesting that it did not solely result from the increase in skin inflammation
268 we report in HPV^{+/1013} mice (Supplemental Figure 5). This prompted us to investigate
269 whether *Cxcr4^{+/-1013}* DC were intrinsically more prone to activation than their WT counterparts.
270 cDC1-like and cDC2-like BMDC generated from *Cxcr4^{+/-1013}* and control mice were similarly
271 activated by TLR4 and TLR8 agonists, whether or not CXCL12 was added to the culture
272 medium to activate CXCR4 (Figure 7E). Altogether, these experiments suggest that the
273 increased activation level of DC in the LN from *Cxcr4^{+/-1013}* mice does not result from an

274 intrinsically higher capacity to get activated, but rather from their altered dynamics of
275 migration.

276 **Discussion**

277 In this study, we have taken advantage of patient-derived CXCR4 dysfunction associated with
278 high susceptibility toward HPV pathogenesis to investigate the role of CXCR4 in DC biology.
279 Our results identify prominent and subset-specific effects of CXCR4 on DC distribution and
280 function, that underpins adequate immune homeostasis and function. They notably reveal that
281 the CXCL12/CXCR4 axis sets a threshold for both pDC egress from the BM to the periphery
282 and cDC migration from the dermis to SDLN, which has profound impact on migDC activation
283 state.

284 Our results provide the first demonstration that CXCR4 activity regulates the abundance of
285 peripheral pDC both in human and mouse, presumably through the control of pDC egress from
286 the BM but does not alter their entry nor residency in the spleen. We rule out the hypothesis
287 that the peripheral pDC reduction in *Cxcr4^{+/-1013}* mice results from a defect in their production,
288 as pDC frequencies are increased and their number preserved in the BM. Nevertheless, a
289 qualitative change in the pDC compartment with a bias toward myeloid differentiation (7) could
290 explain the fact that spleen pDC from *Cxcr4^{+/-1013}* mice express lower SiglecH levels than their
291 WT counterparts. Chopin et al. (31) had previously reported that the level of CXCR4 expression
292 by pDC regulates their retention in the BM. Our study shows that WS-associated CXCR4
293 dysfunction mimics the consequences of defective CXCR4 downregulation observed upon
294 RUNX2 deletion in pDC, thus highlighting the critical importance of the proper regulation of
295 CXCR4/CXCL12 signaling axis in pDC trafficking. In a model of CpG-induced inflammation
296 that strictly depends on pDC (50), we demonstrate that *Cxcr4^{+/-1013}* pDC can be mobilized and
297 activated upon acute stimulation *in vivo*, and that they are able to induce inflammatory
298 responses and activate NK cells to the same extent as WT pDC. In addition, *Cxcr4^{+/-1013}* pDC
299 produce IFN- α upon TLR9 engagement as efficiently as their control counterparts. Thus, our
300 results do not support intrinsic pDC dysfunction as the mechanism contributing to WHIM

301 patients' susceptibility to infectious diseases, albeit reduced pDC numbers early in the course
302 of infection might delay the setting up of immune responses.

303 While our report regarding circulating pDC reduction in WHIM patients is in accordance with
304 previous findings from Tassone et al., it opposes to their conclusion that circulating cDC
305 frequency and number decrease in these patients (45). Indeed, our analysis of circulating DC
306 frequency identifies an increase for cDC1 and a preservation for cDC2 in WHIM patients as
307 compared to healthy donors, and their numbers were preserved as well. This discrepancy might
308 be explained by the fact that we used a more complete antibody panel than Tassone et al. to
309 identify cDC1 and cDC2 subsets. Supporting and extending our data in human, the frequency
310 of cDC was increased in the spleen of *Cxcr4^{+/-1013}* mice. These results are consistent with the
311 preserved myeloid differentiation previously reported in these mice and may also partly result
312 from local extramedullar hematopoiesis (57). Our data further show that the numbers, but not
313 frequencies, of circulating pre-cDC were reduced by CXCR4 dysfunction, which is in
314 accordance with the role reported for CXCR4 in their retention in the BM (32, 58).
315 Nevertheless, the resDC compartment was overall preserved in both lymphoid and non-
316 lymphoid tissues from *Cxcr4^{+/-1013}* mice, in support of efficient local differentiation of pre-cDC
317 and, in the skin, as a possible result of cDC entrapment and accumulation.

318 WHIM patients suffer from severe and persistent skin infections, including HPV-induced warts
319 (39, 42-44) and CXCR4 has been reported to regulate LC and dermal DC migration to dermis
320 and LN, respectively (26, 34). Our results show that the WS-associated CXCR4 dysfunction is
321 associated with a marked reduction in DC and LC migration from skin to SDLN, with a
322 tendency for cDC1 and LC accumulation in the context of HPV-induced inflammation. This
323 could be due to DC and LC entrapment in the dermis where CXCL12 is produced (23-28),
324 despite their expression of CCR7 and as a consequence of a possibly skewed balance between
325 several chemotactic signals. In support of this hypothesis, Ricart et al. have reported that *in*
326 *vitro* counter-gradients of CXCL12 and CCL19/CCL21 can result in the homing of DC in a

327 central zone, where chemokine-derived signals are balanced (59). Moreover, the levels of
328 CXCL12 were shown to be higher in the dermis of *Cxcr4^{+/-1013}* mice as compared to their
329 controls (27), suggesting that DC entrapment could arise from the combined effect of high
330 CXCL12 quantities in the dermis and exacerbated CXCR4-dependent signaling. As CXCL12
331 was shown to be expressed by endothelial cells from lymphatics (26), migDC may also be
332 trapped in these vessels on their way to LN. Altogether, our data suggest that proper CXCR4
333 regulation controls skin immune homeostasis by setting up a threshold for cDC and LC
334 migration from the dermis to SDLN.

335 Strikingly, CXCR4 dysfunction is associated with a profound alteration in the activation level
336 of the DC subsets and LC recovered from SDLN, with specific features in steady state and
337 chronic (i.e. HPV-induced) inflammation. Firstly, CXCR4 dysfunction results in increased
338 expression of co-stimulatory molecules by migDC, but not by resDC nor pDC, recovered from
339 SDLN. This occurs both at steady state and in the context of HPV-induced inflammation, ruling
340 out the hypothesis that the high activation level of migDC is simply due to the increased
341 inflammation we observe in the skin of HPV⁺/1013 mice. Upon in vitro stimulation, DC
342 derived from *Cxcr4^{+/-1013}* mice were similarly activated as their WT counterparts, whether
343 CXCL12 was added to the culture medium or not, suggesting that the increased activation level
344 of *Cxcr4^{+/-1013}* migDC in SDLN is not intrinsically programmed. Accordingly, the phenotype
345 analysis of skin DC and LC did not reveal major differences between mice harboring CXCR4
346 dysfunction and their WT counterparts. Thus, we propose that the high expression of co-
347 stimulatory molecules by *Cxcr4^{+/-1013}* migDC would result from a stringent selection of skin DC
348 exiting from the skin, meaning that only the most activated ones would be able to quit the
349 CXCL12-enriched dermis and reach the LN. Secondly, CXCR4 dysfunction also markedly
350 impacts on MHC2 molecules expression by SDLN DC in the context of chronic inflammation.
351 Indeed, HPV-induced inflammation was associated with a marked down-regulation of MHC2
352 molecules expression by skin DC, as expected from previous studies using HPV16 E7-

353 transgenic mice (55, 56) and independently of CXCR4 status. Such tolerogenic state of DC was
354 reported to promote skin graft tolerance (60) and could be part of the escape mechanisms
355 developed by HPV to limit anti-viral responses. However, while MHC2 molecules
356 downregulation was also present in SDLN migDC, resDC and pDC of HPV mice, this pattern
357 was not found in either of these subsets in the context of CXCR4 dysfunction (*i.e.* HPV+/1013
358 mice). This lack of tolerogenic profile affecting all LN DC might be a distal consequence of
359 the exacerbated skin inflammation we show here and reported previously in HPV+/1013 mice
360 (53). This worsening of HPV-induced pathogenesis might arise from the cumulative effects of
361 the mutant CXCR4 pro-carcinogenic properties in keratinocytes (61, 62) and impact on
362 stromal and immune cells, which could be further fostered by highly activated migDC
363 promoting inflammation in HPV+/1013 mice.

364 The alterations in DC biology we report here in the context of CXCR4 dysfunction may provide
365 mechanistic clues to explain the high susceptibility of WHIM patients to HPV-induced
366 pathogenesis. Indeed, the reduction in DC numbers reaching SDLN combined with their high
367 activation level due to CXCR4 dysfunction might hamper HPV-specific T-cell responses
368 involved in lesion control (63). Thus, an inefficient priming of HPV-specific T-cell responses
369 due to scarce numbers of DC reaching the LN (64) combined with the previously reported
370 defective DC-T cells interactions when T cells express WS-associated CXCR4 mutations (65)
371 could contribute to the development and persistence of widespread warts. Moreover, while
372 resident memory T cells (Trm) are involved in the local control of HPV (66), excessively
373 activated DC may be defective at CD8 T-cell preconditioning for Trm differentiation (67).
374 Inadequately activated DC may also prime inappropriate T-cell responses or fail in tolerance
375 induction (68, 69). In support of the hypothesis that CXCR4 dysfunction can exacerbate
376 immune responses, an increase in the generation of antigen-specific plasma cells was reported
377 in the SLO of *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice, albeit it did not allow for long-term humoral protective
378 immunity (70). This opens up the possibility that WHIM patients, who often develop skin

379 inflammatory conditions (43), might paradoxically suffer from a lack of tolerance towards their
380 skin microbiota, which includes HPV virome (71, 72), combined with defects in the mounting
381 of anti-infectious immune responses.

382 A functional restoration of the DC compartment might explain the spontaneous cure of HPV-
383 induced warts reported in a WHIM patient who fortuitously lost the mutated *CXCR4* allele in a
384 single myeloid progenitor that eventually repopulated the complete myeloid repertoire (40).
385 Indeed, the critical role of DC in the priming of adaptive immune response argues in favor of a
386 major contribution of skin DC migration recovery to the beneficial effects of this chromothriptic
387 event (73), albeit other myeloid cells might also have played a role. Our work also suggests that
388 normalizing the traffic of pDC as well as of skin DC and LC, together with their activation by
389 TLR7 engagement, could be part of the mechanisms accounting for the beneficial effects of
390 WHIM patients' treatment with AMD3100 combined with imiquimod on HPV-induced lesions
391 and HPV cancer progression (74), while either treatment is inefficient when used alone (43).

392 In conclusion, our results unravel the critical control exerted by *CXCR4* functioning on DC
393 egress from CXCL12-containing environments and its consequence on DC biology. In addition
394 to providing mechanistic cues that may explain WS physiopathology, our work sheds light on
395 the basic mechanisms that control pDC homeostasis as well as dermal DC and LC function and
396 on the profound impact of skin DC migration dynamics on their activation state and thus their
397 capacity to initiate well-balanced immune responses.

398 **Methods**

399 **Mice**

400 *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice harboring a heterozygous mutation of the *Cxcr4* gene on the C57BL/6J and
401 FVB/N genetic backgrounds were previously described (46, 53). K14-HPV16 transgenic mice
402 expressing HPV early genes under the control of the keratin 14 promoter (51, 52) were obtained
403 from the NCI mouse repository and maintained on the FVB/N genetic background. K14-
404 HPV16 *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice were obtained by crossing *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} FVB/N mice with K14-HPV16
405 mice (53). *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} mice were genotyped by PCR (KAPA mouse genotyping kit, Sigma-
406 Aldrich) (46). Except the parabiosis experiments, all experimental procedures were conducted
407 in the AnimEx animal facility (agreement no. B 92-023-01) in accordance with the European
408 Union's legislation regarding the use of laboratory animals and approved by the Institutional
409 Animal Care and Ethic Committee CEEA26 (Institut Gustave Roussy, France). Parabiosis
410 experiments were performed in the Biological Resource Centre (BRC) of A* STAR, under the
411 approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of the BRC, in accordance with
412 the guidelines of the Agri-Food and Veterinary Authority (AVA) and the National Advisory
413 Committee for Laboratory Animal Research of Singapore. Data were obtained from 7-14-week-
414 old male and female mice, in experiments comparing *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} and HPV^{+/¹⁰¹³} mice to their
415 littermate *Cxcr4*^{+/⁺} and HPV controls.

416 **Parabiosis**

417 Female CD45.2 *Cxcr4*^{+/¹⁰¹³} and CD45.1 control mice were anesthetized using 2.5% Avertin
418 (15 mL/kg) and surgically joined as previously described (49). Mice were then injected
419 subcutaneously with Baytril and Buprenorphine (0.05-2 mg/kg and 5-20 mg/kg respectively).
420 After 8 weeks, blood was recovered from each parabiont. Spleen and BM were harvested after
421 perfusion. The blood volume present in each individual mouse was calculated using the
422 formula: blood volume (mL) = 0.0715 x body weight (g) (75). Spleen/blood ratios were

423 calculated as the number of cells in (non-)host organ divided by the number of cells in (non-
424)host blood, as described by Chong and colleagues (49).

425 **In vivo blood cell mobilization**

426 Mice were injected intraperitoneally with AMD3100 (0.4 or 0.8 mg/kg; Sigma-Aldrich) or
427 PBS. Two hours later, peripheral blood was collected, red blood cells were lysed and leucocytes
428 were labeled for flow cytometry.

429 **FITC painting assays**

430 Two days before FITC application, mice abdomens and flanks were shaved. At day 0, a solution
431 of FITC (1 mg/mL in acetone; Merck) was mixed v/v with Dibutylphthalate and 100 μ L were
432 applied on mice abdomen. Mice were euthanatized 24h later and inguinal LN were collected
433 and prepared for flow cytometry.

434 **Mouse samples isolation**

435 Blood was recovered from anesthetized mice at the retro-orbital sinus. For spleen and LN,
436 single cell suspensions were prepared upon incubation with collagenase D (1 mg/mL, Roche)
437 for 30 minutes. BM cells were recovered by flushing the femurs and tibia with PBS. Peritoneal
438 cells were recovered using PBS- EDTA (2 mM). Ear skin cell isolation was performed as
439 previously described (54). Dorsal and ventral halves of ear skin were incubated dermal side
440 down in dispase (2.5 U/mL, Gibco) for 90 min at 37°C. Epidermis and dermis were separated
441 and cut into small pieces, then digested in 1 mg/mL collagenase D and 12.5 U/mL DNase I
442 (Roche) for 1 h at 37°C. Cell suspensions were further disrupted with 18-G syringes, incubated
443 15 min at 37°C and filtered through a 70 μ m cell strainer. Cells were used for flow cytometry,
444 functional tests or magnetic cell sorting with autoMACS using anti-CD11c and anti-PDCA-1
445 MicroBeads (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's instructions. Flt3-L-derived BMDC
446 were obtained using murine recombinant Flt3-L (R&D System) as described in Brasel et al.

447 (76). To differentiate CD103⁺ cDC1-like and CD11b⁺ cDC2-like BMDC, the protocol reported
448 in Mayer et al. (77) using murine recombinant Flt3-L and GM-CSF was used.

449 **Epidermal sheets**

450 Epidermal sheets from ear skin were prepared as previously described (54). After splitting ears
451 into dorsal and ventral halves, they were incubated dermal side down in 0.5 M ammonium
452 thiocyanate for 30 min at 37°C. Epidermal sheets were separated from the dermis and fixed in
453 acetone for 20 min at -20°C. Tissue was incubated with PBS 5% BSA (blocking buffer) for 1h
454 at RT, then with anti-CD207 antibody at 4°C overnight. After washing, epidermal sheets were
455 incubated with anti-rat Alexa Fluor 594 secondary antibody and Hoescht 33342 and mounted
456 on slides using Permafluor Mounting medium (ThermoFisher Scientific). Images were acquired
457 with a confocal microscope (Leica SP8) and analyzed with ImageJ.

458 **Transwell assays**

459 Chemotaxis tests were done as previously described (46). Briefly, splenocytes were incubated
460 for one hour at 37°C in resensitization medium (20 nM Hepes and 0,5% BSA in RPMI 1670
461 medium). One million cells were distributed in the transwells (5 µm pore size) of a Corning
462 Costar plate after filling the lower wells with 10 nM, 50 nM or 100 nM of CXCL12 (R&D
463 Systems). AMD3100 (1 µM, Sigma-Aldrich) was added in control wells. After two hours of
464 incubation at 37°C, cell migration was analyzed by flow cytometry.

465 **DC activation *in vitro* and *in vivo***

466 Splenic pDC enriched by magnetic sorting (10⁴ cells/well) and Flt3-L-derived BMDC (10⁴
467 cells/well) were stimulated *in vitro* with 2 µg of CpG-A 2216 (Invivogen, Cayla). For *in vivo*
468 stimulation, mice were injected intraperitoneally with 20 µg of CpG-A 2216 in complex with
469 30 µg of DOTAP liposome (Sigma-Aldrich) as previously described (50), while control mice
470 received DOTAP only. For cDC1-like and cDC2-like activation, BMDC were incubated for 22
471 hours with LPS-EK or ssRNA/LyoVec (100 ng/mL and 5 µg/mL, respectively; Invivogen).

472 **Cytokine quantification**

473 IFN- α concentrations in cell supernatants and CCL2, CCL4 and CXCL10 concentrations in
474 mouse serum were quantified using Mouse IFN alpha Platinum ELISA kit (eBioscience) and
475 U-PLEX Chemokine Combo Mouse (Meso Scale Discovery), respectively.

476 **Flow cytometry**

477 Murine cells were suspended at 10^7 cells/mL in PBS-FCS 2%, incubated with anti-CD16/32
478 (2.4G2 clone) monoclonal antibodies (mAb), and further stained for 30min at 4°C with
479 adequate combinations of the mAbs (Supplemental Table 1) and dead cells were detected using
480 Fixable Viability Dye eFluor® 506. For intracellular staining (CD207), cells were fixed (BD
481 Bioscience® fixation permeabilization buffer) for 30 minutes at 4°C. Events were acquired on
482 LSR Fortessa (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed using the FlowJo Software (10.6
483 version; Tree Star Inc.).

484 **Histology**

485 Ears or skin from the flank were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Fisher Scientific) for
486 a minimum of 24 h, embedded in paraffin, and cut into 5- μ m-thick sections. Sections were first
487 deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin-eosin (HE). Slides were scanned by
488 the digital scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu, Massy, France) using 40x objective and
489 images were analyzed with the NDP.view2 software.

490 **Statistics**

491 Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Prism software
492 (GraphPad). The two-tailed Mann-Whitney test and paired t test were used to compare unpaired
493 and paired data, respectively.

494 **Human samples**

495 WHIM patients were recruited from the French Severe Chronic Neutropenia Registry (Pr J.
496 Donadieu), approved by the “Commission Nationale de l’Informatique et des Libertés”. They
497 provided written informed consent for genetic testing and inclusion in the registry. The four
498 WHIM patients studied were carrying mutations in the *CXCR4* gene (patient P1: c.1000C>T,
499 p.Arg334* ; P2 and P3: c.1013dup, p.Ser339Ilefs*; and P4:c.1013C>G, p.Ser338*) and have
500 been previously described (42, 57). Blood samples were collected in lithium-heparin coated
501 tubes. For each patient’s sample treated, a sample from a healthy donor was collected at the
502 same time and place for parallel analysis. Automated blood cell counting was performed. For
503 DC immunophenotyping, 300 µL of whole blood were incubated with fluorochrome-
504 conjugated anti-human antibodies (Supplemental Table 1). After 30 minutes of staining at 4°C,
505 OptiLyse C (Beckman Coulter, Villepinte, France) was added to eliminate red blood cells.
506 Leukocytes were washed thrice with PBS and the whole sample was acquired on a LSR Fortessa
507 cytometer (BD Biosciences). DC subpopulations were identified among CD3⁻CD19⁻CD14⁻
508 HLA-DR⁺ cells. Conventional DC1 (cDC1) were defined as CD11c⁺CD141⁺ cells, cDC2 as
509 CD11c⁺CD1c⁺ cells and pDC as CD11c⁻CD303⁺ cells.

510 **Author Contributions**

511 C. Gallego and M. Vétillard designed and performed experiments, analyzed data and
512 contributed to manuscript writing; J. Calmette, M. Roriz, M-L. Aknin, N. Pionnier, M. Evrard,
513 and M. Lefrançois designed and performed experiments and analyzed data. V. Marin-Esteban
514 designed and performed experiments with patients' samples, analyzed data and contributed to
515 manuscript writing; F. Mercier-Nomé performed histology experiments and analyzed data; Y.
516 Bertrand, F. Suarez, and J. Donadieu provided blood samples from healthy donors and WHIM
517 patients and reviewed the manuscript; K. Balabanian reviewed the manuscript; F. Bachelerie
518 helped with the study design, data analysis and writing of the manuscript and found funding for
519 the study; G. Schlecht-Louf conceived and supervised the study, designed and performed
520 experiments, analyzed data, found funding for the study and wrote the manuscript. The first
521 author position was assigned on the basis of the number of experiments performed, analyzed
522 and interpreted as well as of the contribution to the setting up of the techniques used. This
523 position is shared by Carmen Gallego and Mathias Vétillard (in alphabetical order).

524 **Acknowledgements**

525 We thank Hélène Gary (Plaimmo, UMS/Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique (IPSIT),
526 Chatenay-Malabry, France), Sarah Mendez and Baptiste Lecomte (Animex, UMS/IPSIT) for
527 excellent technical assistance. We thank Floriane Meuris for backcrossing *Cxcr4⁺¹⁰¹³* mice
528 onto FVB/N genetic background. We are grateful to Matthieu Bertrand, Patrice Hémon and
529 Chloé Lourenço for performing preliminary experiments.

530

531 **References**

- 532 1. Steinman RM, and Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*.
533 2007;449(7161):419-26.
- 534 2. Williams M, Dutertre CA, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al.
535 Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and
536 Species. *Immunity*. 2016.
- 537 3. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, and Mortha A. The dendritic cell lineage:
538 ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and
539 the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604.
- 540 4. Brown CC, Gudjonson H, Pritykin Y, Deep D, Lavalley VP, Mendoza A, et al.
541 Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. *Cell*.
542 2019;179(4):846-63 e24.
- 543 5. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function.
544 *Immunity*. 2019;50(1):37-50.
- 545 6. Dress RJ, Dutertre CA, Giladi A, Schlitzer A, Low I, Shadan NB, et al. Plasmacytoid
546 dendritic cells develop from Ly6D(+) lymphoid progenitors distinct from the
547 myeloid lineage. *Nat Immunol*. 2019;20(7):852-64.
- 548 7. Rodrigues PF, Alberti-Servera L, Eremin A, Grajales-Reyes GE, Ivanek R, and
549 Tussiwand R. Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of
550 plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol*. 2018;19(7):711-22.
- 551 8. Murphy TL, Grajales-Reyes GE, Wu X, Tussiwand R, Briseno CG, Iwata A, et al.
552 Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. *Annu Rev Immunol*.
553 2016;34:93-119.
- 554 9. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, et al. Adult Langerhans cells
555 derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor
556 contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*. 2012;209(6):1167-81.
- 557 10. Segura E, and Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans.
558 *Trends Immunol*. 2013;34(9):440-5.
- 559 11. Swiecki M, and Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic
560 cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):471-85.
- 561 12. Alvarez D, Vollmann EH, and von Andrian UH. Mechanisms and consequences of
562 dendritic cell migration. *Immunity*. 2008;29(3):325-42.
- 563 13. Worbs T, Hammerschmidt SI, and Forster R. Dendritic cell migration in health and
564 disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):30-48.
- 565 14. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates
566 function. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(2):89-103.
- 567 15. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs
568 skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions.
569 *Immunity*. 2004;21(2):279-88.
- 570 16. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Ugucconi M, Lipp M, Lanzavecchia A,
571 et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on
572 T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*. 2003;198(4):615-21.
- 573 17. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al. Mice
574 lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in
575 lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*. 1999;189(3):451-60.
- 576 18. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, et al. Differing
577 activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte
578 and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol*.
579 2002;169(1):424-33.

- 580 19. Stutte S, Quast T, Gerbitzki N, Savinko T, Novak N, Reifenberger J, et al.
581 Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous
582 dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(19):8736-41.
- 583 20. Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere
584 F, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell
585 responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-
586 1)/CXCL12. *J Exp Med*. 2003;198(5):823-30.
- 587 21. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al.
588 Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the
589 CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-8.
- 590 22. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al.
591 Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*.
592 2015;347(6220):1260419.
- 593 23. Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, et al. Stromal-cell
594 derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am*
595 *J Pathol*. 1999;155(5):1577-86.
- 596 24. Avniel S, Arik Z, Maly A, Sagie A, Basst HB, Yahana MD, et al. Involvement of the
597 CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J Invest Dermatol*.
598 2006;126(2):468-76.
- 599 25. Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, et al. WHIM
600 syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4
601 desensitization to CXCL12. *Blood*. 2005;105(6):2449-57.
- 602 26. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, et al. CXCL12-
603 CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J*
604 *Pathol*. 2007;171(4):1249-57.
- 605 27. Pionnier N, Brotin E, Karadjian G, Hemon P, Gaudin-Nome F, Vallarino-Lhermitte
606 N, et al. Neutropenic Mice Provide Insight into the Role of Skin-Infiltrating
607 Neutrophils in the Host Protective Immunity against Filarial Infective Larvae. *PLoS*
608 *Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004605.
- 609 28. Gombert M, Dieu-Nosjean MC, Winterberg F, Bunemann E, Kubitzka RC, Da Cunha
610 L, et al. CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and
611 Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol*.
612 2005;174(8):5082-91.
- 613 29. Kohara H, Omatsu Y, Sugiyama T, Noda M, Fujii N, and Nagasawa T. Development
614 of plasmacytoid dendritic cells in bone marrow stromal cell niches requires
615 CXCL12-CXCR4 chemokine signaling. *Blood*. 2007;110(13):4153-60.
- 616 30. Minami H, Nagaharu K, Nakamori Y, Ohishi K, Shimojo N, Kageyama Y, et al.
617 CXCL12-CXCR4 Axis Is Required for Contact-Mediated Human B Lymphoid and
618 Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation but Not T Lymphoid Generation. *J*
619 *Immunol*. 2017;199(7):2343-55.
- 620 31. Chopin M, Preston SP, Lun AT, Tellier J, Smyth GK, Pellegrini M, et al. RUNX2
621 Mediates Plasmacytoid Dendritic Cell Egress from the Bone Marrow and Controls
622 Viral Immunity. *Cell reports*. 2016.
- 623 32. Nakano H, Lyons-Cohen MR, Whitehead GS, Nakano K, and Cook DN. Distinct
624 functions of CXCR4, CCR2, and CX3CR1 direct dendritic cell precursors from the
625 bone marrow to the lung. *J Leukoc Biol*. 2017;101(5):1143-53.
- 626 33. Umemoto E, Otani K, Ikeno T, Verjan Garcia N, Hayasaka H, Bai Z, et al. Constitutive
627 plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively
628 regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. *J Immunol*. 2012;189(1):191-
629 9.

- 630 34. Ouwehand K, Santegoets SJ, Bruynzeel DP, Scheper RJ, de Gruijl TD, and Gibbs S.
631 CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to
632 dermis. *Eur J Immunol.* 2008;38(11):3050-9.
- 633 35. Tiberio L, Del Prete A, Schioppa T, Sozio F, Bosisio D, and Sozzani S. Chemokine and
634 chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(4):346-
635 52.
- 636 36. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al.
637 Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM
638 syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet.* 2003;34(1):70-4.
- 639 37. Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, et al.
640 CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the
641 enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood.* 2008;112(1):34-44.
- 642 38. Bachelerie F. CXCL12/CXCR4-axis dysfunctions: Markers of the rare
643 immunodeficiency disorder WHIM syndrome. *Dis Markers.* 2010;29(3-4):189-98.
- 644 39. Dotta L, Tassone L, and Badolato R. Clinical and genetic features of Warts,
645 Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr
646 Mol Med.* 2011;11(4):317-25.
- 647 40. McDermott DH, Gao JL, Liu Q, Siwicki M, Martens C, Jacobs P, et al. Chromothriptic
648 cure of WHIM syndrome. *Cell.* 2015;160(4):686-99.
- 649 41. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, and Lagane B. CXCR7
650 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling.
651 *Blood.* 2009;113(24):6085-93.
- 652 42. Beaussant Cohen S, Fenneteau O, Plouvier E, Rohrlich PS, Daltroff G, Plantier I, et
653 al. Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from
654 the French Severe Chronic Neutropenia Registry. *Orphanet J Rare Dis.*
655 2012;7(1):71.
- 656 43. McDermott DH, and Murphy PM. WHIM syndrome: Immunopathogenesis,
657 treatment and cure strategies. *Immunol Rev.* 2019;287(1):91-102.
- 658 44. Dotta L, Notarangelo LD, Moratto D, Kumar R, Porta F, Soresina A, et al. Long-Term
659 Outcome of WHIM Syndrome in 18 Patients: High Risk of Lung Disease and HPV-
660 Related Malignancies. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(5):1568-77.
- 661 45. Tassone L, Moratto D, Vermi W, De Francesco M, Notarangelo LD, Porta F, et al.
662 Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia,
663 infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood.* 2010;116(23):4870-
664 3.
- 665 46. Balabanian K, Brotin E, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Lainey E, Fenneteau O, et al.
666 Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and
667 peripheral compartmentalization in mice. *Blood.* 2012;119(24):5722-30.
- 668 47. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermontprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In
669 vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science.*
670 2009;324(5925):392-7.
- 671 48. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, and Nussenzweig M. Origin of dendritic cells
672 in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol.* 2007;8(6):578-83.
- 673 49. Chong SZ, Evrard M, Devi S, Chen J, Lim JY, See P, et al. CXCR4 identifies transitional
674 bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for
675 peripheral responses. *J Exp Med.* 2016;213(11):2293-314.
- 676 50. Guillerey C, Mouries J, Polo G, Doyen N, Law HK, Chan S, et al. Pivotal role of
677 plasmacytoid dendritic cells in inflammation and NK-cell responses after TLR9
678 triggering in mice. *Blood.* 2012;120(1):90-9.

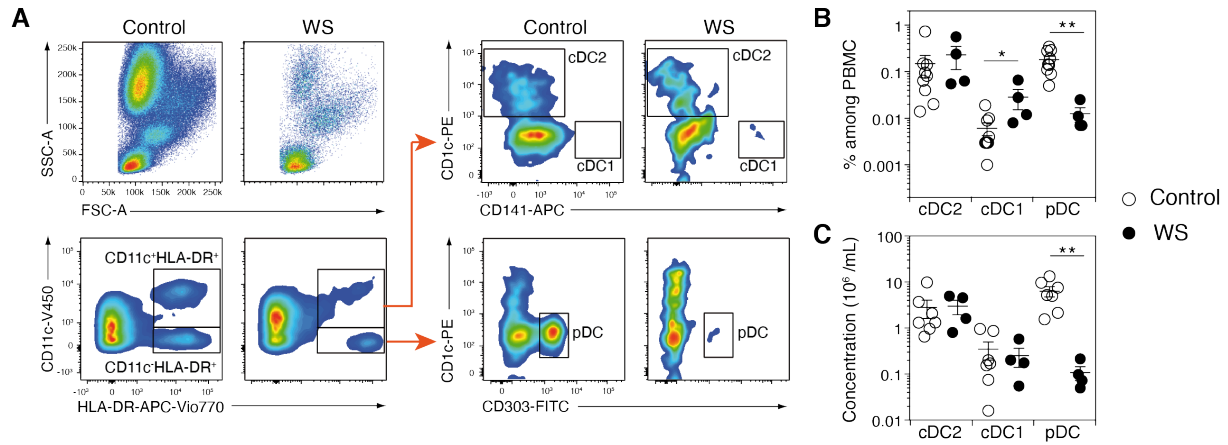
- 679 51. Arbeit JM, Munger K, Howley PM, and Hanahan D. Progressive squamous epithelial
680 neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *J Virol.*
681 1994;68(7):4358-68.
- 682 52. Coussens LM, Hanahan D, and Arbeit JM. Genetic predisposition and parameters of
683 malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol.*
684 1996;149(6):1899-917.
- 685 53. Meuris F, Gaudin F, Akinin ML, Hemon P, Berrebi D, and Bachelier F. Symptomatic
686 Improvement in Human Papillomavirus-Induced Epithelial Neoplasia by Specific
687 Targeting of the CXCR4 Chemokine Receptor. *J Invest Dermatol.* 2016;136(2):473-
688 80.
- 689 54. Van Hede D, Polese B, Humblet C, Wilharm A, Renoux V, Dortu E, et al. Human
690 papillomavirus oncoproteins induce a reorganization of epithelial-associated
691 gammadelta T cells promoting tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
692 2017;114(43):E9056-E65.
- 693 55. Mittal D, Kassianos AJ, Tran LS, Bergot AS, Gosmann C, Hofmann J, et al.
694 Indoleamine 2,3-dioxygenase activity contributes to local immune suppression in
695 the skin expressing human papillomavirus oncoprotein e7. *J Invest Dermatol.*
696 2013;133(12):2686-94.
- 697 56. Chandra J, Miao Y, Romoff N, and Frazer IH. Epithelium Expressing the E7
698 Oncoprotein of HPV16 Attracts Immune-Modulatory Dendritic Cells to the Skin
699 and Suppresses Their Antigen-Processing Capacity. *PloS one.*
700 2016;11(3):e0152886.
- 701 57. Freitas C, Wittner M, Nguyen J, Rondeau V, Biajoux V, Akinin ML, et al. Lymphoid
702 differentiation of hematopoietic stem cells requires efficient Cxcr4 desensitization.
703 *J Exp Med.* 2017;214(7):2023-40.
- 704 58. Schmid MA, Takizawa H, Baumjohann DR, Saito Y, and Manz MG. Bone marrow
705 dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and
706 subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood.* 2011;118(18):4829-40.
- 707 59. Ricart BG, John B, Lee D, Hunter CA, and Hammer DA. Dendritic cells distinguish
708 individual chemokine signals through CCR7 and CXCR4. *J Immunol.*
709 2011;186(1):53-61.
- 710 60. Matsumoto K, Leggatt GR, Zhong J, Liu X, de Kluyver RL, Peters T, et al. Impaired
711 antigen presentation and effectiveness of combined active/passive
712 immunotherapy for epithelial tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(21):1611-9.
- 713 61. Meuris F, Carthagen L, Jaracz-Ros A, Gaudin F, Cutolo P, Deback C, et al. The
714 CXCL12/CXCR4 Signaling Pathway: A New Susceptibility Factor in Human
715 Papillomavirus Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2016;12(12):e1006039.
- 716 62. Chow KY, Brotin E, Ben Khalifa Y, Carthagen L, Teissier S, Danckaert A, et al. A
717 pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of
718 keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell*
719 *Host Microbe.* 2010;8(6):523-33.
- 720 63. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjose S, Fakhry C, Monk BJ, et al.
721 Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16086.
- 722 64. Celli S, Day M, Muller AJ, Molina-Paris C, Lythe G, and Bousso P. How many
723 dendritic cells are required to initiate a T-cell response? *Blood.*
724 2012;120(19):3945-8.
- 725 65. Kallikourdis M, Trovato AE, Anselmi F, Sarukhan A, Roselli G, Tassone L, et al. The
726 CXCR4 mutations in WHIM syndrome impair the stability of the T-cell
727 immunologic synapse. *Blood.* 2013;122(5):666-73.

- 728 66. Strickley JD, Messerschmidt JL, Awad ME, Li T, Hasegawa T, Ha DT, et al. Immunity
729 to commensal papillomaviruses protects against skin cancer. *Nature*.
730 2019;575(7783):519-22.
- 731 67. Mani V, Bromley SK, Aijo T, Mora-Buch R, Carrizosa E, Warner RD, et al. Migratory
732 DCs activate TGF-beta to precondition naive CD8(+) T cells for tissue-resident
733 memory fate. *Science*. 2019;366(6462).
- 734 68. Audiger C, Rahman MJ, Yun TJ, Tarbell KV, and Lesage S. The Importance of
735 Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol*. 2017;198(6):2223-
736 31.
- 737 69. Vega-Ramos J, Roquilly A, Zhan Y, Young LJ, Mintern JD, and Villadangos JA.
738 Inflammation conditions mature dendritic cells to retain the capacity to present
739 new antigens but with altered cytokine secretion function. *J Immunol*.
740 2014;193(8):3851-9.
- 741 70. Biajoux V, Natt J, Freitas C, Alouche N, Sacquin A, Hemon P, et al. Efficient Plasma
742 Cell Differentiation and Trafficking Require Cxcr4 Desensitization. *Cell reports*.
743 2016;17(1):193-205.
- 744 71. Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilh MA, et al. Human
745 skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high
746 throughput sequencing. *PloS one*. 2012;7(6):e38499.
- 747 72. Byrd AL, Belkaid Y, and Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*.
748 2018;16(3):143-55.
- 749 73. Malissen B, Tamoutounour S, and Henri S. The origins and functions of dendritic
750 cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):417-28.
- 751 74. McDermott DH, Pastrana DV, Calvo KR, Pittaluga S, Velez D, Cho E, et al. Plerixafor
752 for the Treatment of WHIM Syndrome. *N Engl J Med*. 2019;380(2):163-70.
- 753 75. van Furth R, and Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a
754 marginating and a circulating pool. *J Exp Med*. 1986;163(2):474-9.
- 755 76. Brasel K, De Smedt T, Smith JL, and Maliszewski CR. Generation of murine dendritic
756 cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood*.
757 2000;96(9):3029-39.
- 758 77. Mayer CT, Ghorbani P, Nandan A, Dudek M, Arnold-Schrauf C, Hesse C, et al.
759 Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103+ dendritic
760 cells from mouse bone marrow. *Blood*. 2014;124(20):3081-91.

761

762 **Figures**

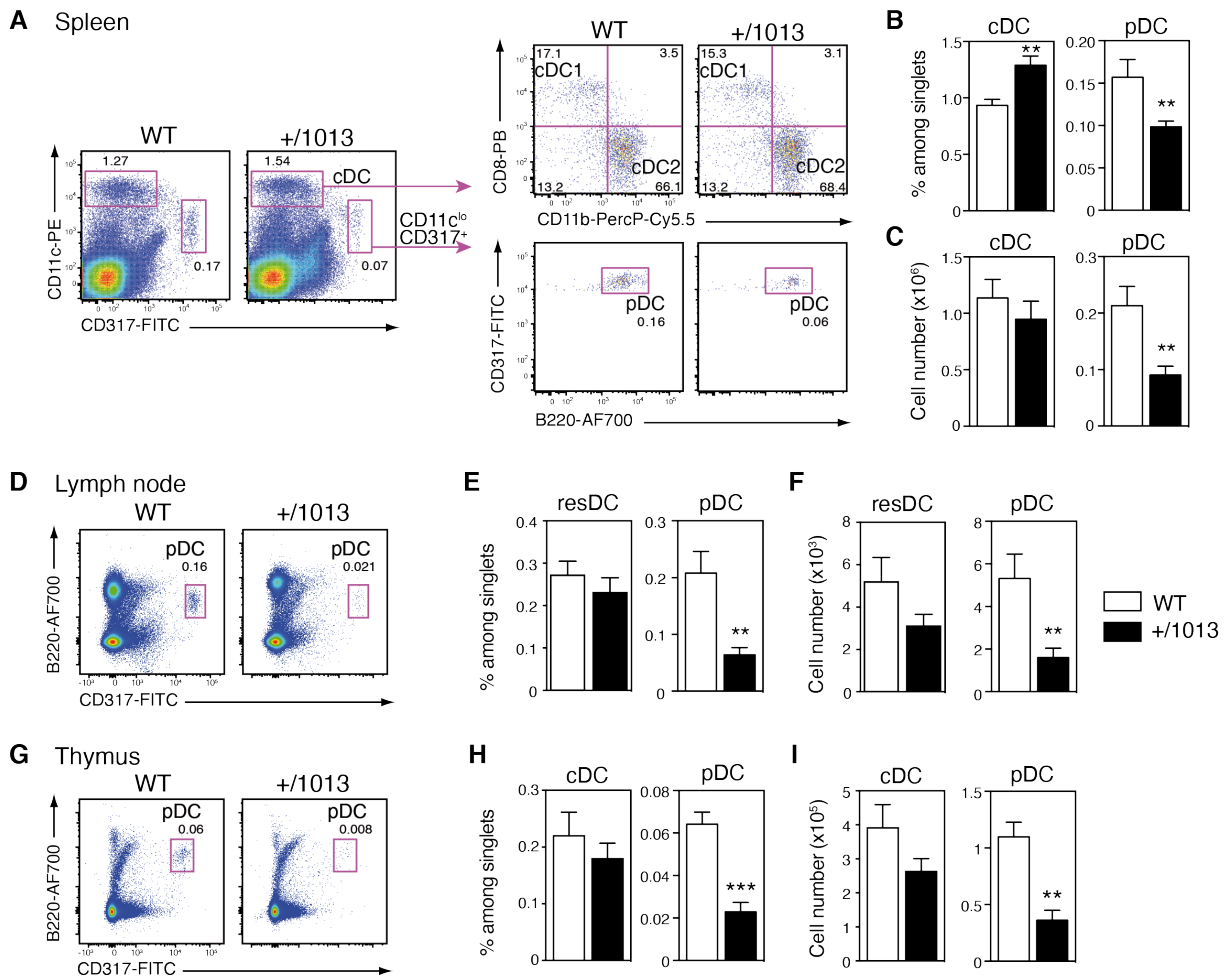
Gallego, Vétillard et al.
FIGURE 1



763

764 **Figure 1: WHIM patients harbor quantitative defects in pDC**

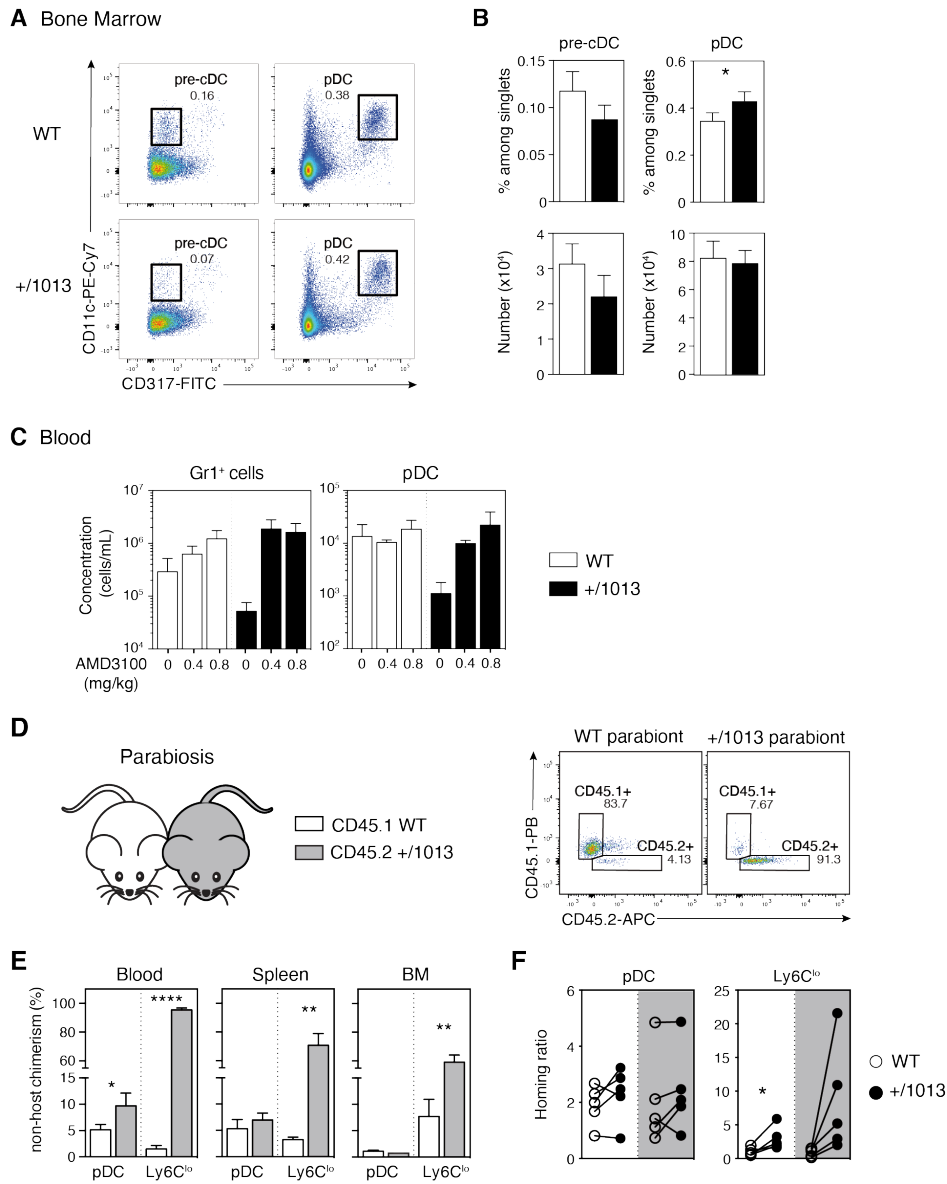
765 (A) Blood DC subsets were analyzed in WHIM patients and healthy donors. Representative pseudocolor
 766 dot plots obtained for the same volume of blood from one healthy control (Control) and one WHIM
 767 patient (WS) carrying the heterozygous *CXCR4*^{+/-1013} mutation are shown. cDC2 were defined as
 768 CD11c⁺HLA-DR⁺CD1c⁺ cells, cDC1 as CD11c⁺HLA-DR⁺CD141⁺ cells and pDCs as CD11c⁺HLA-
 769 DR⁺CD303⁺ cells. (B) The frequency of DC subsets among PBMCs (C) and their concentrations were
 770 measured for healthy controls (Control) and WHIM patients (WS). Each point represents an individual
 771 and lines indicate the mean ± SEM. B, n=9 Controls and n=4 WS, C n=7 Controls and n=4 WS. Statistics
 772 were done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01.



773

774 **Figure 2: *Cxcr4*^{+/₁₀₁₃} mice display reduced pDC pool in spleen, LN and thymus**

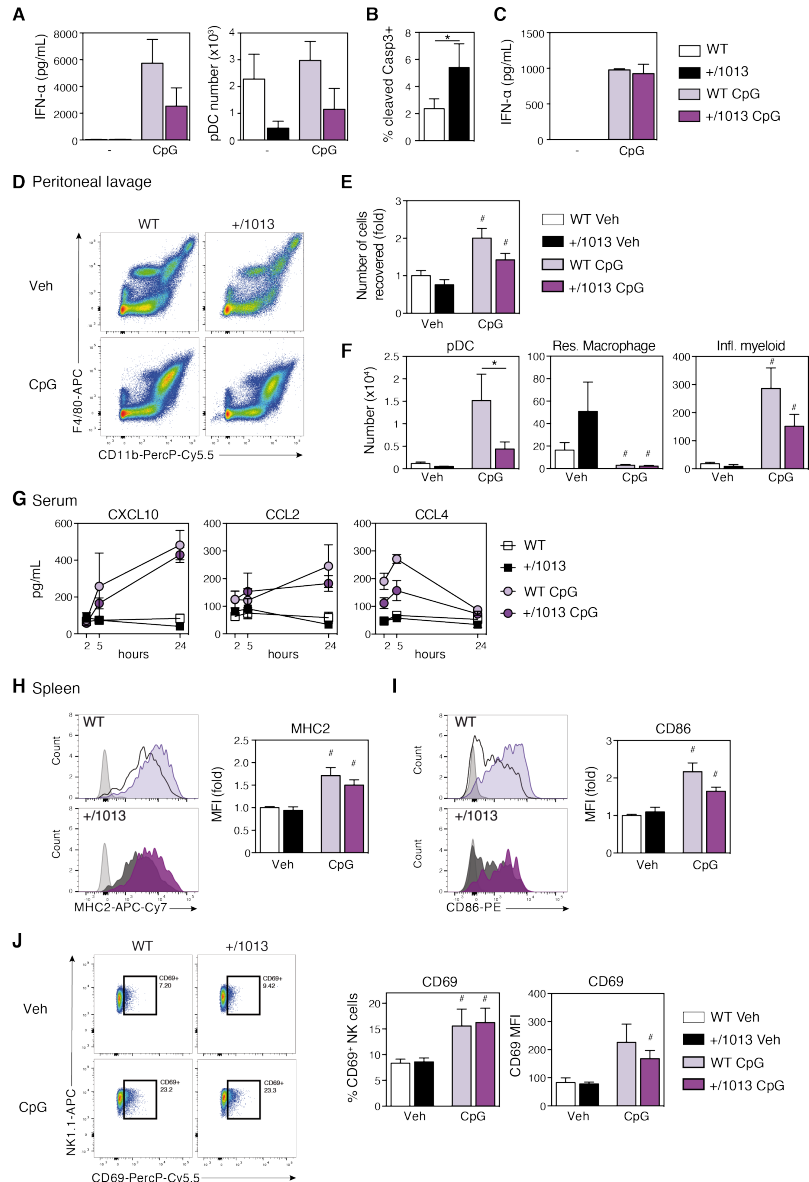
775 (A) Representative dot plots show the gating strategy for cDC1 (CD11c^{hi}CD317⁻CD11b⁻CD8⁺), cDC2
 776 (CD11c^{hi}CD317⁻CD11b⁺CD8⁻) and pDC (CD11c^{lo}CD317⁺B220⁺) identification in the spleens from
 777 *Cxcr4*^{+/₁₀₁₃} (+/1013) and littermate *Cxcr4*^{+/+} (WT) mice. The percentages of cDC, CD11c^{lo}CD317⁺ cells
 778 and pDC among singlets, cDC1 and cDC2 among DC are indicated. (B) Spleen cDC and pDC
 779 frequencies and (C) numbers were determined by flow cytometry (n=17 mice/group from 7
 780 experiments). (D, G) Representative dot plots showing pDC gating in inguinal LN (D) and thymuses
 781 (G) from +/1013 and WT mice. (E) Resident cDC (resDC, CD11c^{hi}CD317⁻MHCII⁺) and pDC
 782 (CD11c^{lo}CD317⁺B220⁺) frequencies and (F) numbers in inguinal LN from +/1013 and WT mice (n=12-
 783 13 mice/group from 5 experiments). (H) cDC (CD11c^{hi}CD317⁻) and pDC (CD11c^{lo}CD317⁺B220⁺)
 784 frequencies and (I) numbers in thymuses from +/1013 and WT mice (n= 7-8 mice/group from 3
 785 experiments). Bar graphs show mean ± SEM. Mice were from the C57BL/6J genetic background.
 786 Statistics were done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



787

788 **Figure 3: Peripheral pDC defect in *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice results from impaired CXCR4-**
 789 **dependent pDC egress from BM**

790 (A) Representative dot plots show the gating strategy to identify pre-cDC (CD11c^{lo}CD317-gated on
 791 CD4⁺CD8⁻B220⁻CD11b⁺MHC2^{-int} live cells) and pDC (CD11c^{lo}CD317⁺ among B220⁺ live cells) in the
 792 BM of +/1013 and WT mice. (B) Pre-cDC and pDC frequencies (top bar graphs) and numbers (bottom
 793 bar graphs) in the BM of +/1013 and WT mice (means ± SEM; n=7-8 mice from 4 experiments for pre-
 794 cDC; n=17 mice/group from 6 experiments for pDC frequency; n=10-11 mice from 4 experiments for
 795 pDC number). (C) Numbers of blood pDC, and Gr1⁺ cells assessed 2 hours after intraperitoneal injection
 796 of AMD3100 or PBS (means ± SEM; n=3 mice/group, one representative experiment out of 2). (D-F)
 797 Parabiosis experiments were performed with CD45.1 *Cxcr4*^{+/+} (WT, left parabiont) and CD45.2
 798 *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ (+/1013, right parabiont) mice. Blood, spleen and BM were analyzed 8 weeks later.
 799 Representative dot plots showing CD45.1 and CD45.2 expression in blood pDC from WT and +/1013
 800 parabionts (D, right). (E) Non-host chimerism in blood, spleen and BM from each parabiont. pDC were
 801 defined as CD3⁺Ly6G⁻CD11b⁻CD115⁻CD11c^{lo}CD317⁺Ly6C⁺B220⁺ live cells and Ly6C^{lo} monocytes as
 802 CD3⁺B220⁻Ly6G⁻CD115⁺CD11b⁺CD317⁻Ly6C^{lo} live cells. (F) Spleen/blood ratios of WT and
 803 *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ pDC and Ly6C^{lo} monocytes calculated for the spleen of WT (white background) and
 804 *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ (gray background) parabionts (means ± SEM; n=5 pairs of mice). Mice were from the
 805 C57BL/6J genetic background. Statistics were done using paired t test. *p<0.05, **p<0.01,
 806 ****p<0.001.



807

808

Figure 4: CXCR4 dysfunction does not alter pDC function

809

(A) IFN- α secretion (left) by splenic pDC from +/1013 and WT mice stimulated with CpG-A (CpG) or

810

not (-) for 18 hours. pDC numbers (right) at the end of the culture. Means \pm SEM; n= 5-6 per group,

811

cumulative data from 2 experiments. (B) Cleaved Caspase 3 levels in freshly isolated spleen pDC

812

(CD11c^{int}CD317⁺ live cells) from +/1013 and WT mice. Means \pm SEM; n= 9 per group, cumulative data

813

from 3 experiments. (C) IFN- α secretion by Flt3-L-derived pDC from +/1013 and WT mice stimulated

814

with CpG-A for 18 hours. Means \pm SEM; n= 2 per group, cumulative data from 2 experiments. (D-J)

815

+/1013 and WT mice were injected with CpG-DOTAP (CpG) or DOTAP only (Veh). (D)

816

Representative dot plot of the CD45⁺ cells recovered in the peritoneal lavage 24h after treatment. (E)

817

Fold increase in the number of cells recovered in the peritoneal lavage, the reference being the WT Veh

818

mice. (F) Number of pDC (CD45⁺CD11b⁻F4/80⁻CD11c^{lo}Ly6C⁺CD317⁺B220⁺ live cells), resident

819

macrophages (CD45⁺CD11b^{hi}F4/80^{hi}Ly6G⁻Ly6C^{int} to ^{hi} live cells) and inflammatory myeloid cells (Infl.

820

myeloid, CD45⁺B220⁻CD11b⁺F4/80^{lo} to ⁺Ly6C^{hi} live cells) in the peritoneal lavage. (G) Serum cytokine

821

levels at different time points. (H, I) Surface expression levels of MHC2 molecules (H) and CD86 (I)

822

by splenic pDC (CD11c^{int}CD317⁺B220⁺). Representative histograms (left) and fold increase in the MFI

823

relative to WT Veh mice (right) are shown. (J) Surface expression of CD69 by splenic NK cells (CD3⁻

824

NK1.1⁺CD49b⁺ live cells). Representative dot plots (left), % of CD69⁺ NK cells (middle) and CD69

825

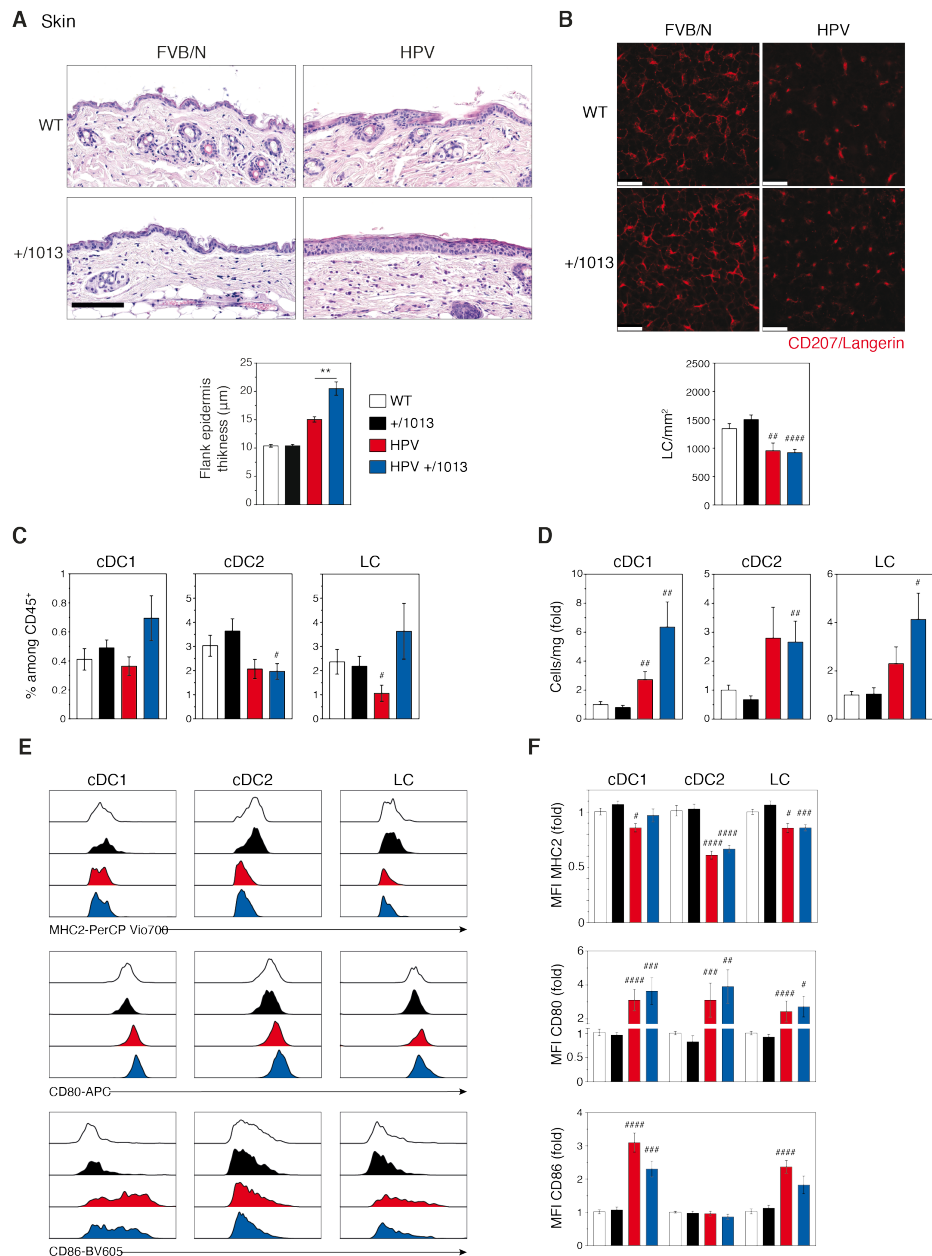
MFI (right) are shown. (D-J) Means \pm SEM; n= 5-6 per group, cumulative data from 3 experiments.

826

Statistics were done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test to compare Veh and CpG treated

827

mice ([#]p<0.05) or WT and +/1013 groups (*p<0.05). Mice were from the C57BL/6J genetic background.



828

829

830

Figure 5: CXCR4 dysfunction promotes HPV-associated chronic inflammation while preserving DC subset activation

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

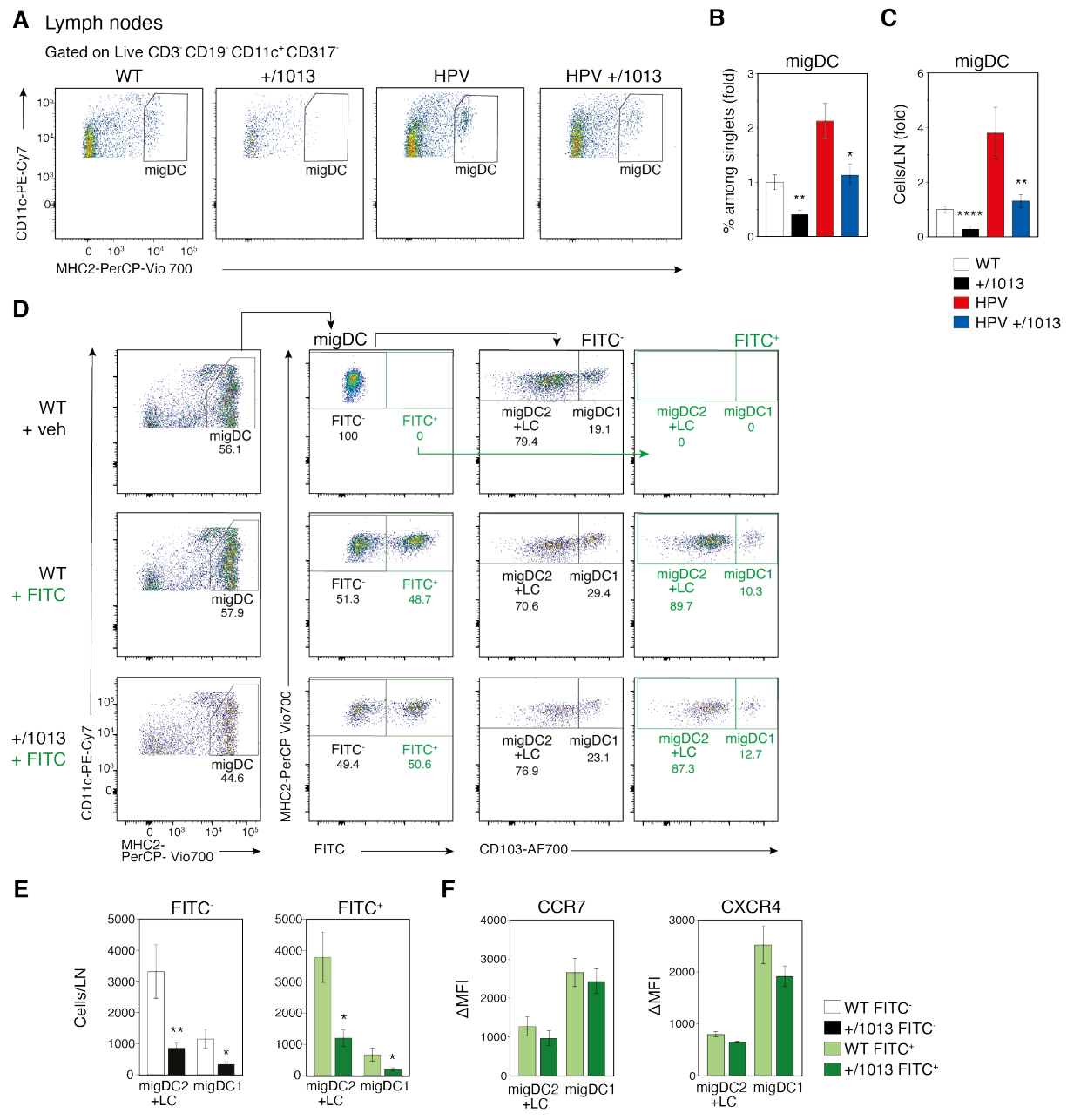
842

843

844

845

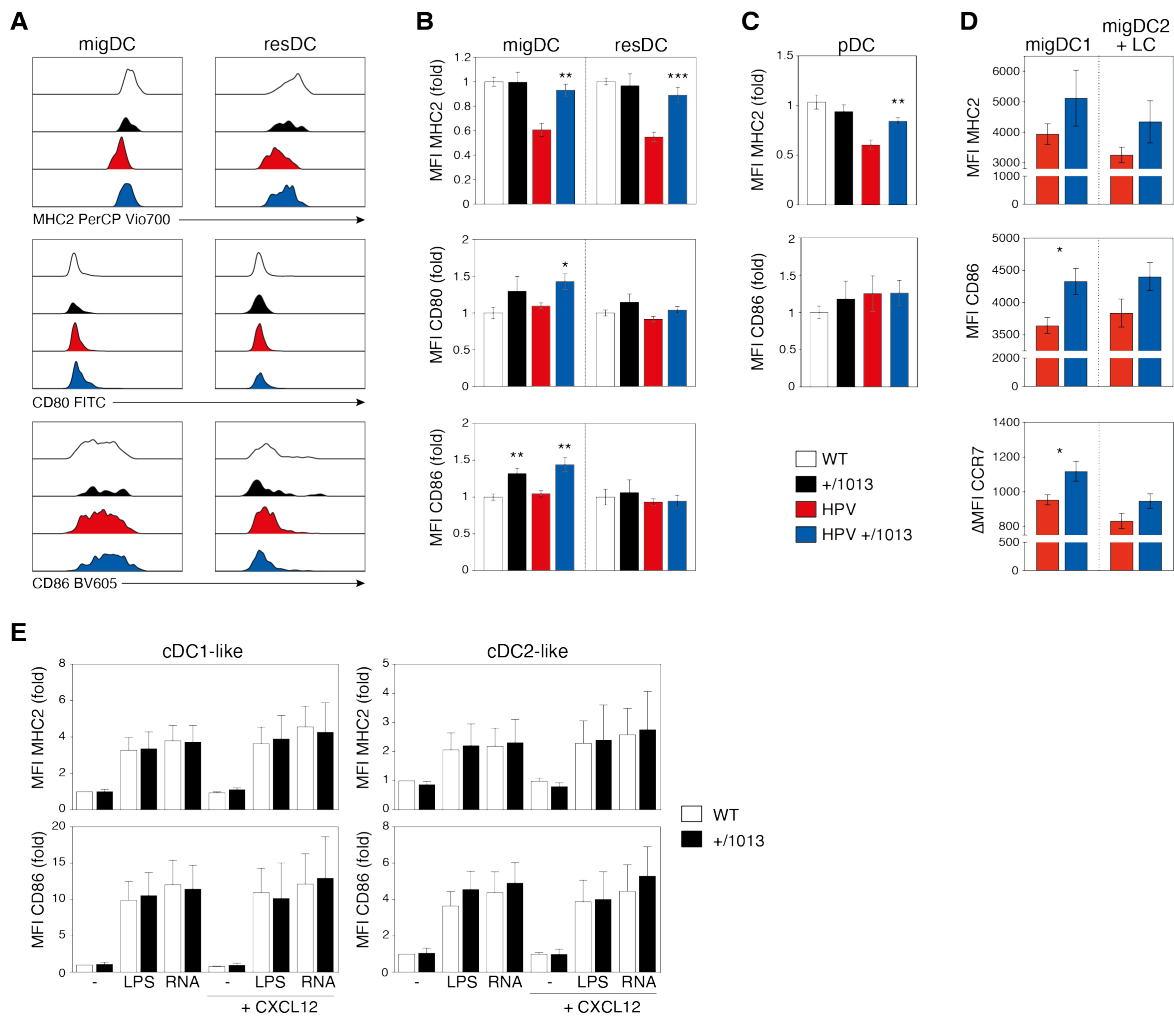
(A) Representative images for hematoxylin and eosin coloration of flank skin sections (upper panels). Epidermis thickness was measured along the tissue with at least 10 measurements per sample (lower panels; mean \pm SEM; n=6-8 mice). Scale bar 100 μm . (B) Representative confocal microscopy images (top) from epidermal sheets stained for CD207 (red). CD207⁺ cells were counted in 5 fields per sample (n=3 samples per genotype) and cell density was calculated (bottom). Scale bar 25 μm . (C) Percentages of cDC1, cDC2 and LC among CD45⁺ skin cells. (D) Numbers of cDC1, cDC2 and LC per mg of skin as fold change compared to the WT (See Figure S5 for the gating strategy; Mean \pm SEM; n=9-11 per group, cumulative data from 4 independent experiments). (E) Representative histograms showing the surface expression level of MHC2 molecules, CD80 and CD86 by cDC1, cDC2 and LC from WT, +/1013, HPV and HPV+/1013 mice. (F) Bar graphs show the expression of MHC2 molecules, CD80 and CD86 as fold change compared to the WT (Mean \pm SEM; n=10-12 mice/group for MHC2 from 5 experiments; n=9-11 mice/group for CD86 from 4 experiments; n=7-9 mice/group for CD80 from 3 experiments). Mice were from the FVB/N genetic background. Statistics were done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test to compare HPV mice and HPV+/1013 genotypes (A; **p<0.01) or HPV and HPV+/1013 mice to their non-HPV counterparts (B-E; #p<0.05; ##p<0.01; ###p<0.005; ####p<0.001).



846

847 **Figure 6: CXCR4 controls skin DC migration in the steady state and acute inflammation.**

848 (A) Representative dot plots showing migDC (CD11c⁺MHC2^{hi} gated on CD3⁺CD19⁻CD317⁻) in inguinal
 849 LN from WT, +/1013, HPV and HPV+/1013 mice. (B) Percentages among singlets and (C) numbers of
 850 migDC per LN as fold change compared to WT values. (B-C), Mean ± SEM; n=10-11 per group,
 851 cumulative data from 4 independent experiments. (D) Representative dot plots showing the gating
 852 strategy for CD103⁺ migDC1 and CD103⁻ migDC2+LC subsets identification skin-draining LN from
 853 mice 24h after FITC application. (E) Numbers of FITC⁻ and FITC⁺ migDC in skin-draining LN from
 854 FITC-treated mice. (F) Membrane expression of CCR7 (left) and CXCR4 (right) by FITC⁻ migDC1 and
 855 migDC2+LC from WT and +/1013 mice. (D-F) Means ± SEM; n=8-9 per group, cumulative data from
 856 2 independent experiments. Mice were from the FVB/N genetic background. Statistics were done using
 857 two-tailed unpaired Mann-Whitney test to compare WT and +/1013 mice. * p<0.05; **p<0.01.



858

859 **Figure 7: CXCR4 dysfunction promotes DC activation in the steady state and in the**
 860 **context of HPV-associated inflammation**

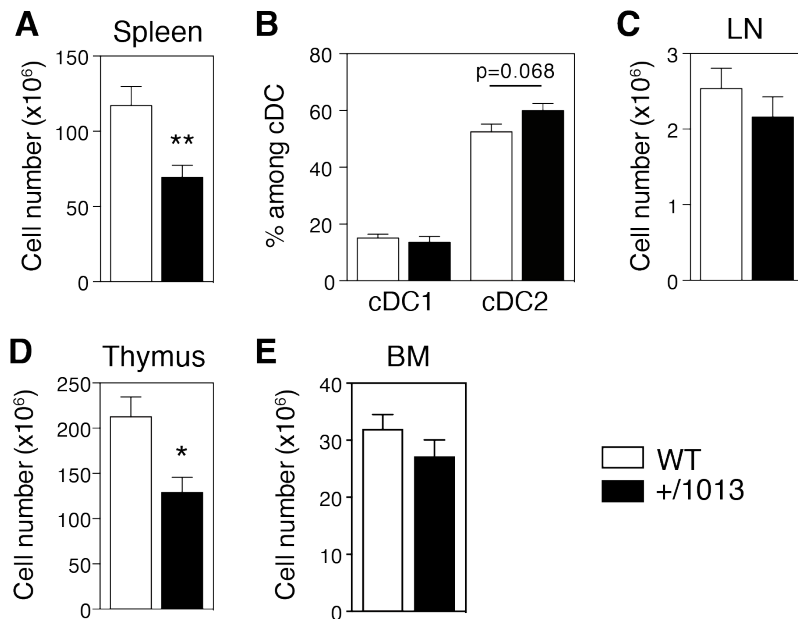
861 (A) Representative histograms showing the levels of MHC2 molecules, CD80 and CD86 surface
 862 expression by migDC and resDC (defined as CD11c⁺MHC2^{hi} and CD11c^{hi}MHC2⁺ gated on CD3⁻CD19⁻
 863 CD317⁻ live cells, respectively) recovered from the SDLN of WT, +/1013, HPV and HPV+/1013 mice.
 864 (B) Bar graphs showing the surface expression levels of MHC2 molecules, CD80 and CD86 in migDC
 865 and resDC as fold change compared to the WT. (C) Bar graphs showing the expression levels of MHC2
 866 and CD86 in pDC as fold change compared to the WT. (B, C) Mean \pm SEM; n=8-11 mice/group from
 867 4 experiments for MHC2; n=8 mice/group from 3 experiments for CD86; n=6 mice/group from 2
 868 experiments for CD80. (D) Bar graphs showing the surface expression levels of MHC2 molecules,
 869 CD86 and CCR7 in migDC1 and migDC2 + LC from HPV and HPV+/1013 mice. (Mean \pm SEM; n=6-
 870 7 per group from one representative experiment out of 2). (E) Bar graphs showing the surface expression
 871 levels of MHC2 and CD86 upon LPS or ssRNA stimulation in DC1-like and DC2-like BMDCs derived
 872 from WT and +/1013 mice. Results are expressed as fold change compared to the non-treated WT (Mean
 873 \pm SEM; cumulative data from n=4 to 5 independent experiments). Mice were from the FVB/N genetic
 874 background. Statistics were done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test to compare +/1013 mice
 875 to their WT counterparts. **p<0.01; ***p<0.005).

1 **Supplemental material**

2 **Supplemental table 1: List of the mAb used in the study**

Species	Antigen	Fluorochrome	Supplier	Clone	dilution	Validation in FVB/N background
Human	CD1c	PE	Miltenyi Biotec	AD5-8E7	1/11	
	CD3	PE-Vio770	Miltenyi Biotec	BW264/56	1/11	
	CD14	PerCP	Miltenyi Biotec	TÜK4	1/11	
	CD19	AF700	BD Biosciences	HIB19	1/20	
	CD141	APC	Miltenyi Biotec	AD5-14H12	1/11	
	CD303	FITC	Miltenyi Biotec	AC144	1/11	
	HLA-DR	APC-Vio770	Miltenyi Biotec	AC122	1/11	
Mouse	Active Caspase-3	AF647	BD Biosciences	C92-605	1/100	
	CCR7	PE	BD Biosciences	4B12	1/100	Yes
	CCR9	APC	eBiosciences	ebioCW-1.2	1/100	
	CD3ε	V500	BD Biosciences	500A2	1/200	Yes
	CD3ε	eFluor 450	eBiosciences	145-2-c11	1/50	
	CD3ε	eFluor 780	eBiosciences	145-2-c11	1/100	
	CD3ε	BV421	Biolegend	145-2-c11	1/50	
	CD3ε	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	500A2	1/200	
	CD4	APC-eFluor 780	eBiosciences	GK1.5	1/200	
	CD8α	APC eFluor 780	eBiosciences	53-6.7	1/100	Yes
	CD8α	PB	BD Biosciences	53-6.7	1/100	
	CD8α	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	53-6.7	1/100	
	CD8α	BV 650	Biolegend	53-6.7	1/100	
	CD9	FITC	eBiosciences	eBioKMC8	1/100	
	CD11b	FITC	BD Biosciences	M1/70	1/200	Yes
	CD11b	BV650	BD Biosciences	M1/70	1/200	
	CD11b	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	M1/70	1/200	
	CD11c	PE Cy7	eBiosciences	N418	1/100	Yes
	CD11c	PE	eBiosciences	HL3	1/100	Yes
	CD16/CD32	Purified	BD Biosciences	2.4G2	1/50	Yes
	CD16/CD32	Purified	eBiosciences	93	1/50	Yes
	CD19	PE CF594	BD Biosciences	1D3	1/200	Yes
	CD19	APC	eBiosciences	ebio103	1/200	
	CD45	APC Cy7	BD Biosciences	30F11	1/200	Yes
	CD45	AF 700	BD Biosciences	30F11	1/200	Yes
	CD45	BV 510	BD Biosciences	30F11	1/200	
CD45.1	PB	Biolegend	A20	1/200		

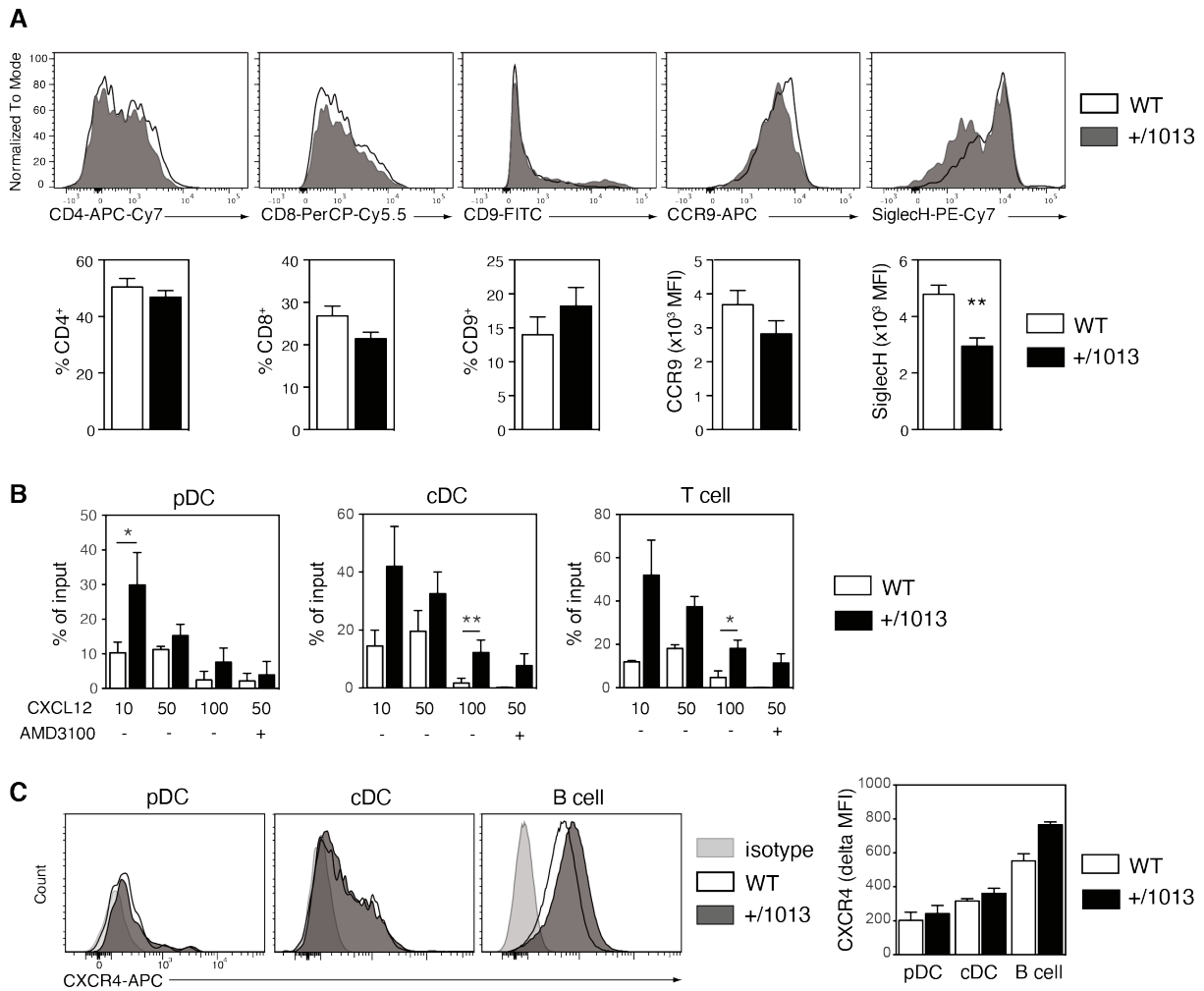
CD45.2	APC	Biolegend	104	1/200	
CD45R	BV 510	Biolegend	RA3-6B2	1/00	
CD45R	AF 700	BD Biosciences	RA3-6B2	1/00	
CD69	FITC	BD Biosciences	H1.2F3	1/00	
CD80	APC	BD Biosciences	16-101	1/200	Yes
CD86	BV605	BD Biosciences	GL1	1/200	Yes
CD86	PE	BD Biosciences	GL2	1/200	
CD103	APC R700	BD Biosciences	M290	1/100	Yes
CD103	APC	eBiosciences	2E7	1/100	
CD103	PE	BD Biosciences	M290	1/100	Yes
CD115	PE	BD Biosciences	T38-320	1/100	
CD207	eFluor 660	eBiosciences	EBioRMUL.2	1/50	Yes
CD207	PE	eBiosciences	eBioL31	1/50	Yes
CD317	eFluor 450	eBiosciences	eBio927	1/100	Yes
CD317	FITC	eBiosciences	ebio927	1/50	Yes
CXCR4	APC	eBiosciences	2B11	1/100	Yes
CXCR4	PE	eBiosciences	2B11	1/100	Yes
F4/80	APC	BD Biosciences	T45-2342	1/100	
Ki-67	FITC	Miltenyi Biotec	REA183	1/100	
I-Ab	eFluor 780	eBiosciences	AF6-120.1	1/100	
Ly-6C	PE Cy7	BD Biosciences	AL-21	1/400	
Ly-6G	eFluor 780	eBiosciences	RB6-8C5	1/200	
Ly-6G	AF 700	eBiosciences	RB6-8C5	1/200	
MHC2	PerCP Vio700	Miltenyi Biotec	REA813	1/500	Yes
NK1.1	APC	BD Biosciences	PK136	1/100	
Siglech	Pe-Cy7	eBiosciences	ebio440c	1/100	
Ter119	Percp-Cy5.5	eBiosciences	Ter119	1/100	



4

5 **Figure S1: *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice show reduced cellularity in spleen and thymus**

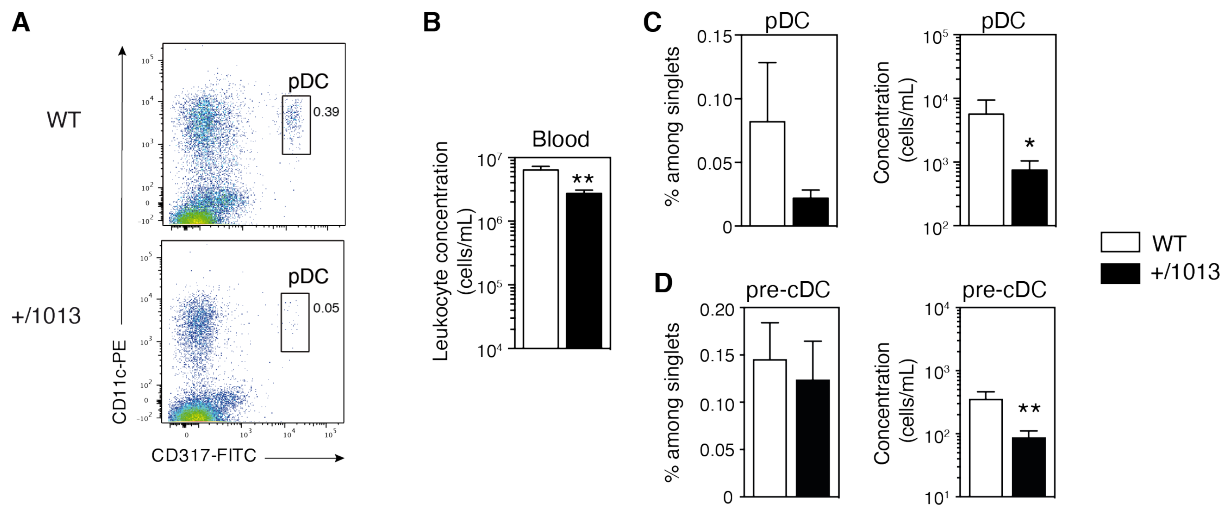
6 (A) Number of splenocytes recovered from +/1013 and WT mice (mean ± SEM; n=17 mice/group from
7 7 experiments). (B) cDC1 and cDC2 frequencies among spleen cDC from +/1013 and WT mice (n=9-
8 10 mice/group from 4 experiments). (C-E) Number of cells recovered in (C) inguinal LN, (D) thymuses
9 and (E) BM from +/1013 and WT mice (n=12-13 mice/group from 5 experiments for LN and BM, n=
10 7-8 mice/group from 3 experiments for thymus). Mice were from the C57BL/6J genetic background.
11 Statistics were done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test. *p<0.05, **p<0.01.



12

13 **Figure S2: Splenic pDC phenotypic and functional characterization**

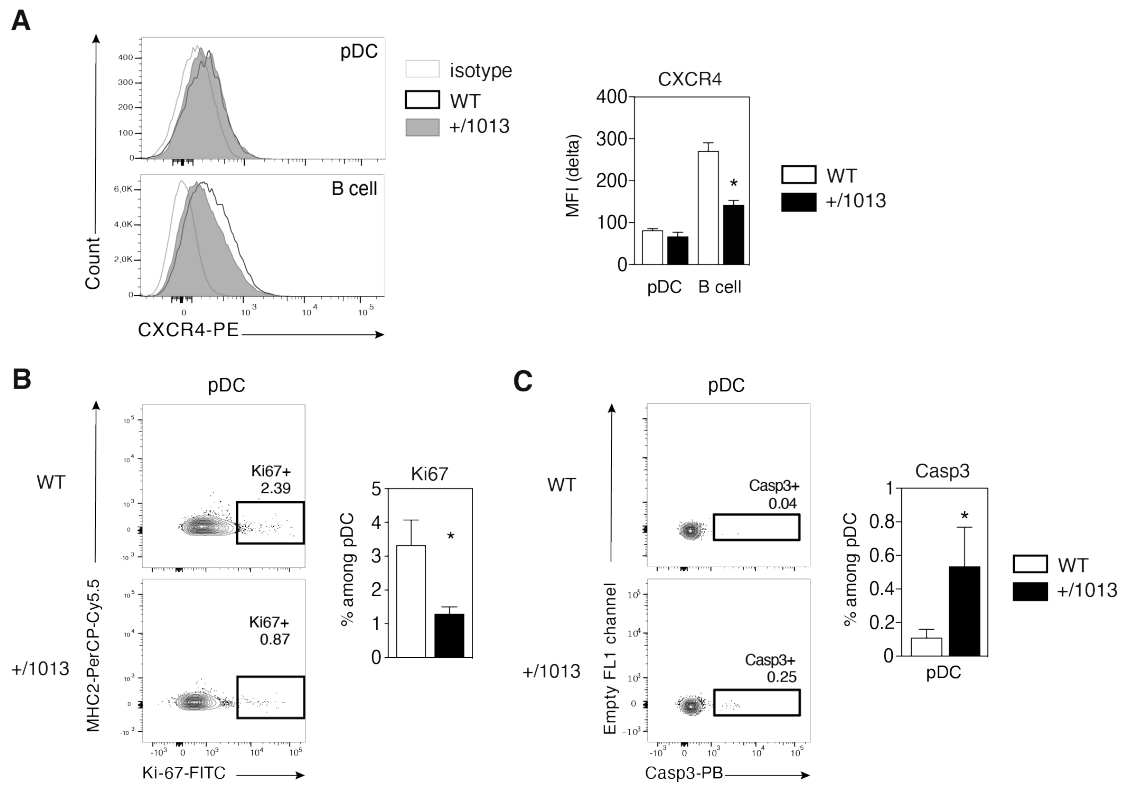
14 **(A)** Surface expression of the indicated markers by splenic pDC (defined as CD11c^{lo}CD317⁺B220⁺ live
 15 cells) from +/1013 and WT mice. Representative overlay histograms (top) and bar graphs showing mean
 16 \pm SEM (below; n=6 mice/group from 2 experiments). **(B)** Transwell migration of pDC, cDC and T cells
 17 in response to CXCL12, with or without AMD3100 (n=4-5 mice/group from 2 experiments). **(C)**
 18 CXCR4 surface expression levels in pDC, cDC and B cells. Representative overlay histograms (left)
 19 and bar graphs (right) showing mean \pm SEM (n=2 mice/group; representative of 2 experiments). Mice
 20 were from the C57BL/6J genetic background. Statistics were done using two-tailed unpaired Mann-
 21 Whitney test. * p <0.05, ** p <0.01.



22

23 **Figure S3: *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice harbor quantitative defects in blood pDC**

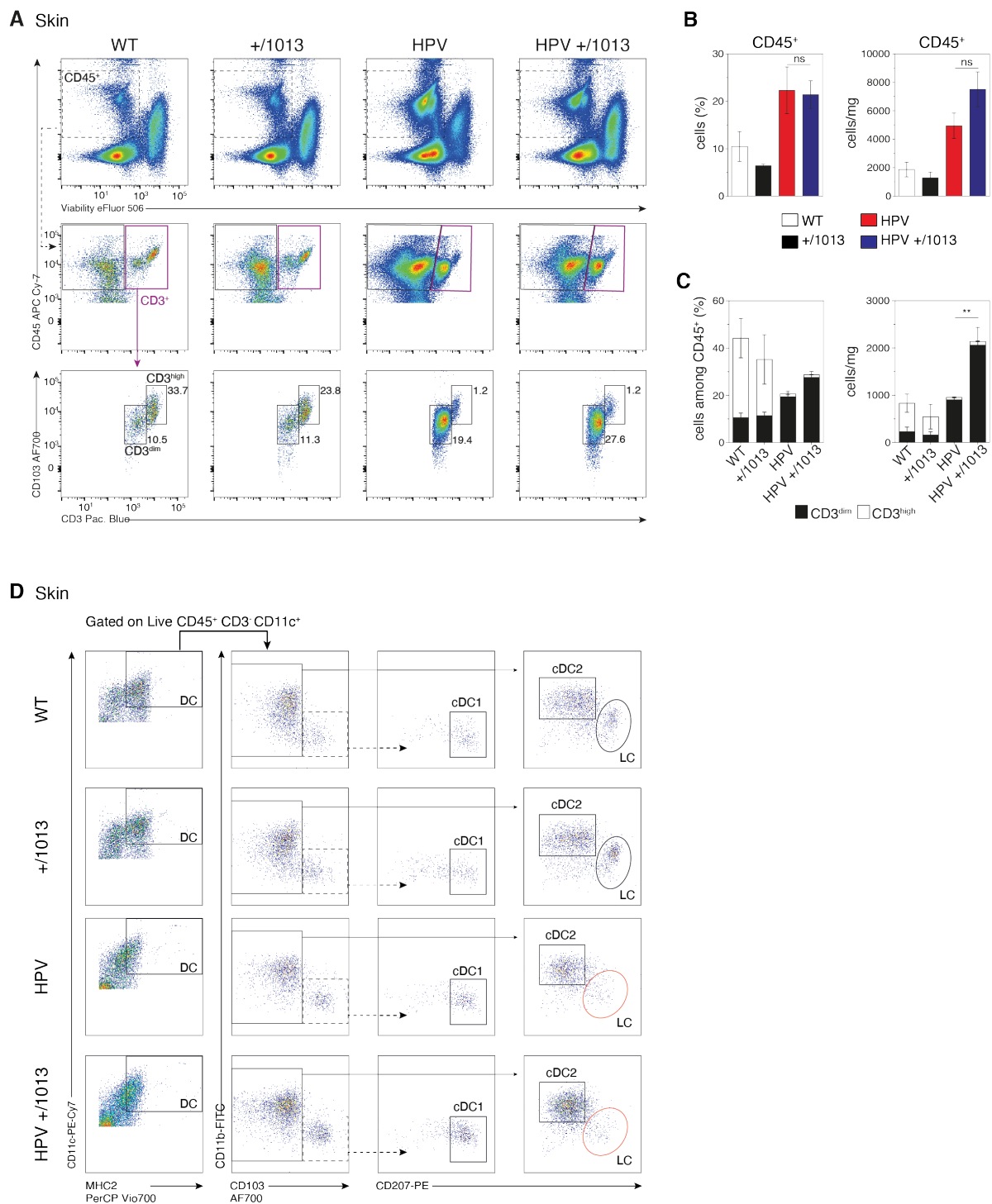
24 (A) Representative dot plots show the gating strategy to define pDC (CD11c^{lo}CD317⁺) gated on viable
 25 Ter119⁻CD45⁻CD19⁻ cells in the blood from *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ (+/1013) and *Cxcr4*^{+/+} (WT) mice. (B)
 26 Leukocytes concentration, (C) pDC frequencies among Ter119⁻ single cells (left) and concentrations
 27 (right) were determined. Histograms show mean ± SEM (n=7-8 mice/group, cumulative data from 2
 28 independent experiments). (D) Blood pre-cDC were defined as CD4⁻CD8⁻B220⁻MHC2^{-int}CD317⁻
 29 CD11c⁺CD11b⁺ cells. Bar graphs (mean ± SEM) show pDC frequencies among single cells and
 30 concentrations (n=7-10 mice/group, cumulative data from 3 independent experiments). Mice were from
 31 the C57BL/6J genetic background. Statistics were done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test.
 32 **p*<0.05, ***p*<0.01.



33

34 **Figure S4: BM pDC from *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ mice express normal CXCR4 levels, but display**
 35 **reduced proliferation and increased apoptosis**

36 CXCR4 (A), Ki67 (B) and cleaved-caspase 3 (C) expression was assessed in BM pDC (A-C) and mature
 37 B cells as controls for CXCR4 expression (A), defined as CD11c^{int}CD317⁺MHC2^{lo/+}B220⁺SiglecH⁺ and
 38 MHC2⁺B220^{hi}CD11c⁻CD317⁻SiglecH⁻CD45⁺ live cells, respectively. Representative histograms (A,
 39 left) or dot plots (B, C, left) and bar graph representing the means ± SEM (A, B, C, right panels) are
 40 shown. A, n=4 mice/group, one experiment representative of 2; B and C, n= 6-7 mice/group, cumulative
 41 data from 2 experiments. Mice were from the C57BL/6J genetic background. Statistics were done using
 42 two-tailed unpaired Mann-Whitney test. **p*<0.05, ***p*<0.01.



43

44 **Figure S5: Characterization of K14-HPV16 *Cxcr4*^{+/-1013} mice.**

45 (A) Gating strategy to identify T cells (Live CD45⁺CD3⁺) and their subsets according to CD3 intensity
 46 and CD103 surface expression level in ear skin cells suspensions. Dot plots are representative of four
 47 independent experiments. (B, C) Bar graphs of CD45⁺ cells (B) and T-cell subsets (C) frequencies and
 48 number per mg of tissue (mean ± SEM; n=3-6 mice from two independent experiments, representative
 49 of four independent experiments). Mice were all from the FVB/N genetic background. Statistics were
 50 done using two-tailed unpaired Mann-Whitney test. **p<0.01. (D) Gating strategy to define cDC1
 51 (CD103⁺CD11b⁺CD207⁺), cDC2 (CD103⁻CD11b⁺CD207⁻) and LC (CD103⁻CD11b^{low}CD207^{high})
 52 among CD45⁺CD3⁺CD11c⁺MHC2^{hi} cells in ear skin cell suspensions from WT, +/1013, HPV and
 53 HPV+/1013 mice. Dot plots are representative of five independent experiments.

Article 2

Titre :

La protéine GILZ orchestre les réponses migratoire et calcique dans les cellules dendritiques.

Situation : En préparation

L'article présenté est une version préliminaire, incomplète car dépourvue de discussion et d'abstract notamment, et non encore travaillée avec l'ensemble des co-auteurs. Les résultats présentés sont discutés dans la discussion générale du manuscrit.

Participation : Premier auteur. Écriture du manuscrit, expériences, analyses.

Rationnel de l'étude :

La migration des DC est un processus central pour leur fonction. C'est un phénomène complexe qui met en jeu plusieurs processus tels que le contrôle de la vitesse et de la direction de migration. L'expression de GILZ dans les DC régule leur capacité à faire de la macropinocytose (Calmette *et al.*, 2016), une modalité de capture antigénique directement en compétition pour l'actine monomérique avec la migration des DC immatures. De ce fait, une de nos hypothèses de travail était que GILZ régule la vitesse de migration des DC immatures. En outre, GILZ régule de nombreux facteurs impliqués dans la signalisation en aval des ChR, comme les MAPK (p38 / ERK) notamment. Une seconde hypothèse était que GILZ régule la chimiotaxie des DC. Ces deux hypothèses suggéraient un rôle de GILZ dans la régulation de la migration des DC *in vivo*. Nous avons donc étudié cette migration dans un modèle murin de délétion de la protéine GILZ dans les DC (CD11c-GILZ^{ko}, ci-après nommées GILZ^{ko}).

Résultats :

Premièrement, nous avons mis en évidence un défaut de migration des cDC2 cutanées vers les GL dans des expériences de FITC painting. Ce défaut était transitoire, non

associé à des altérations du nombre de DC cutanées, et la délétion de GILZ dans les DC n'altérerait ni le nombre de DC dans les GL à l'homéostasie, ni leur activation. Pour comprendre la source de ce défaut, nous avons tout d'abord réalisé des expériences de migration 2D en micro-canaux remplis de dextran. Nous avons montré que les DC GILZ^{ko} immatures migrent moins rapidement que les DC CTRL et qu'elles capturent plus de dextran. Ces résultats confirment nos travaux précédents qui ont démontré l'augmentation de la macropinocytose dans les DC GILZ^{ko} (Calmette *et al.*, 2016). De plus, cette différence étant abolie dans les DC matures, cela suggère que GILZ pourrait contrôler le couplage entre macropinocytose et vitesse de migration dans les DC. Nous avons ensuite établi que la délétion de GILZ réduit la chimiotaxie des DC immatures envers CXCL12 et matures envers CCL21. Pour comprendre les mécanismes impliqués, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur les BMDC CTRL et GILZ^{ko}. Nous avons mis en évidence que la délétion de GILZ induit l'expression de la PLCB4, très peu exprimée dans les DC CTRL. La PLCB4 intervient dans de nombreuses voies de signalisation associées par exemple à CXCR4 ou encore à la maturation des DC. Un point important montré par l'analyse transcriptomique est la modulation forte de la signalisation calcique dans les DC GILZ^{ko}, mais aussi celle de la signalisation en aval des ChR avec la modulation des voies JNK, PI3K et MAPK. Nous avons donc étudié l'impact fonctionnel de la délétion de GILZ sur la réponse calcique. Nous avons montré que GILZ régule l'entrée de Ca²⁺ dans les DC à l'homéostasie mais aussi au cours du SOCE induit par la thapsigargine. Ces résultats montrent pour la première fois que GILZ régule l'homéostasie calcique des DC et que sa délétion réduit significativement les concentrations de calcium cytosolique. Pour approfondir notre compréhension des mécanismes impliqués, nous avons étudié l'expression des canaux ORAI1, 2 et 3 et la distribution des canaux calciques ORAI1, fonctionnellement liés au SOCE. Dans les DC GILZ^{ko}, les canaux ORAI1 et 2 sont plus faiblement exprimés au niveau protéique. En outre, la distribution subcellulaire d'ORAI1 est fortement perturbée, et est disparate dans le cytosol alors qu'elle est largement ramassée à proximité de la membrane

plasmique dans les cellules CTRL. Ceci nous a porté à penser que GILZ régule la stabilité membranaire de ORAI1. La protéine serum glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1), une protéine induite, comme GILZ, par les GC, est connue pour stabiliser l'expression membranaire d'ORAI1. Sa fonction est contrôlée par une interaction physique directe avec GILZ dans les cellules rénales. Nous avons donc considéré SGK1 comme un bon candidat protéique pour expliquer le mécanisme de déstabilisation de la localisation membranaires d'ORAI1 dans les DC $GILZ^{ko}$. Nos résultats ont montré que la distribution de SGK1 est altérée dans les DC $GILZ^{ko}$. De plus, l'inhibition pharmacologique de SGK1 mime, dans les cellules CTRL, la distribution d'ORA1 et le défaut de SOCE retrouvés dans les DC $GILZ^{ko}$. Cependant l'inhibition de SGK1 dans les DC $GILZ^{ko}$ n'a aucun effet. En conclusion, nous avons montré que l'expression de GILZ augmente la vitesse de migration au détriment de la macropinocytose dans les DC immatures. De plus, la délétion de GILZ limite la chimiotaxie et réduit la concentration de calcium cytosolique à l'homéostasie et le SOCE dans les DC. Dans l'ensemble, ces régulations corrélerent avec la bonne mise en place de la migration *in vivo*.

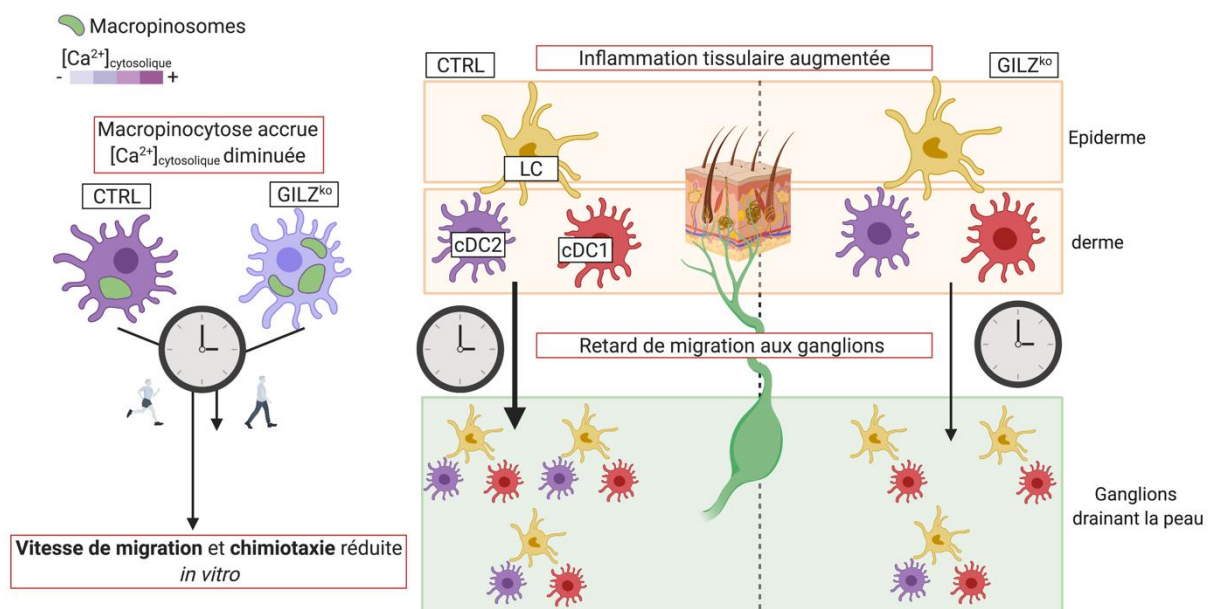


Figure 22 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'article 2. Les rectangles rouges représentent les résultats obtenus dans les cellules / souris $GILZ^{ko}$ en comparaison des souris CTRL.

1 Mathias Vetillard ¹, Olivier Dellis ², Hélène D. Moreau ³, Mathieu Maurin ³, Molene Docq ¹,
2 Agnieszka Jaracz-Ros ¹, Layla Veleanu ¹, Eric F.Morand ⁴, Ana-Maria Lennon-Duménil ³,
3 Françoise Bachelerie ¹, Géraldine Schlecht-Louf ^{1,5}

4

5 **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

6 **Conception and design:** MV, GSL

7 **Development of methodology:** MV, GSL, OD, HDM, AMLD

8 **Acquisition of data** MV, OD, AJR, HDM, LV, MD

9 **Analysis and interpretation of data :** MV, GSL, OD, HDM

10 **Writing, review, and/or revision of the manuscript:** MV, GSL

11 **Administrative, technical, or material support :** EFM

12 **Study supervision:** GSL

13

14 **AFFILIATIONS**

15 ¹UMR996-Inflammation, Chimiookines et Immunopathologie, INSERM, Faculté de médecine,
16 Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Clamart, France

17 ²Interactions Cellulaires et Physiopathologie H epatique, INSERM UMR-S 1174, Paris,
18 France ; Université Paris-Sud, Université Paris Saclay, Paris, France

19 ³INSERM U932, Institut Curie, ANR-10-IDEX-0001-02 PSL*and ANR-11-LABX-0043,
20 Paris, France

21 ⁴ Centre for Inflammatory Diseases, Department of Medicine, School of Clinical Sciences,
22 Monash University, Clayton, Victoria 3168 Australia

23 ⁵Lead contact

24

25 **ACKNOWLEDGEMENTS**

26 Khadidiatou Kouyate for mouse sample genotyping. The IPSIT-SFR platforms UMS-US31-
27 UMS3679, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry : Marie-Laure Aknin and Sophie Viel
28 Platform PLAIMMO for flow cytometry preparation and experimental advices. Claudine
29 Delom enie from TRANS PROT and Florent Dumont from BIO INFO platforms for

30 transcriptomic analysis and generation of p values and Fold change. Sarah Mendez from
31 ANIMEX platform for animal care. Valérie Nicolas and Severine Domenichini from MIPSIT
32 platform for confocal imaging and experimental advices. Françoise Mercier-Nomé platform
33 PHIC for help and advices regarding the confocal imaging experiments.

34

35 **FINANCIAL SUPPORTS**

36 This work was supported by grants from the ERA-Net Infect-ERA “HPV-MOTIVA” (to FB
37 and GSL), the “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” (to GSL) and LabEx LERMIT
38 (ANR-10-LABX-33) under the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0003-
39 01) (to FB and GSL).

40 MV was supported by a doctoral fellowship from the Doctoral School “Innovation
41 Thérapeutique du fondamental à l’appliqué” (ED 569) and by the “Ligue contre le Cancer”.

42 INTRODUCTION

43 DC are potent antigen presenting cells that orchestrate tolerance and immunity, owing to the
44 cooperation of steady state DC subsets, namely plasmacytoid DC (pDC), type 1 and 2
45 conventional DC (cDC1 and cDC2) and monocyte-derived DCs¹⁻⁴. DC function requires both
46 spatial and temporal tight control to prevent immune dysfunctions^{5,6}. The contribution of
47 Microbe- and Damage-Associated Molecular Patterns (MAMPS and DAMPS) to this
48 regulation has been widely explored, as well as that of immunosuppressive or
49 immunostimulatory treatments⁷⁻¹¹. The contribution of endogenous factors to the control of
50 steady state DC functions remains less explored.

51 Glucocorticoids (GCs) are among the factors known to contribute to DC function control in the
52 context of stress or upon immunosuppressive treatment¹². GCs act both through transcriptional
53 repression and induction¹³. In DCs, GCs effects are largely mediated by the Glucocorticoid-
54 Induced Leucine Zipper (GILZ) transcriptional regulator, encoded by the GC-responsive
55 *Tsc22d3* gene¹⁴⁻²³. GILZ is expressed by human and murine DC subsets at steady state^{18,20,21}
56 and is further upregulated in DC upon exposure to GC, IL-10, TGF- β ^{15,16} but also in the tumor
57 microenvironment^{17,23}. High GILZ expression level is a molecular switch promoting
58 tolerogenic commitment of DC^{15-19, 22,24} and favoring Treg proliferation at the expense of
59 effector T-cell priming¹⁵⁻²⁰. Accordingly, stress-induced GILZ expression in DC exerts
60 detrimental role on therapy-induced anticancer immunosurveillance²³. The effect of tonic
61 GILZ expression, promoted by the steady state production of endogenous GCs, on DC function
62 remains however poorly known. In a previous work, we generated conditional GILZ-deficient
63 mice that do not express GILZ in their DCs. A first analysis of this model unraveled that GILZ^{ko}
64 DCs display increased macropinocytosis *in vitro* and *in vivo*²¹, suggesting that GILZ may affect
65 actin-dependent processes, including migration.

66 DC migration warrants their function and encompasses several stages including patrolling for
67 tissue-resident immature DCs (iDCs)^{5,6,25-29} and fast directed migration from peripheral tissue
68 to lymph nodes (LN) for mature DCs (mDCs)⁶. Both DC motricity^{30,31} and their ability to
69 integrate chemotactic and/or haptotactic gradients^{32,33} are critical to ensure proper DC location
70 and thus function throughout their life^{5,6}.

71 In this work, we investigated the contribution of GILZ expression to the regulation of DC
72 migration. We establish that GILZ expression favors cDC2 migration to LN *in vivo*, and that
73 GILZ deletion impairs both iDCs motricity and i/mDCs chemotaxis *in vitro*. These defects are

74 associated with a major alteration of Ca^{2+} homeostasis and responses in GILZ^{ko} DCs, that
75 correlates with disturbed expression levels and patterns of ORAI1 and 2 proteins. The latter
76 observation could be explained by a functional defect of Serum and Glucocorticoid-regulated
77 Kinase 1 (SGK1) in the absence of GILZ, as SGK1 inhibition reproduced GILZ-deletion
78 effects. Taken together, our results shed light on a GC-dependent axis that controls Ca^{2+}
79 homeostasis and responses in DCs and may controls DC migration both at the motricity and
80 chemotaxis levels.

81 **RESULTS**

82 **GILZ deletion reduces skin DC migration to lymph nodes *in vivo***

83 To assess the contribution of GILZ to the control of DC migration *in vivo*, we studied the
84 migration of dermal cDC1 and cDC2 as well as LC to skin-draining lymph nodes (SDLN) in
85 FITC painting assays, 24h and 72h after FITC application. At 24h, FITC-positive (FITC⁺)
86 migratory cDC2 (migDC2) number was significantly reduced in GILZ^{ko} mice as compared to
87 their controls (CTRL) (Figure 1a-d). This difference in FITC⁺ migDC2 numbers between CTRL
88 and GILZ^{ko} mice was not observed anymore 72h after FITC application (Figure 1d). FITC-
89 negative (FITC⁻) migDC numbers were not different between CTRL and GILZ^{ko} mice,
90 whatever the timepoint. Along this line, CTRL and GILZ^{ko} mice displayed similar DC numbers
91 in their LN at steady and skin DC numbers were similar in CTRL and GILZ^{ko} mice (Figure
92 suppl 1b, e). Altogether, these results suggest that the reduction in FITC⁺ migDC2 numbers 24h
93 post FITC application corresponds to a transient defect in DC migration, likely promoted by
94 FITC painting-associated inflammation. The fact that FITC⁺ migDC2 migration was affected
95 rather than that of FITC⁺ migDC1 and migLC was not due to differences in their level of GILZ
96 expression (Figure suppl 1c, f). Also, GILZ expression was efficiently reduced in all subsets of
97 GILZ^{ko} mice (Figure suppl 1c, f). Thus, these results point to a contribution of GILZ in the
98 control of cDC2 migration to SDLN.

99 **GILZ expression controls DC migration speed and chemotaxis *in vitro***

100 DC migration from tissues to LN requires fast directed migration to LN, which depends on both
101 their motility across tissues to reach lymphatics and capacity to sense and respond to chemokine
102 gradients.

103 Based on the potentiation of macropinocytosis we reported in GILZ^{ko} DCs²¹, we first evaluated
104 whether GILZ deletion would impact DC migration speed in confined microchannels loaded
105 with 100 kDa Dextran- AF647, a 2D system devised to address both antigen capture and
106 velocity (Figure 2a, b)³⁴. Macropinocytosis was assessed both in terms of dextran-associated
107 fluorescence intensity and number of macropinosomes at cell front (Figure 1C). As expected
108²¹, macropinocytosis was increased in GILZ^{ko} iDCs as compared to their controls (CTRL) and
109 almost abrogated in both CTRL and GILZ^{ko} mDCs (Figure 2c)³⁵⁻³⁸. GILZ deletion was also
110 associated with a significant decrease in iDC velocity, a difference that was not observed in
111 mDCs (Figure 2d). Thus, these results suggest that GILZ expression controls iDC, but not
112 mDC, migration speed and macropinocytosis in confined environments.

113 Considering the known effects of GILZ on signal transduction, we also addressed the impact
114 of GILZ deletion on DC chemotaxis. To answer this question at the DC-like subset level, we
115 differentiated FL-BMDC cells in the presence of both Flt3-L and GM-CSF (Figure 2e,³⁹). GILZ
116 deletion reduced iDC chemotaxis toward CXCL12 and mDC chemotaxis toward CCL21
117 (Figure 2f, g), without altering CXCR4 or CCR7 membrane expression (Figure 2h).

118 Taken together, these results unravel that GILZ expression increases iDC velocity as well as
119 iDC and mDC chemotaxis *in vitro*.

120 **GILZ expression regulates Ca²⁺ homeostasis in DCs**

121 To gain insight into the mechanisms involved in GILZ-mediated control of DC migration and
122 chemotaxis, we next performed a transcriptomic analysis of CTRL and GILZ^{ko} BMDCs. The
123 most up and down regulated transcripts were selected and, based on Ingenuity pathway analysis,
124 we established a list of the most modulated pathways in GILZ^{ko} DCs (Figure 3a). As expected
125 from previous reports^{14,23,40,41}, DC maturation was affected by GILZ deletion (Figure 3a). Most
126 interestingly, transcripts from the Ca²⁺ signaling pathway (*e.g.* NFATC3/4, CAMK2D and
127 ATP2C1 down-regulation), known to regulate cell migration at different stages^{42,43}, were also
128 among the most modulated ones. These results gave us the impetus for analyzing the impact of
129 GILZ deletion on Ca²⁺ homeostasis and mobilization in DCs. As a first approach, we assessed
130 the variation of Ca²⁺ cytosolic concentration ([Ca²⁺]_{cyt}) in Fluo-4 AM-loaded BMDC upon
131 SOCE induction by thapsigargin (Tg) treatment. These experiments suggested a decrease of the
132 Ca²⁺ exchanges in GILZ^{ko} DCs as compared to CTRL (Figure 3b, c). Basal and maximal Fluo-
133 4 AM fluorescence was in the same range in CTRL and GILZ^{ko} iDCs (Figure suppl 2a, b),
134 ruling out non-specific dye loading. To accurately measure ([Ca²⁺]_{cyt}, we next performed
135 fluorometry experiments using DCs loaded with the Indo1 AM ratiometric probe. GILZ^{ko} iDCs
136 displayed a reduction of both resting [Ca²⁺]_{cyt} and Tg-induced SOCE as compared to CTRL
137 iDCs (Figure 3d, e and Figure suppl 2c). Similar results were obtained in mDCs (Figure 3f).
138 The fact that the reduction of [Ca²⁺]_{cyt} in GILZ^{ko} DCs resulted from a decreased Ca²⁺ entry
139 rather than its excessive leaking was supported by Mn²⁺-induced FURA2 fluorescence
140 quenching assays (Figure 3g). Finally, SOCE diminution was not due to reduced endoplasmic
141 reticulum Ca²⁺ stocks (Figure 3h). Thus, GILZ^{ko} DCs displayed reduced resting [Ca²⁺]_{cyt} and
142 SOCE.

143 **GILZ controls ORAI1 and 2 protein expression as well as ORAI1 subcellular distribution** 144 **in DC**

145 SOCE depends on the expression and function of Ca²⁺-release activated channels (CRAC),
146 namely ORAI1, 2 and 3. We first assessed ORAI 1, 2 and 3 expression by flow-cytometry ⁴⁴.
147 As expected ⁴⁵, the 3 isoforms were expressed in CTRL DCs, with some heterogeneity as 40%
148 of DCs expressed ORAI1, 60% expressed ORAI2 and more than 80% expressed ORAI3. The
149 analysis of GILZ^{ko} DCs revealed a reduction of both ORAI1 and ORAI2 proteins expression
150 (Figure 4b), that was not detected at the mRNA level (Figure 4a), and no change in ORAI3
151 levels. Thus, GILZ deletion in DCs affects the level of ORAI1 and 2 protein expression. As
152 ORAI1 function is regulated by its subcellular localization ⁴⁶, we next assessed its subcellular
153 distribution in GILZ^{ko} and CTRL DCs. As expected ⁴⁷, ORAI1 staining was detected mainly in
154 the periphery in CTRL DCs, with a punctuated pattern. ORAI1 distribution seemed more
155 diffuse in GILZ^{ko} DCs. The difference was even more clear in Tg-treated DCs, CTRL DCs
156 displaying as intense submembrane staining while GILZ^{ko} DCs kept a more diffuse staining
157 (Figure 4e). To quantify these differences, zones of strongest ORAI1 detection (i.e. staining
158 puncta, SP) were detected and their distance to the plasma membrane was measured. ORAI1
159 SP were more distant from the plasma membrane in GILZ^{ko} than in CTRL DCs (Figure 4 f). In
160 addition, 84% of ORAI1 SP were found within 2µm from the PM in CTRL DCs as compared
161 to 64% in the GILZ^{ko} DCs (Figure 4g). Altogether, these results show that ORAI1 and 2
162 expression is diminished in GILZ^{ko} DCs and that ORAI1 distribution is also affected, providing
163 a possible explanation to the SOCE defect harbored by these cells.

164 **Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1 inhibition reproduces GILZ deletion'** 165 **effects in DC**

166 We next sought to identify the mechanism linking GILZ deletion with the alterations in ORAI
167 protein expression and function. The SGK1 caught our attention, as it is known to both promote
168 ORAI1 expression and stabilization at the plasma membrane ⁴⁸ and physically interact with
169 GILZ, resulting in SGK1 stabilization ⁴⁹. Transcriptomic analysis did not show any SGK1
170 diminution of expression in GILZ^{ko} DCs. However, while SGK1 detection by
171 immunofluorescence revealed a diffuse punctuated staining in CTRL DCs, SGK1 seemed to be
172 more present in perinuclear regions of GILZ^{ko} DCs (Figure 5c). To determine whether SGK1
173 would contribute to the control of Ca²⁺ homeostasis and SOCE in DCs, we next used the SGK1
174 inhibitor GSK650394 (GSK). Remarkably, SGK1 inhibition in CTRL DCs reduced resting
175 [Ca²⁺]_{cyt} and SOCE to the same extent as GILZ deletion did (Figure 5a, b). Conversely, GSK
176 treatment had no effect on Ca²⁺ homeostasis nor SOCE in GILZ^{ko} DCs. Further analysis of
177 ORAI1 SP revealed that SGK1 inhibition led to a redistribution of ORAI1 in GSK-treated

178 CTRL DCs, with an increase of the ORAI1 SP distance to the plasma membrane. Accordingly,
179 less than 70 % of the ORAI1 SP were found within 2 μ m from the PM in SGK-treated DCs as
180 compared to 74.44% in GILZ^{ko} DCs (Figure 5d, e). Altogether, these results support the
181 conclusion that SGK1 promotes ORAI1 localization at subplasmalemmal compartments in DCs
182 (Figure 5d, e) and suggests that GILZ exerts its action on SOCE through SGK1.

183

184 **DISCUSSION**

185

186 MATERIAL AND METHODS

187 Mice

188 B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J male mice ⁵⁰, kind gift from Prof. B. Reizis, were crossed with
189 homozygous GILZ-floxed female mice ⁵¹, given by Prof. E. Morand, to generate CD11c-
190 GILZ^{KO} mice ²¹. Mice were bred in the Animex animal facility (IPSIT-SFR, UMS-US31-
191 UMS3679) under specific pathogen-free conditions. Experimentation was approved by the
192 local Ethics Committee for Animals (C2EA-26; Animal Care and use Committee, Villejuif,
193 France) and complied with French and European guidelines for the use of laboratory animals.
194 Male mice were used between 8 and 14 weeks of age.

195 Bone marrow derived dendritic cells

196 Bone marrow (BM) was flushed from femur and tibia. BM cells were cultured in complete
197 medium: RPMI GlutaMAXTM 1640 (Thermo Fischer scientific) complemented with FCS (10%,
198 HyClone), pre-mixed penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) solution (Gibco),
199 β2 mercaptoethanol (50 µM, PAN biotech). Standard Bone Marrow Derived dendritic
200 Cells (BMDCs) cultures performed with Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
201 (GM-CSF) only were prepared as described ⁵². 3.10⁶ BM cells were cultured for 8-10 days in
202 10 mL of complete medium with GM-CSF (20ng/mL – Biotechne). Medium was renewed at
203 day 3 and 6. To assess cDC subpopulations chemotaxis, Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
204 (FLT3-L) derived BMDCs (referred as FL-BMDCs) were prepared as described in ³⁹. 6.10⁶ BM
205 cells were cultured for 8-10 days in 10 mL of complete medium with GM-CSF and FLT3-L
206 (Biotechne). Briefly, culture was started with 100 ng/mL FLT3-L and 300 pg/mL GM-CSF for
207 6 days. On day 6, 10 mL of fresh medium containing 100ng/mL FLT3-L and 1ng/mL GM-CSF
208 was added. When appropriate, activation with 10⁻⁸ g/mL LPS was done 24h prior use. At day
209 8-10, for both BMDCs and FL-BMDCs cultures, non-adherent and semi-adherent cells were
210 detached with 2.5 mM PBS-EDTA for 10min at 37°C, washed and used for experiments. For
211 microchannels experiments, BMDCs were derived in Curie Institute as described ³⁴. For
212 maturation, 2.10⁵ BMDCs were activated 30 min with LPS (100 ng/mL, Sigma L6511). They
213 were then extensively washed and kept in complete medium 2h before being seeded in the gels.

214 Migration and macropinocytosis in microchannel

215 PDMS gels were fabricated as described in ^{34,53}. Plasma activated 4*5µm channel gels were
216 coated with fibronectin (10µg/mL, Sigma F1141-2MG) and washed. BMDCs or LPS-activated
217 BMDCs were put in the gel wells and left to migrate for 10-16h in complete medium at 37°C

218 and 5% CO₂ in the presence of Dextran-AF647 1 mg/mL (D1863, invitrogen). To measure
219 dextran uptake, automatic mask application was performed using Fiji software⁵⁴ to define cell
220 front. The rectangle in the channel allows to measure the maximum of dextran fluorescence.
221 The rectangle aside the cell represents the dextran background signal. Ratio of dextran intensity
222 was measured as [(dextran fluorescence in cell front – background) / (dextran fluorescence in
223 channel – background)] at the cell front of iDCs or mDCs. Various positions in the gels were
224 selected based on the quality of the channels and depicted every 2 or 4 min using an automated
225 laser-scanning microscope (Leica Dmi8/SP8) equipped with an oil-immersion objective, hybrid
226 detectors and laser diode (488 nm). Cell phase contrast was analysed using adapted Institute
227 Curie Home-made macro for Fiji software. For each condition, more than 50 cells were used to
228 perform statistical analysis.

229 **Transcriptomic analysis.**

230 Transcriptomic analysis was performed on mRNA extracted from three independent BMDC
231 cultures. 200ng of extracted RNA were reverse-transcribed in complementary DNA. cDNA
232 was transcribed in mRNA using T7 RNA polymerase to amplify the coding RNA [Kit Low
233 Input Quick Amp Labeling (Agilent Technologies); Kit RNA Spike-In (Agilent Technologies)
234 and Kit RNeasy Mini (Qiagen)]. The quality of the mRNA was assessed using the Bioanalyzer
235 2100 (Agilent Technologies) and Kit RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies).
236 Finally, 600 ng of mRNA were hybridized on a 8x60k Agilent technology CHIP using an
237 hybridization Oven (Agilent technology - G2545A) and fluorescence was quantified using a
238 Microarray scanner system (Agilent technology - G2565CA, Platform BRIDGE, INRA, Joy-
239 en-Josas). The heatmaps are generated using the Heatmapper web-site⁵⁵.

240 **Fluo4 assay**

241 [Ca²⁺]_{cyt} variation in BMDCs was assessed as follows. LN cells were prepared and stained for
242 membrane markers as previously described. Cells were resuspended in PBS at a concentration
243 of 4.10⁶ cells/500μL. A solution of 8ng/μL Fluo4-AM was added V/V (Thermofischer) to load
244 cells for 45 min under agitation at RT. Cells were washed in PBS and kept in pellet at 4°C for
245 acquisition on a flow cytometer within 2 hours. Measure of [Ca²⁺]_{cyto} variation were performed
246 as follows: cells resuspended in Ca²⁺-free PBS were acquired for 30 seconds to establish the
247 basal Fluo4-AM fluorescence. A solution of 0.8mM Ca²⁺ was then added V/V to the cells to
248 assess spontaneous Ca²⁺ entry for 30 seconds. A solution of 0.8mM Ca²⁺ and 2μM Tg was then
249 added V/V. Ca²⁺ entry into cells was recorded for 2 min. Some cells were not treated with Tg

250 and recorded to assess the spontaneous Ca^{2+} entry as a negative experimental control for each
251 sample. Finally, cells were treated with $1\mu\text{M}$ of ionomycin to assess the maximum Ca^{2+} entry
252 in cells. Ca^{2+} entry was expressed for each time point and sample using the formula: $[(\text{Tg}$
253 $\text{induced entry for a time point} - \text{basal Fluo4 fluorescence}) - (\text{Spontaneous } \text{Ca}^{2+} \text{ entry for the}$
254 $\text{same time point} - \text{basal Fluo4 fluorescence})] / (\text{ionomycin-induced } \text{Ca}^{2+} \text{ entry}) * 100$. Mean +/-
255 SEM values of the pooled data for each mouse is plotted. AUC are obtained by the addition of
256 the values recorded for all time points.

257 **Flow cytometry**

258 Cells were suspended in PBS-FBS 2%. 1.10^5 to 5.10^5 cells were incubated with anti-CD16/32
259 monoclonal antibodies (mAb) at 4°C for 5 min. The appropriate combination of mAbs and
260 Fixable Viability Dye was then added and cells were further incubated for 20min at 4°C . For
261 intracellular staining cells were fixed either with BD Bioscience[®] fixation permeabilization
262 buffer for 30 min at 4°C or with Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo
263 Fischer scientific) for 50 min at RT (ORAI 1, 2 and 3 staining). Events were acquired on a LSR
264 Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and analyzed using FlowJo
265 Software (Tree Star Inc. Stanford, USA).

266 **Cytosolic Ca^{2+} concentration**

267 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was recorded by a fluorometric ratio technique as in ⁵⁶. BMDC were resuspended at
268 10^6 cells/mL in PBS supplemented with 1 mg/mL FCS and incubated in the dark with $4\mu\text{M}$
269 Indo-1-AM for 45 min at room temperature under slow agitation. Cells were then centrifuged
270 and resuspended in Ca^{2+} -free Hepes Buffered Saline solution (HBS; 135 mM NaCl, 5.9 mM
271 KCl, 1.2 mM MgCl_2 , 11.6 mM Hepes, 11.5 mM glucose adjusted to pH 7.3 with NaOH) prior
272 to measurement. After centrifugation, 0.5 to 1.10^6 cells were suspended in 2 mL HBS in a quartz
273 cuvette and inserted into a Spectro fluorophotometer (RF-1501 Shimadzu Corporation, Kyoto,
274 Japan) connected to a PC computer (Dell Computer Corp., Montpellier, France). A temperature
275 of 37°C was maintained during the experiment. Ultraviolet light of 360 nm was used Indo-1
276 excitation, and emissions at 405 and 480 nm were recorded. Background and autofluorescence
277 of the cell suspension were subtracted from the recordings. The maximum Indo-1 fluorescence
278 (R_{max}) was obtained by adding $1\mu\text{M}$ ionomycin to the cell suspension in the presence of 10 mM
279 CaCl_2 . Minimum fluorescence was determined following depletion of external Ca^{2+} with 5 mM
280 EGTA. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was calculated according to the equation $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = K_d (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$,
281 where K_d is the apparent dissociation constant of Indo-1-calcium complex (230 nM), and R is

282 the ratio of fluorescence values recorded at 380 nm in absence and presence of 10 mM CaCl₂.
283 In our experiments, 1 mM CaCl₂ was used. After stabilization, the resting [Ca²⁺]_{cyt} was recorded
284 during 30s to 1 min. Next, to activate SOCE, the cells were treated with 1 μM thapsigargin (Tg,
285 T7459; Thermofischer). Area under the curves (AUC) are the result of the addition of every
286 value recorded by time point. The delta AUC were calculated by normalizing the value to the
287 resting [Ca²⁺]_{cyt}. In quenching experiments, Mn²⁺ ions were used to bleach the FURA-2
288 fluorescence. Mn²⁺ ions cannot be pumped out as they inactivate Na/Ca transporters and are
289 not transported by the Ca-ATPase. The velocity of fluorescence reduction mirrors the capacity
290 of ions (Mn²⁺ / Ca²⁺) to enter the cell.

291 **Confocal analysis and fluorescence quantification.**

292 After intracellular staining for ORAI proteins as in ⁴⁴, cells were washed twice with PBS,
293 resuspended in non-crystallizing mounting medium (TA-030-FA, thermofischer) and mounted
294 for immunofluorescence (5.10⁵ cells/μL). Cells images were acquired on a Leica confocal
295 microscope (TCS SP8 – Gated STED). Images were taken at the nucleus focal plan. Staining
296 puncta SP distance to the plasma membrane was calculated using Fiji software. Briefly, ORAI
297 staining was considered as non-homogenous and containing puncta of maximal fluorescence as
298 it is considered to form microdomains/hotspots ⁴⁷. We used the Fiji software function “Find
299 Maximas” and “distance map” to calculate the distances of each hotspot to the plasma
300 membrane.

301 **Transwell assays**

302 2 to 3.10⁵ cells were resuspended in 70μL of 1% FBS RPMI GlutaMAX™ 1640 and placed in
303 the insert of a transwell plate (5μm pore size; Corning Costar). FL-BMDC were allowed to
304 migrate for 4h toward 3nM CCL21 (3nM, 4h, Biotechne) or for 2h toward 1nM CXCL12 (1nM,
305 2h, R&D system) at 37°C. Experiment was controlled with spontaneous migration of FL-
306 BMDC. After chemotaxis, cells were recovered using 2.5 mM PBS-EDTA. Cells were analyzed
307 using the LSR Fortessa. Chemotaxis was assessed using the formula: (number of cells migrating
308 to the lower chamber in response to chemokine) - (number of cells migrating spontaneously) ×
309 100 / number of cells in the input. Results are expressed as ratio to CTRL.

310 **Mouse sample isolation**

311 Mouse skin was delicately shaved post-mortem. Skin pieces were recovered, weighted on a
312 precision scale and let on ice in petri dishes. They were incubated dermal part facing the

313 solution in 4 mL of dispase (2.4 U/mL; Gibco) for 20h at 4°C. Epidermis and dermis were
314 separated and cut into small pieces, then digested in 1 mg/mL collagenase D and 12.5 U/mL
315 DNase I (Roche, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 h at 37°C. Cell suspensions were further
316 disrupted with 18-G syringes and incubated 15 min at 37°C. Spleen and LN were incubated
317 with 1 mg/mL collagenase D for 30min at 37°C. Cell suspensions were filtered through either
318 a 70 µm cell strainer or a 40 µm cell strainer for skin, counted and stained for flow cytometry.

319 **FITC painting**

320 Mice abdomens and flanks were shaved two days before the experiment. For FITC painting, at
321 day 0, a solution of Fluorescein isothiocyanate (FITC) (1 mg/mL in acetone; Merck) was mixed
322 50%/50% with Dibutyl phthalate (Thermo Fischer scientific) and 100 µL were applied on mice
323 abdomen. Inguinal lymph nodes were collected 24h or 72h later.

324

325 **Statistical analysis.**

326 Statistical tests, number of independent experiments and number of samples are described in
327 each figure legend. Except for transcriptomic analysis, all tests were run on GraphPad Prism
328 software (V8). Transcriptomic analysis ANOVA was run on R software.

329

330 **REFERENCES**

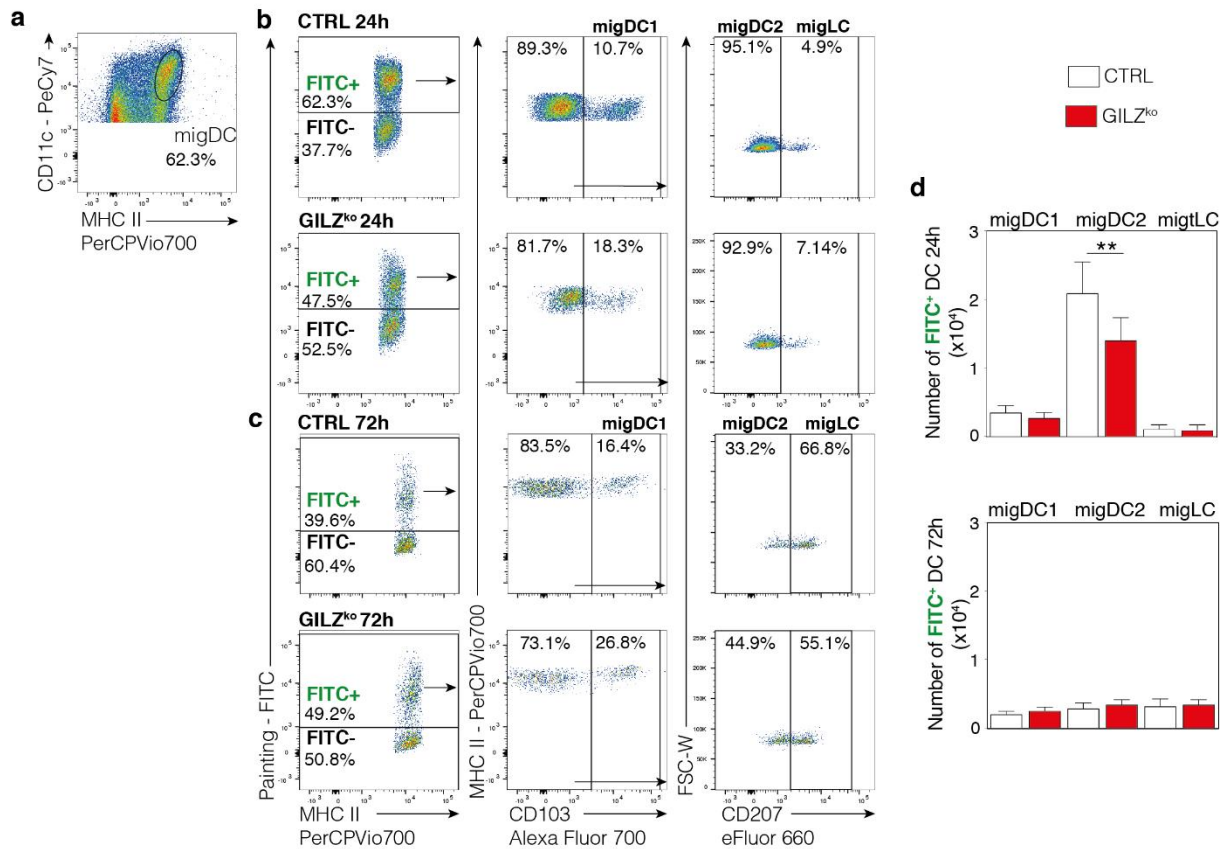
- 331 1. Williams, M., Dutertre, C.-A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichiën, D., Chakarov, S., Van
 332 Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M. & De Pijck, S. Unsupervised high-dimensional analysis
 333 aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity* **45**, 669–684 (2016).
- 334 2. Vu Manh, T. P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I. & Dalod, M. Investigating
 335 evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions. *Front. Immunol.* **6**,
 336 (2015).
- 337 3. Reizis, B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* **50**,
 338 37–50 (2019).
- 339 4. Segura, E., Durand, M. & Amigorena, S. Similar antigen cross-presentation capacity and
 340 phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J.*
 341 *Exp. Med.* **210**, 1035–1047 (2013).
- 342 5. Eisenbarth, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat.*
 343 *Rev. Immunol.* **19**, 89–103 (2019).
- 344 6. Worbs, T., Hammerschmidt, S. I. & Förster, R. Dendritic cell migration in health and disease.
 345 *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 30–48 (2017).
- 346 7. Macri, C., Pang, E. S., Patton, T. & O’Keeffe, M. Dendritic cell subsets. *Semin. Cell Dev. Biol.*
 347 **84**, 11–21 (2018).
- 348 8. Bieber, K. & Autenrieth, S. E. Dendritic cell development in infection. *Mol. Immunol.* **121**,
 349 111–117 (2020).
- 350 9. Hilligan, K. L. & Ronchese, F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of
 351 CD4+ T helper cell responses. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 587–599 (2020).
- 352 10. Vega-Ramos, J., Roquilly, A., Asehnoune, K. & Villadangos, J. A. Modulation of dendritic cell
 353 antigen presentation by pathogens, tissue damage and secondary inflammatory signals. *Curr.*
 354 *Opin. Pharmacol.* **17**, 64–70 (2014).
- 355 11. Li, H. & Shi, B. Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cell. Mol.*
 356 *Immunol.* **12**, 24–30 (2015).
- 357 12. Švajger, U. & Rožman, P. Induction of tolerogenic dendritic cells by endogenous
 358 biomolecules: An update. *Front. Immunol.* **9**, 1–17 (2018).
- 359 13. Xavier, A. M., Anunciato, A. K. O., Rosenstock, T. R. & Glezer, I. Gene expression control by
 360 glucocorticoid receptors during innate immune responses. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **7**, 1–
 361 8 (2016).
- 362 14. Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot,
 363 M. C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P., Peuchmaur, M., Riccardi, C. & Emilie, D.
 364 Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: An anti-
 365 inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood*
 366 **101**, 729–738 (2003).
- 367 15. Cohen, N., Mouly, E., Hamdi, H., Maillot, M. C., Pallardy, M., Godot, V., Capel, F., Balian,
 368 A., Naveau, S., Galanaud, P., Lemoine, F. M. & Emilie, D. GILZ expression in human
 369 dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response.
 370 *Blood* **107**, 2037–2044 (2006).
- 371 16. Hamdi, H., Godot, V., Maillot, M. C., Prejean, M. V., Cohen, N., Krzysiek, R., Lemoine, F.
 372 M., Zou, W. & Emilie, D. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human
 373 dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* **110**, 211–219

- 374 (2007).
- 375 17. Lebson, L., Wang, T., Jiang, Q. & Whartenby, K. A. Induction of the glucocorticoid-induced
376 leucine zipper gene limits the efficacy of dendritic cell vaccines. *Cancer Gene Ther.* **18**, 563–
377 570 (2011).
- 378 18. Calmette, J., Ellouze, M., Tran, T., Karaki, S., Ronin, E., Capel, F., Pallardy, M., Bachelerie,
379 F., Krzysiek, R., Emilie, D., Schlecht-Louf, G. & Godot, V. Glucocorticoid-Induced Leucine
380 Zipper Enhanced Expression in Dendritic Cells Is Sufficient To Drive Regulatory T Cells
381 Expansion In Vivo. *J. Immunol.* **193**, 5863–5872 (2014).
- 382 19. Benkhoucha, M., Molnarfi, N., Dunand-Sauthier, I., Merkler, D., Schneiter, G., Bruscoli, S.,
383 Riccardi, C., Tabata, Y., Funakoshi, H., Nakamura, T., Reith, W., Santiago-Raber, M.-L. &
384 Lalive, P. H. Hepatocyte Growth Factor Limits Autoimmune Neuroinflammation via
385 Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Expression in Dendritic Cells. *J. Immunol.* **193**, 2743–
386 2752 (2014).
- 387 20. Karaki, S., Garcia, G., Tcherakian, C., Capel, F., Tran, T., Pallardy, M., Humbert, M., Emilie,
388 D. & Godot, V. Enhanced glucocorticoid-induced leucine zipper in dendritic cells induces
389 allergen-specific regulatory CD4+T-cells in respiratory allergies. *Allergy Eur. J. Allergy Clin.*
390 *Immunol.* **69**, 624–631 (2014).
- 391 21. Calmette, J., Bertrand, M., Vétillard, M., Ellouze, M., Flint, S., Nicolas, V., Biola-Vidamment,
392 A., Pallardy, M., Morand, E., Bachelerie, F., Godot, V. & Schlecht-Louf, G. Glucocorticoid-
393 Induced Leucine Zipper Protein Controls Macropinocytosis in Dendritic Cells. *J. Immunol.*
394 **197**, 4247–4256 (2016).
- 395 22. Vétillard, M. & Schlecht-Louf, G. Glucocorticoid-induced leucine zipper: Fine-tuning of
396 dendritic cells function. *Front. Immunol.* **9**, 1–8 (2018).
- 397 23. Yang, H., Xia, L., Chen, J., Zhang, S., Martin, V., Li, Q., Lin, S., Chen, J., Calmette, J., Lu,
398 M., Fu, L., Yang, J., Pan, Z., Yu, K., He, J., Morand, E., Schlecht-Louf, G., Krzysiek, R. *et al.*
399 Stress–glucocorticoid–TSC22D3 axis compromises therapy-induced antitumor immunity. *Nat.*
400 *Med.* **25**, 1428–1441 (2019).
- 401 24. Cathelin, D., Met, Ö. & Svane, I. M. Silencing of the glucocorticoid-induced leucine zipper
402 improves the immunogenicity of clinical-grade dendritic cells. *Cytotherapy* **15**, 740–749
403 (2013).
- 404 25. Ng, L. G., Hsu, A., Mandell, M. A., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., Iparraguirre, A.,
405 Cavanagh, L. L., Triccas, J. A., Beverley, S. M., Scott, P. & Weninger, W. Migratory dermal
406 dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog.* **4**, (2008).
- 407 26. Lelouard, H., Fallet, M., De Bovis, B., Méresse, S. & Gorvel, J. Peyer’s patch dendritic cells
408 sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores.
409 *Gastroenterology* **142**, 592-601.e3 (2012).
- 410 27. Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K. W., Zigmond, E., Furtado, G. C., Lira, S.
411 A. & Shakhar, G. Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal
412 Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation. *Immunity* **38**, 581–595 (2013).
- 413 28. Li, X., Han, Y., Zhou, Q., Jie, H., He, Y., Han, J., He, J., Jiang, Y. & Sun, E. Apigenin, a
414 potent suppressor of dendritic cell maturation and migration, protects against collagen-induced
415 arthritis. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 170–180 (2016).
- 416 29. Tamoutounour, S., Guilliams, M., MontananaSanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C.,
417 Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B. & Henri, S. Origins
418 and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived
419 dendritic cells in mouse skin. *Immunity* **39**, 925–938 (2013).

- 420 30. Moreau, H. D., Piel, M., Voituriez, R. & Lennon-Duménil, A. M. Integrating Physical and
421 Molecular Insights on Immune Cell Migration. *Trends Immunol.* **39**, 632–643 (2018).
- 422 31. Lavi, I., Piel, M., Lennon-Duménil, A. M., Voituriez, R. & Gov, N. S. Deterministic patterns in
423 cell motility. *Nat. Phys.* **12**, 1146–1152 (2016).
- 424 32. Tiberio, L., Del Prete, A., Schioppa, T., Sozio, F., Bosisio, D. & Sozzani, S. Chemokine and
425 chemotactic signals in dendritic cell migration review-article. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, (2018).
- 426 33. Lämmermann, T. & Kastenmüller, W. Concepts of GPCR-controlled navigation in the immune
427 system. *Immunol. Rev.* **289**, 205–231 (2019).
- 428 34. Moreau, H. D., Blanch-Mercader, C., Attia, R., Maurin, M., Alraies, Z., Sanséau, D., Malbec,
429 O., Delgado, M. G., Bousso, P., Joanny, J. F., Voituriez, R., Piel, M. & Lennon-Duménil, A.
430 M. Macropinocytosis Overcomes Directional Bias in Dendritic Cells Due to Hydraulic
431 Resistance and Facilitates Space Exploration. *Dev. Cell* **49**, 171-188.e5 (2019).
- 432 35. West, M. A., Wallin, R. P. A., Matthews, S. P., Svensson, H. G., Zaru, R., Ljunggren, H. G.,
433 Prescott, A. R. & Watts, C. Enhanced dendritic cell antigen capture via Toll-like receptor-
434 induced actin remodeling. *Science (80-.).* **305**, 1153–1157 (2004).
- 435 36. Watts, C., West, M. A. & Zaru, R. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic
436 cells. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 124–130 (2010).
- 437 37. Granucci, F., Ferrero, E., Foti, M., Aggujaro, D., Vettoretto, K. & Ricciardi-Castagnoli, P.
438 Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect.* **1**, 1079–1084
439 (1999).
- 440 38. Chabaud, M., Heuze, M. L., Bretou, M., Vargas, P., Maiuri, P., Solanes, P., Maurin, M.,
441 Terriac, E., Le Berre, M., Lankar, D., Piolot, T., Adelstein, R. S., Zhang, Y., Sixt, M.,
442 Jacobelli, J., Benichou, O., Voituriez, R., Piel, M. *et al.* Cell migration and antigen capture are
443 antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells. *Nat. Commun.* **6**, 1–15 (2015).
- 444 39. Sathe, P., Pooley, J., Vremec, D., Mintern, J., Jin, J.-O., Wu, L., Kwak, J.-Y., Villadangos, J.
445 A. & Shortman, K. The Acquisition of Antigen Cross-Presentation Function by Newly Formed
446 Dendritic Cells. *J. Immunol.* **186**, 5184–5192 (2011).
- 447 40. Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E., Donato,
448 V., Migliorati, G. & Riccardi, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-κB
449 interaction: Role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **35**,
450 517–528 (2007).
- 451 41. Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D’Adamio, F.
452 & Riccardi, C. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper
453 factor via inhibition of nuclear factor κB. *Blood* **98**, 743–753 (2001).
- 454 42. Sáez, P. J., Sáez, J. C., Lennon-Duménil, A. M. & Vargas, P. Role of calcium permeable
455 channels in dendritic cell migration. *Curr. Opin. Immunol.* **52**, 74–80 (2018).
- 456 43. Feske, S., Wulff, H. & Skolnik, E. Y. *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. Annual*
457 *Review of Immunology* vol. 33 (2015).
- 458 44. Jaracz-Ros, A., Hémon, P., Krzysiek, R., Bachelierie, F., Schlecht-Louf, G. & Gary-Gouy, H.
459 OMIP-048 MC: Quantification of calcium sensors and channels expression in lymphocyte
460 subsets by mass cytometry. *Cytom. Part A* **93**, 681–684 (2018).
- 461 45. Bandyopadhyay, B. C., Pingle, S. C. & Ahern, G. P. Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic
462 cells occurs independently of STIM1. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 57–62 (2011).
- 463 46. Hodeify, R., Selvaraj, S., Wen, J., Arredouani, A., Hubrack, S., Dib, M., Al-Thani, S. N.,
464 McGraw, T., And & Machaca, K. A STIM1-dependent ‘trafficking trap’ mechanism regulates

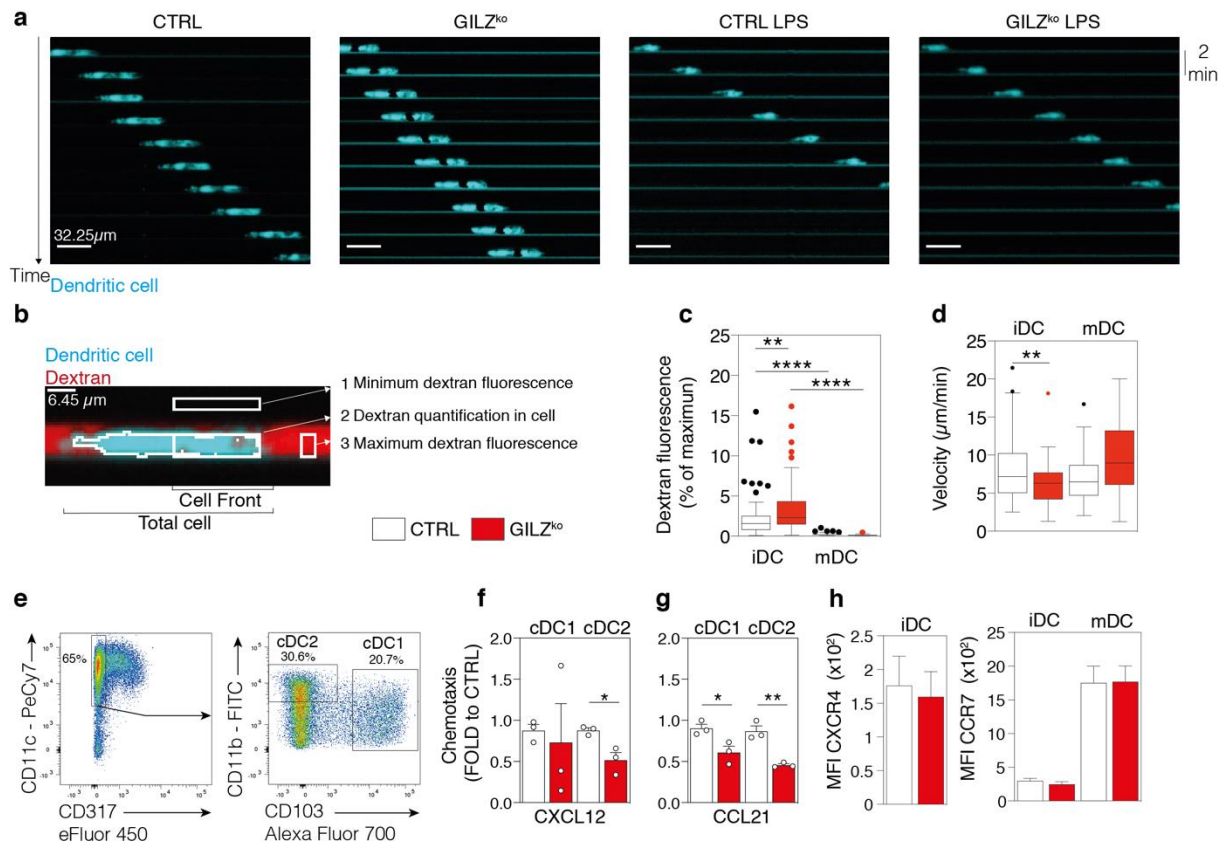
- 465 Orai1 plasma membrane residence and Ca²⁺ influx levels. *Stem Cells* (2012).
- 466 47. Nunes, P., Cornut, D., Bochet, V., Hasler, U., Oh-Hora, M., Waldburger, J. M. & Demaurex,
467 N. STIM1 juxtaposes ER to phagosomes, generating Ca²⁺ hotspots that boost phagocytosis.
468 *Curr. Biol.* **22**, 1990–1997 (2012).
- 469 48. Eylestein, A., Gehring, E. M., Heise, N., Shumilina, E., Schmidt, S., Szteyn, K., Münzer, P.,
470 Nurbaeva, M. K., Eichenmüller, M., Tyan, L., Regel, I., Föllner, M., Kuhl, D., Soboloff, J.,
471 Penner, R. & Lang, F. Stimulation of Ca²⁺-channel Orai1/STIM1 by serum-and
472 glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *FASEB J.* **25**, 2012–2021 (2011).
- 473 49. Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D. & Pearce, D. Glucocorticoid-induced leucine zipper 1
474 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced
475 kinase 1 stability and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **285**, 39905–39913 (2010).
- 476 50. Caton, M. L., Smith-Raska, M. R. & Reizis, B. Notch-RBP-J signaling controls the
477 homeostasis of CD8⁻ dendritic cells in the spleen. *J. Exp. Med.* **204**, 1653–1664 (2007).
- 478 51. Ngo, D., Beaulieu, E., Gu, R., Leaney, A., Santos, L., Fan, H., Yang, Y., Kao, W., Xu, J.,
479 Escriou, V., Loiler, S., Vervoordeldonk, M. J. & Morand, E. F. Divergent effects of
480 endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of
481 inflammation and arthritis. *Arthritis Rheum.* **65**, 1203–1212 (2013).
- 482 52. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. &
483 Steinman, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow
484 cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*
485 **176**, 1693–1702 (1992).
- 486 53. Faure-André, G., Vargas, P., Yuseff, M. I., Heuzé, M., Diaz, J., Lankar, D., Steri, V., Manry,
487 J., Hugues, S., Vascotto, F., Boulanger, J., Raposo, G., Bono, M. R., Roseblatt, M., Piel, M.
488 & Lennon-Duménil, A. M. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-
489 associated invariant chain. *Science (80-)*. **322**, 1705–1710 (2008).
- 490 54. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch,
491 S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri,
492 K., Tomancak, P. & Cardona, A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis.
493 *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
- 494 55. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A. & Wishart, D. S.
495 Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* **44**, W147–W153 (2016).
- 496 56. Doignon, I., Fayol, O. & Dellis, O. Improvement of the rituximab-induced cell death by
497 potentiation of the store-operated calcium entry in mantle cell lymphoma cell lines. *Oncotarget*
498 **10**, 4466–4478 (2019).
- 499

500 **FIGURES**



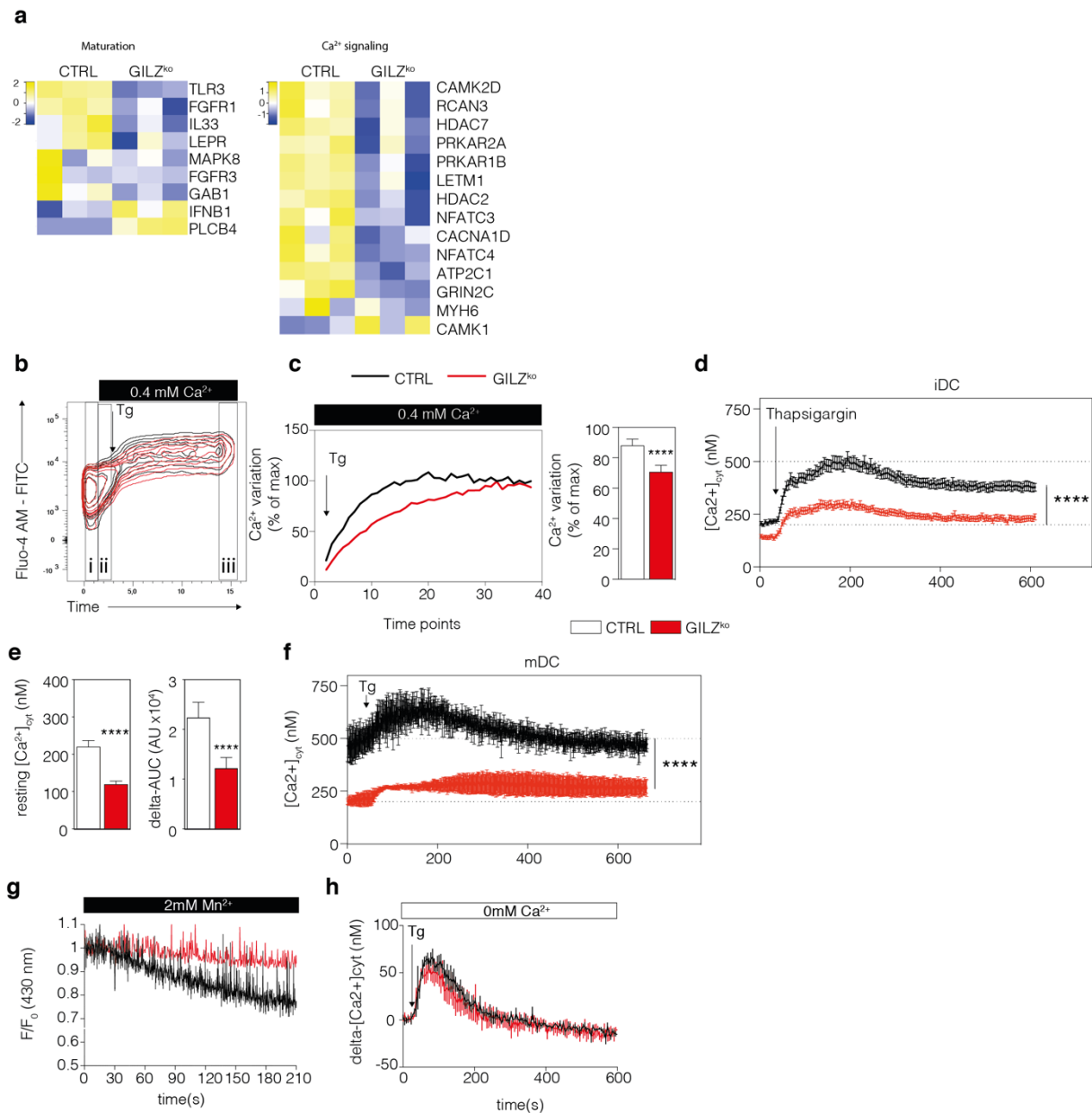
501

502 **FIGURE 1: GILZ deletion limits skin cDC2 migration to lymph nodes in vivo.** Skin DC subset
 503 migration to LN was analysed 24h and 72h after FITC application. **a**) Migratory DCs (migDC) were
 504 defined as viable, CD3⁺CD317⁺CD11c⁺MHCII^{hi} cells. **b, c**) FITC⁺ migDCs were identified in control
 505 (top) or CD11c-GILZ^{ko} mice (bottom) 24h (**b**) or 72h (**c**) after FITC application and further subdivided
 506 into migDC1 (CD103⁺CD207⁺), migDC2 (CD103⁻CD207⁻) and migLC (CD103⁻CD207⁺) subsets. **c**)
 507 Numbers of FITC⁺ migDC1, migDC2 and migLC 24h (top) and 72h (bottom) after FITC application.
 508 Data are expressed as mean +/- SEM. n= 9 to 11 mice from 5 independent experiments for 24h time
 509 point; n= 7 to 8 mice from 3 independent experiments for 72h time point. Paired t test ** p<0.01.



510

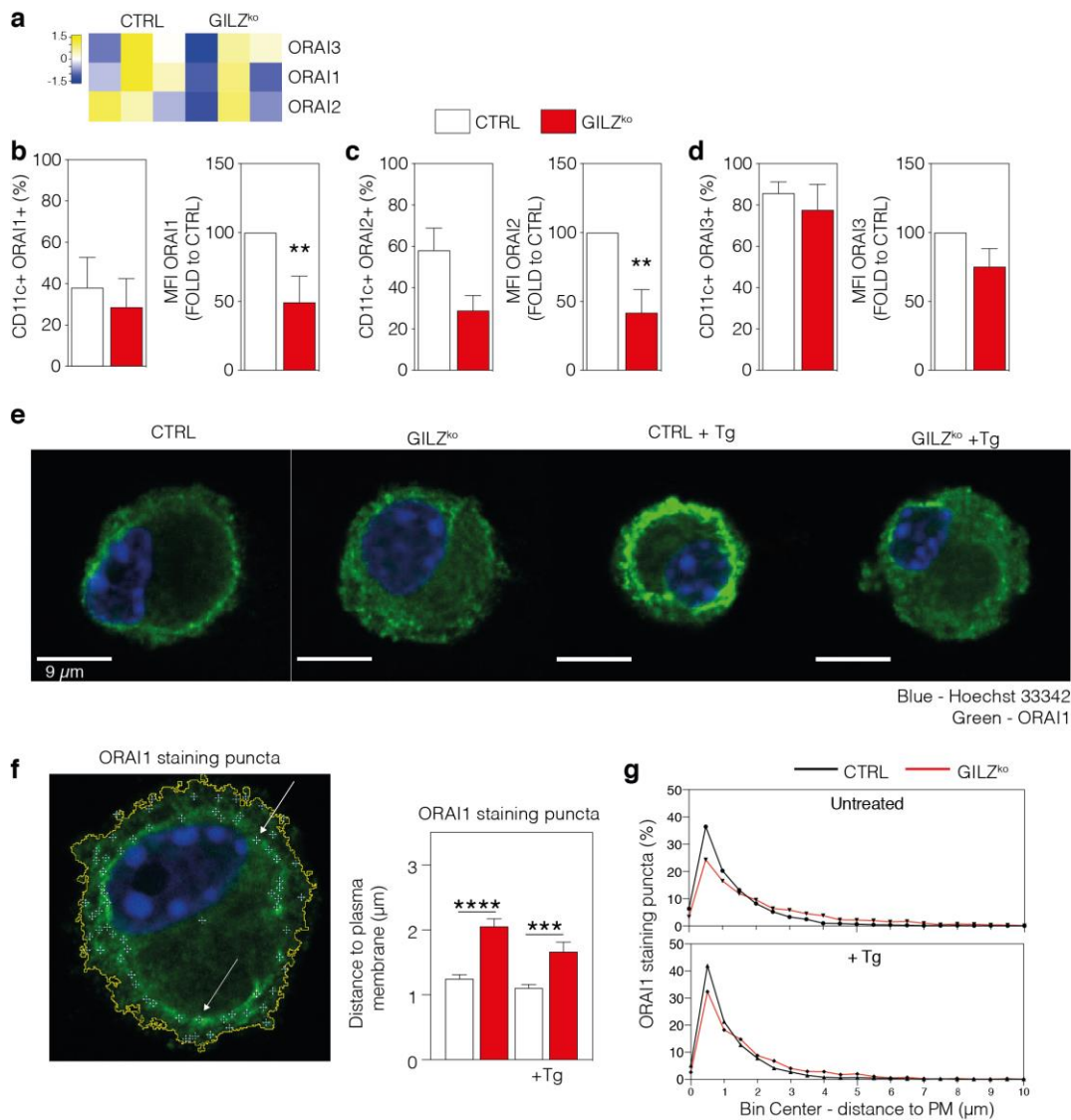
511 **FIGURE 2: GILZ deletion reduces DC migration speed and chemotaxis.** A) Kymographs of CTRL
 512 or GILZ^{ko} immature (iDC) and mature (mDC) BMDCs migrating in microchannels, acquired every 2
 513 min. b) Representative cell obtain after image J (fiji) software analysis. The rectangle on the cell
 514 represents the automatic mask application identifying cells front, where the number of macropinosomes
 515 and the % of dextran intensity are quantified. The rectangle in the channel gives the maximal dextran
 516 fluorescence intensity. The rectangle aside the cell gives the background signal. c) Dextran fluorescence
 517 expressed as % of maximal dextran intensity. d) Quantification of migration speed for iDCs and mDCs.
 518 One representative experiment out of 3 is shown. n=135 CTRL iDCs, n= 118 GILZ^{ko} iDCs, n=48 CTRL
 519 mDCs, n= 44 GILZ^{ko} mDCs. Kruskal-Wallis test ** p<0.01; **** p<0.0001. Mean +/- SEM. e-h)
 520 Transwell assay was performed on FL-BMDC. e) Gating strategy for FL-BMDC cDC1 (CD64⁻
 521 CD11c⁺CD11b⁻CD103⁺) and cDC2 (CD64⁻CD11c⁺CD11b⁺CD103⁻) subsets. f) Chemotaxis of immature
 522 FL-BMDC toward CXCL12. g) Chemotaxis of mature FL-BMDC toward CCL21. f, g) Data were
 523 normalized to CTRL for each DC subset and results expressed as mean +/-SEM. h) CXCR4 and CCR7
 524 expression levels in iDCs or mDCs expressed as mean +/-SEM of delta mean fluorescence intensity
 525 (MFI). Data are from 3 independent experiments. Unpaired t test ** p<0.01; *p<0.05.



526

527 **FIGURE 3: GILZ deletion alters Ca²⁺ homeostasis and SOCE in DC.** a) Heat maps showing GILZ-
 528 induced changes in gene-expression from selected pathways defined by QIAGEN IPA software. b, c)
 529 Quantification of cytosolic Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_{cyto}) variation in Fluo-4 AM-loaded BMDC upon
 530 exposure to 1μM thapsigargin (Tg). b) Representative gating strategy for [Ca²⁺]_{cyto} variation
 531 measurement in DC (for detailed strategy, see Figure suppl 1). c) Quantification of Ca²⁺ entry in Fluo4-
 532 AM-loaded BMDCs expressed as mean +/- SEM of [Ca²⁺]_{cyto} variations at every time point. d-g)
 533 Fluorometric quantification of [Ca²⁺]_{cyto} was performed in Indo-1-loaded iDC, d) and mDC, f) BMDCs.
 534 d-g) Kinetic evolution of [Ca²⁺]_{cyto} before and after treatment with 1μM Tg (arrow). e) Resting [Ca²⁺]_{cyto}
 535 (before Tg treatment) and [Ca²⁺]_{cyto} variations expressed as Area Under the Curve (AUC, arbitrary units)
 536 and corrected by subtracting resting [Ca²⁺]_{cyto}, are shown for iDC. n=10 CTRL and n=11 GILZ^{ko} DC
 537 preparations from 7 independent experiments. Kruskal-Wallis ****p<0.0001. g) Same as e) for mDCs.
 538 n=1 CTRL and 1 GILZ^{ko} from 1 pilot experiment. h) Mn²⁺ quenching was assessed in iDCs, n=1 pilot

539 experiment. **i)** Tg-induced Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum, measured in absence of
 540 extracellular Ca^{2+} . One representative experiment out of 3 is shown.
 541

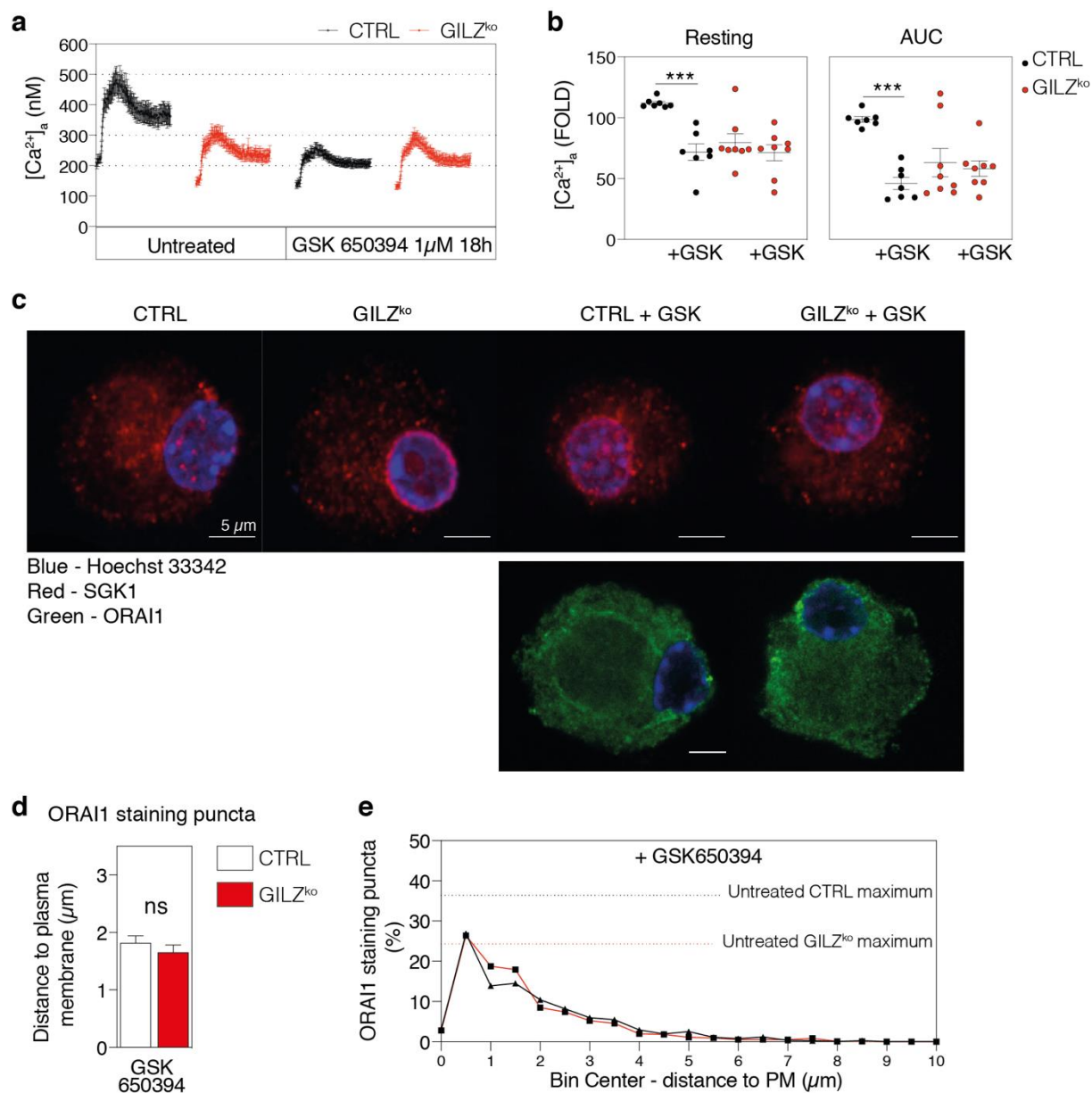


542

543 **FIGURE 4: GILZ deletion alters ORAI1 and 2 expression and ORAI1 sub-cellular localization.**

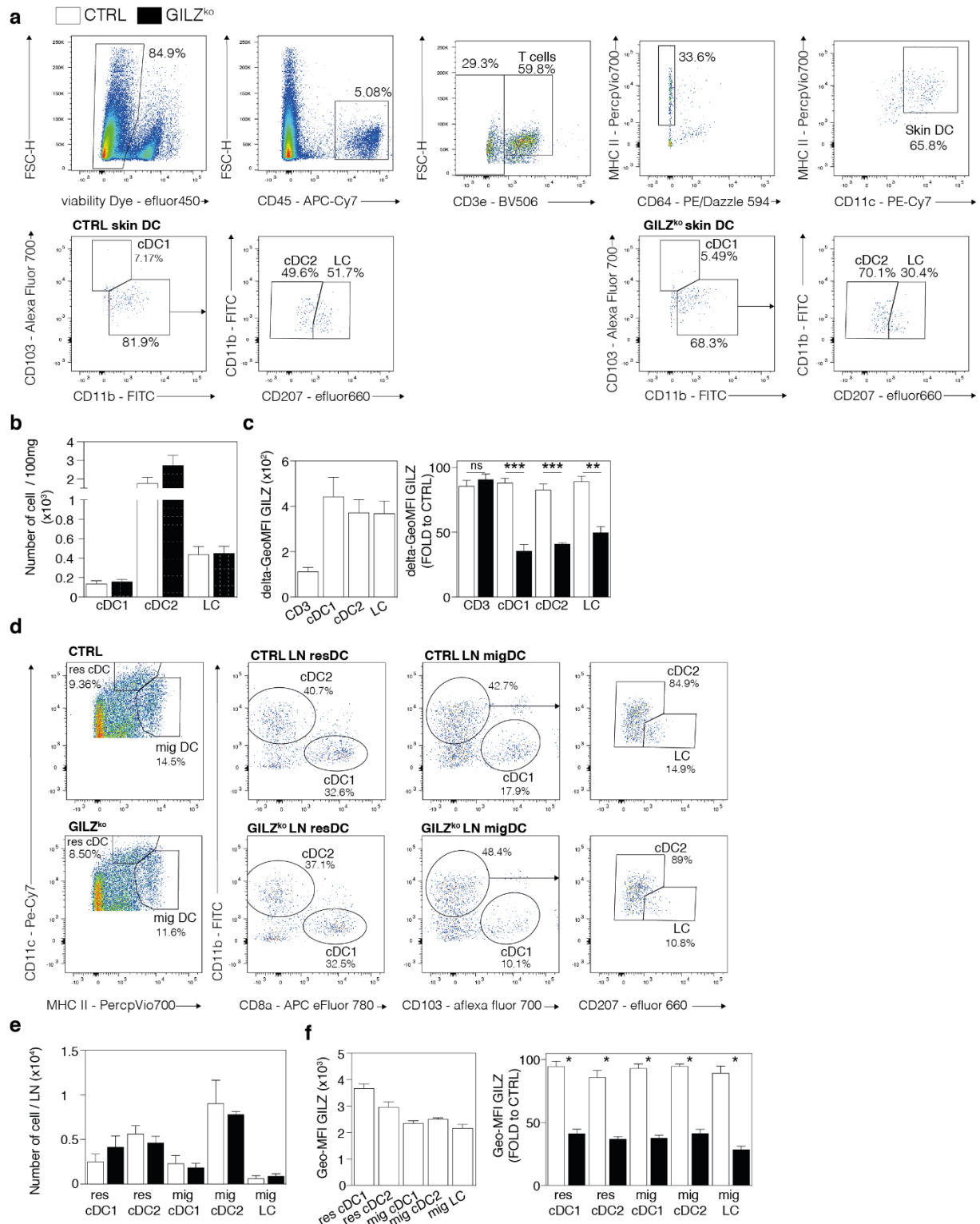
544 **a)** Heatmap showing expression of ORAI Ca^{2+} channels. **b)** ORAI 1, 2 and 3 expression was quantified
 545 in BMDCs. **b)** Left, percentage of DC positive for ORAI 1 (**b**), 2 (**c**) and 3 (**d**) expression and right,
 546 levels of ORAI 1 (**b**), 2 (**c**) and 3 (**d**) expression by CD11c⁺ cells. MFI are expressed as ratio to CTRL
 547 for each experiment. Mean +/- SEM are shown. n= 5 CTRL and GILZ^{ko} DC preparations from 5
 548 independent experiments. Mann-Whitney test **p < 0.01, Mean +/- SEM. **e)** Representative confocal
 549 microscopy images of, in that order, CTRL, GILZ^{ko}, Tg-treated CTRL and GILZ^{ko} BMDCs. **f)**
 550 Representative image showing staining puncta (SP, white arrows) in CTRL BMDCs. Bar graphs show
 551 the mean +/- SEM of SP distance to the plasma membrane (PM, yellow line). **g)** distribution of SP in
 552 DCs. Data are from 3 independent experiments for untreated DCs and 2 experiments for Tg-treated DCs.

553 The number of cells analysed are n= 60 for CTRL, n= 50 for GILZ^{ko}, n= 37 for CTRL + Tg and n= 37
554 for GILZ^{ko} + Tg DCs. Mann-Whitney test ****p<0.0001, ***p<0.001.



555

556 **FIGURE 5: SGK1 inhibition reproduces the effects of GILZ deletion in DCs.** **a, b** Fluorometric
 557 quantification of $[Ca^{2+}]_{cyto}$ in BMDCs, before and after treatment with $1\mu M$ Tg. Certain cells were pre-
 558 treated with SGK1 inhibitor GSK650394. **a)** Representation of $[Ca^{2+}]_{cyto}$ before and after Tg treatment.
 559 Untreated samples correspond to part of those depicted in figure 3 and are shown to facilitate
 560 comparison. **b)** Means of resting $[Ca^{2+}]_{cyto}$ and AUC were normalized to the CTRL for each experiment
 561 and expressed as FOLD to CTRL. Mean \pm SEM. $n = 7$ CTRL DCs, $n = 8$ $GILZ^{ko}$ DCs, $n = 7$ GSK-
 562 treated CTRL DCs, $n = 8$ GSK-treated $GILZ^{ko}$ DCs from 4 experiments. Mann-Whitney $***p < 0.001$.
 563 **c)** Representative immunofluorescence images of CTRL, $GILZ^{ko}$, GSK-treated CTRL and $GILZ^{ko}$
 564 BMDCs Mean \pm SEM. **d)** ORAI1 SP distance to the plasma membrane. Mean \pm SEM. **e)** distribution
 565 of SP in DCs. $n = 15$ GSK-treated CTRL DCs, $n = 20$ GSK-treated $GILZ^{ko}$ DCs from 2 independent
 566 experiments.



567

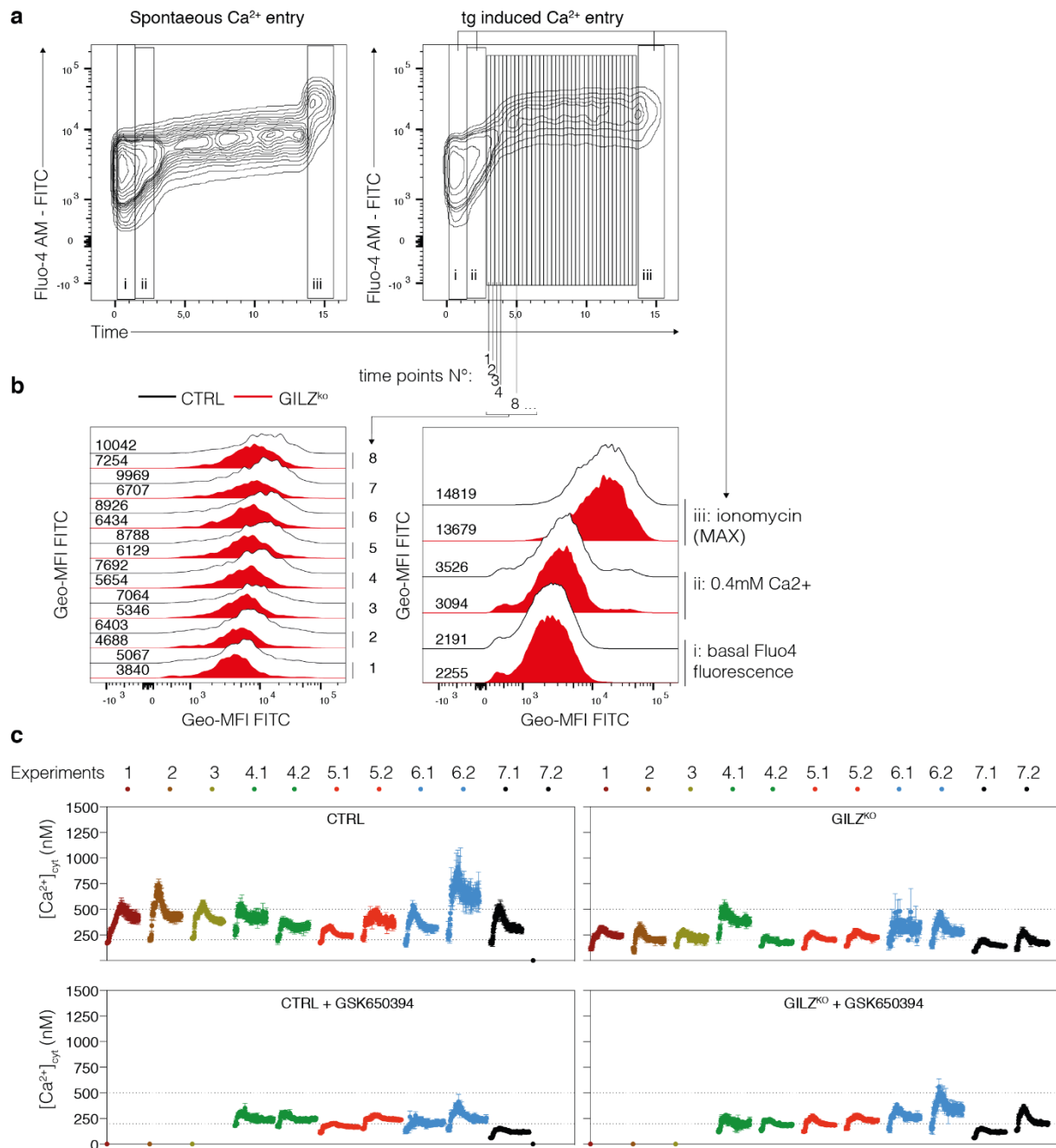
568 **SUPPLEMENTAL FIGURE 1: GILZ deletion does not impair skin or lymph nodes DC numbers**
 569 **and frequency at steady state.** **a, b** Flow cytometric analysis of T cells, cDC1, 2 and LC in the skin
 570 of CTRL and GILZ^{ko} mice. **a)** Gating strategy for T cells, cDC1, 2 and LC. **b)** Number of cDC1, cDC2
 571 and LC in 100mg of skin. **c)** GILZ expression (delta Geometrical MFI) in T cells, cDC1, 2 and LC in
 572 CTRL (left) or GILZ^{ko} (right) skin, expressed as ratio to CTRL for each population. Mean +/- SEM. n=

573 10 CTRL mice, n= 8 GILZ^{ko} mice from 2 experiments. Mann-Whitney ***p<0.001, **p<0.01. **d,f)** Flow
574 cytometric analysis of cDC1, 2, LC in the lymph node (LN) of CTRL and GILZ^{ko} mice. **d)** Gating
575 strategy for LN resident cDC1, 2 and migrated (mig DC) cDC1, 2 and LC, In CTRL (top) or GILZ^{ko}
576 (bottom) mice. **e)** number of resDC and migDC, LC. **f)** GILZ expression (delta Geometrical MFI) in res
577 cDC1, 2 and migDC1, 2 and LC in CTRL (left) or GILZ^{ko} (right) LN, expressed as ratio to CTRL for
578 each population. Mean +/- SEM. n= 4 CTRL mice, n= 4 GILZ^{ko} mice from 1 experiment. Mann-
579 Whitney *p<0.05.

580

581

582



583

584 **SUPPLEMENTAL FIGURE 2 : Ca^{2+} influx analysis.** a) Detailed gating strategy for quantification
 585 of Ca^{2+} variation in Fluo4-AM-loaded BMDCs. i, untouched cells used as baseline; ii, addition of 0.4
 586 mM Ca^{2+} , internal control for spontaneous calcium entry in CTRL (black lines) and GILZ^{ko} (red lines)
 587 DCs. End of ii, addition of $1\mu\text{M}$ of Tg and calcium variation monitoring for 2 minutes. iii, addition of
 588 $1\mu\text{M}$ ionomycin to reach maximal Ca^{2+} entry into the cell. On the left is represented an experiment in
 589 which no Tg was added to establish the spontaneous Ca^{2+} entry in Tg untreated cells. b) Histograms
 590 representing the FITC Geo-MFI at several time points (left) or for the gatings i, ii and iii (right). c)
 591 Results from the individual fluorometric quantifications of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ in BMDC before and after

592 treatment with 1 μ M Tg. The pooled data are represented (fig 3C). Colors represent different
 593 experiments, “.1” and “.2” represent replicates in one experiment.

Chemicals, Peptides, and recombinant proteins		
Kit / molecules	supplier	cat number
Acetone	carlo ebra reagent	400971
CCL21	bio-techne	4576C/CF
Dibutyl phthalate (DBT)	sigma	524980
FITC	MERCK	F4274
fixation permeabilization buffer	Becton, Dickinson	51-2090KZ; 51-2091KZ
FLT3-L	bio-techne	427-FL-CF
fluo4	invitrogen	F14201
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	ebioscience	00-5223-56; 00-8333-56; 00-5123-43
GM-CSF	bio-techne	415-ML/CF
GSK650394	MERCK	3572
hoechst33342	invitrogen	H3570
mounting medium	thermofischer	TA030FA
Thapsigargin	sigma	T9033
transwell plate	COSTAR	3421
Experimental models		
Experimental Models	supplier / source	
Mouse: B6.Cg-Tg(Ilgax-cre) ¹⁻¹ Reiz/J	Caton et al. 2007	
Mouse: C57BL/6J	Janvier	
Mouse: CD11c-GILZko	Calmette et al. 2016	
Mouse: GILZ-floxed	Ngo et al. 2013	
softwares		
Kit / molecules	supplier / source	
adobe Illustrator 24.0.1	Adobe Inc.	
fiji	Schindelin et al. 2012	
FlowJo 10.6.1	Becton, Dickinson	
Prism8	GraphPad Software, LLC	
QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN IPA)	QIAGEN	
Heatmapper	Babicki et al. 2016	

594

Antibodies						
Target	Conjugate	clone	supplier	cat number	dilution	
CCR7	phycoerythrin (PE)	4B12	eBiosciences	12197183	1/100	
CCR7	PE	4B12	Becton, Dickinson	560682	1/100	
CD103	Alexa Fluor (AF) 700	M290	Becton, Dickinson	565529	1/100	
CD103	Allophycocyanin (APC)	2E7	eBiosciences	17103182	1/100	
CD11b	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	M170	Becton, Dickinson	553310	1/100	
CD11b	AF 700	M1-70	Becton, Dickinson	557960	1/100	
CD11c	APC	N418	eBiosciences	17011481	1/100	
CD11c	PE Cy7	N418	eBiosciences	25011482	1/100	
CD207	eFluor (eF) 660	RMUL.2	eBiosciences	50207382	1/100	
CD207	PE	EBIOL31	eBiosciences	12207582	1/100	
CD3	APC Cyanine (Cy) 7	1452C11	Becton, Dickinson	557596	1/100	
CD3	V500	500A2	Becton, Dickinson	560771	1/100	
CD317	Pacific Blue	EBIO927	eBiosciences	48317280	1/100	
CD62L	APC R700	MEL-14	Becton, Dickinson	565159	1/100	
CD64	PE Texas red	X54-5/731	Biolegend	139319	1/100	
CD80	APC	16-10A1	Becton, Dickinson	560016	1/100	
CD80	PE	16-10A1	Becton, Dickinson	553769	1/100	
CD86	Brilliant Violet (BV) 605	GL1	Becton, Dickinson	563055	1/100	
CD86	BV510	GL1	Becton, Dickinson	563077	1/100	
CD8a	APC-eF 780	53-6.7	eBiosciences	47008182	1/100	
CMH II	Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	M5/114.15.2	MACS	130103805	1/500	
CXCR4	APC	2B11	eBiosciences	17999182	1/100	
CXCR4	PE	2B11	eBiosciences	12999182	1/100	
F4/80	BV605	T45-2342	Becton, Dickinson	743281	1/100	
F4/80	APC	BM8	eBiosciences	17480182	1/100	
F4/80	PerCP Cy5.5	BM8	eBiosciences	45480180	1/100	
Fc Block	Unconjugated	2.4G2	Becton, Dickinson	553142	1/100	
GAM	AF488	Polyclonal	invitrogen	a11029	1/200	
GAM	AF594	Polyclonal	invitrogen	a11020	1/200	
GAR	AF488	Polyclonal	invitrogen	a11034	1/200	
GAR	AF594	Polyclonal	invitrogen	a11037	1/200	
GILZ	PE	CFMKG15	eBiosciences	12403382	1/250	
GILZ Isotype	PE	EBR2A	eBiosciences	12432142	1/250	
IgG2Ak Isotype	PE	R35-95	Becton, Dickinson	553930	1/100	
IgG2Bk Isotype	APC	A95-1	Becton, Dickinson	553991	1/100	
IgG2Bk Isotype	APC	EB149/10H5	eBiosciences	17403182	1/100	
ORAI1	Unconjugated	3F6H5	invitrogen	MA5-15776	1/50	
ORAI2	Unconjugated	Polyclonal	invitrogen	PA5-20375	1/50	
ORAI3	Unconjugated	Polyclonal	invitrogen	PA5-20369	1/50	
SGK1	Unconjugated	Polyclonal	ABCAM	ab59337	1/50	

III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La migration des DC est un processus central dans leur fonction. Celle-ci permet aux DC d'induire correctement les réponses LT effectrices ou régulatrices. La régulation fine de la migration *in vivo* met en jeu de nombreux mécanismes dont l'adhérence aux surfaces, la plasticité du cytosquelette d'actine, la chimiotaxie et la régulation des flux ioniques. L'étude de ces mécanismes permet de mieux appréhender la migration des DC à l'homéostasie et au cours de pathologies. Je vais ici discuter les trois axes de mon projet en les liant dans un schéma logique global. Je me suis appuyé durant ce projet sur plusieurs modèles murins. Les souris CD11c-GILZ^{ko} sont délétées pour GILZ dans les DC. C'est un modèle d'étude du rôle de l'expression endogène de GILZ dans les DC. Les souris *cxcr4*^{+ /1013} présentent un gain de fonction de CXCR4 en réponse à CXCL12. C'est un modèle d'étude général du rôle de la désensibilisation de ce ChR. Nous l'utilisons particulièrement ici pour définir son rôle sur la biologie des DC. Les souris K14-HPV expriment les gènes précoces « early » de HPV16 dans les kératinocytes. Ce modèle induit une dysplasie et une inflammation chronique de la peau. Les souris K14-HPV-*cxcr4*^{+ /1013} sont un croisement des deux derniers modèles murins, donnant accès au rôle de la désensibilisation de CXCR4 dans un modèle de pathogenèse due aux HPV.

La désensibilisation de CXCR4 et l'expression de GILZ contribuent au contrôle de la migration des DC.

Dans un premier temps, nous avons montré que les souris présentant un gain de fonction de CXCR4 ont un nombre réduit de DC migrantes dans les GL drainant la peau. Nous avons par la suite démontré que cette réduction de nombre de DC est, au moins en partie, due à une moindre migration des DC de la peau vers les GL dans des expériences de FITC painting. De plus, on retrouve aussi moins de DC migrantes dans les GL de souris K14-HPV-*cxcr4*^{+ /1013}, laissant penser que le gain de fonction de CXCR4 empêche également la migration des DC issues d'un environnement inflammatoire. Par ailleurs, nous avons montré que la délétion de GILZ retarde la migration des DC depuis

la peau jusqu'aux GL dans des expériences d'inflammation aiguë (FITC painting). Seulement, l'impact de GILZ sur la migration des DC est plus discret que celui du gain de fonction de CXCR4. En effet, seules les cDC2 GILZ^{ko} présentent une altération de leur migration aux GL à 24h, mais pas à 72h après application du FITC. Il est à noter qu'à l'homéostasie, les souris CD11c-GILZ^{ko} ne présentent pas d'altération du nombre de DC migrantes dans leur GL. GILZ aurait donc un impact sur la migration des DC au cours de l'inflammation uniquement.

Tentons maintenant de mieux comprendre les limites de ces observations. Concernant la diminution de migration dans le modèle *cxcr4*^{+ /1013}, si la migration des DC est effectivement réduite, l'effet intrinsèque du gain de fonction de CXCR4 sur la migration de ces DC reste à démontrer. Toutefois le gain de fonction de CXCR4 augmente la chimiotaxie des DC envers CXCL12. On peut alors imaginer que la production de CXCL12 dans la peau (Kabashima *et al.*, 2007) favorise une rétention des DC ce tissu. A ce titre, seules des expériences en souris chimères pourraient permettre de conclure formellement sur l'impact de l'environnement. Il serait intéressant de récupérer des précurseurs de cDC de souris *cxcr4*^{+ /1013}-CD45.2 (Freitas *et al.*, 2017) et de les injecter dans les souris CTRL. Nous pourrions alors voir si ces DC-CD45.2 migrent de manière similaire aux DC CTRL vers les GL. Nous pourrions aussi réaliser des souris chimères avec, en compétition, de la moelle osseuse de souris *cxcr4*^{+ /1013} et CTRL. Nous pourrions alors comparer directement la migration des DC *cxcr4*^{+ /1013} et CTRL *in vivo*. Concernant l'effet de GILZ sur la migration, GILZ régule des facteurs (MAPK/ERK) impliqués dans les voies de signalisations couplées au ChR CXCR4. Il est donc intéressant de voir que le gain de fonction de ce récepteur et la délétion de GILZ n'ont pas des effets similaires sur la migration. CXCR4 est un ChR signalant via les petites protéines Gαi et les βarrestines, il est alors possible que GILZ ne soit lié qu'à une partie de cette signalisation en contrôlant par exemple l'influx calcique ou la phosphorylation des MAPK ERK et p38. En outre, l'effet sélectif de la délétion de GILZ sur la migration des cDC2 *in vivo* est intéressant. Il laisse à penser que GILZ contrôlerait particulièrement

la migration de ces cellules. *In vitro*, les cDC1 et cDC2 GILZ^{ko} ont une chimiotaxie réduite envers CCL21. A ce titre, nous pouvons émettre deux remarques. Premièrement, *in vivo*, les cDC2 sont la population migrante majoritaire à 24h. Ceci peut mener à des effets de masse exacerbant les différences entre souris GILZ^{ko} et CTRL. *In vivo*, la migration dépend de nombreux processus, dont la vitesse de migration et la chimiotaxie. Or nous n'avons de résultat sur la vitesse de migration que pour les BMDC, cellules fonctionnellement proches des cDC2 (Helft *et al.*, 2015). Il est possible que la délétion de GILZ ne module pas la vitesse de migration des cDC1. Nous avons montré, dans l'article traitant des effets de la mutation gain de fonction de CXCR4, que les cDC2 de la peau expriment des niveaux de CXCR4 et CCR7 plus faibles que les cDC1. En revanche, dans l'étude sur la migration des DC GILZ^{ko}, nous ne montrons pas d'expression différentielle de GILZ dans les DC de la peau. Ainsi, il est possible que l'effet de GILZ sur la signalisation de CXCR4 et CCR7 soit aggravée dans les cDC2, exprimant plus faiblement ces récepteurs. On peut aussi faire l'hypothèse que GILZ régule spécifiquement la migration des cDC2 en interagissant avec des facteurs spécifiques de ces cellules et régulant leur migration, comme IRF4 dont GILZ régule l'expression dans les LT (Yosef *et al.*, 2013).

Les similitudes entre le gain de fonction de CXCR4 et la délétion de GILZ ne s'arrêtent pas à la migration des DC. En effet, le gain de fonction de CXCR4 aggrave l'inflammation des tissus dans le modèle K14-HPV-*cxcr4*^{+ /1013}. La délétion de GILZ aggrave l'inflammation des tissus dans les expériences d'hypersensibilité retardée. GILZ et la désensibilisation de CXCR4 auraient alors des effets anti-inflammatoires. Il serait à ce titre intéressant d'étudier extensivement l'expression de GILZ dans les DC immatures et matures traitées ou non avec CXCL12. L'activité anti-inflammatoire de l'expression de GILZ dans les DC est connue. L'environnement cutané des souris K14-HPV diminue l'expression du CMH II sur les DC, et le rôle de la désensibilisation de CXCR4 dans ce processus n'est pas connu.

On peut aussi se demander comment le gain de fonction de CXCR4 et la délétion de GILZ impacte les DC résidentes des OL. Nous avons vu que ni la délétion de GILZ ni le gain de fonction de CXCR4 n'altère leur capacité à s'activer en réponse à des agonistes de TLR. Les DC résidentes des OL peuvent migrer au sein des ganglions (Woodruff *et al.*, 2014) et elles ont des fonctions pouvant différer de celles des DC du sang et des DC migrantes (Segura *et al.*, 2012). Ces DC peuvent interagir directement avec les DC migrantes qui peuvent leur transférer des antigènes (Allan *et al.*, 2006). On peut donc se demander si l'effet observé du gain de fonction de CXCR4 et de la délétion de GILZ sur l'accroissement de l'inflammation cutanée est lié à l'impact qu'ils opèrent sur la migration. De surcroît, on peut se demander si, partant du principe que la précédente hypothèse est vraie, l'éventuel impact de la diminution de migration est direct sur la modulation des réponses T ou s'il passe par un intermédiaire que sont les DC résidentes des OL.

Fonctions nouvelles de GILZ dans les DC et leurs liens avec la migration

Nous venons donc de voir que GILZ et CXCR4 ont des fonctions communes. Nous avons poursuivi les études sur la migration des DC dans le modèle murin de délétion de la protéine GILZ dans les DC, les souris CD11c-GILZ^{ko}, développé au laboratoire (Calmette *et al.*, 2016). Dans une étude précédente, nous avons démontré le rôle de GILZ sur la régulation de la macropinocytose dans les DC. Les DC GILZ^{ko} ont une macropinocytose accrue *in vitro* et *in vivo*. L'impact de GILZ sur cette capacité de capture antigénique nous a orienté vers l'étude de la vitesse de migration de ces cellules. En effet, la vitesse de migration et la macropinocytose sont des processus en compétition dans les DC immatures. Cette compétition traduit l'alternance des capacités de capture d'antigène et de migration rapide des DC (Chabaud *et al.*, 2015). Nous avons montré que la délétion de GILZ dans les DC réduit leur vitesse de migration dans des expériences de migration confinée en micro-canaux. Nous avons pu corrélérer directement cette diminution de vitesse de migration à l'augmentation de la capture antigénique par macropinocytose dans ces cellules. La délétion de GILZ réduit la

migration des cDC2 *in vivo*. On peut penser que la délétion de GILZ favorise la macropinocytose au détriment de la mise en place de la migration dans ces cellules. Il est à noter que la régulation différentielle de la macropinocytose dans les sous-populations de DC de la peau reste non explorée. Cependant, les DC GILZ^{ko} et CTRL stoppent la macropinocytose après activation de façon similaire (Calmette *et al.*, 2016). Les expériences de FITC painting utilisent du dibutylphtalate, un activateur chimique des cellules. Dans ces expériences, les DC CTRL et GILZ^{ko} sont donc activées, et l'inhibition de la macropinocytose n'intervient pas plus tard dans les cellules GILZ^{ko} que dans les CTRL (Calmette *et al.*, 2016). Il est donc peu probable qu'un retard sur l'arrêt de macropinocytose puisse expliquer le retard de migration des cDC2. En revanche, les DC réalisant la macropinocytose semblent avoir une meilleure capacité de patrouille tissulaire que les cellules n'en réalisant pas (Moreau *et al.*, 2019). On peut alors se demander si les DC GILZ^{ko} n'ont pas une distribution tissulaire bouleversée par rapport aux DC CTRL. En outre, la macropinocytose pourrait permettre de migrer contre les gradients de pression. Mais une fois activées, et la macropinocytose inhibée, les DC pourraient se retrouver piégées par les pressions tissulaires. L'augmentation de macropinocytose pourrait alors avoir un effet indirect sur la migration des DC en augmentant les distances tissulaires à parcourir. Cependant, les DC GILZ^{ko} migrent moins rapidement que les DC CTRL dans les espaces confinés. Ce phénomène pourrait aider à normaliser leur distribution en limitant leur déplacement.

GILZ est une protéine capable d'interagir avec de nombreux facteurs modulant la chimiotaxie des DC tels que les MAPK ERK et p38, ou encore la protéine NFκB, centrale dans l'activation des DC. Nous nous sommes donc proposés d'étudier l'effet de GILZ sur la chimiotaxie des DC. Nous avons pu mettre en évidence que la chimiotaxie des DC GILZ^{ko} est réduite envers CXCL12 (DC non activées) et CCL21 (DC activées). Finalement, nous avons mis en évidence que les DC GILZ^{ko} ont une concentration de calcium cytosolique diminuée au repos, mais aussi une entrée de calcium réduite après induction du stress réticulaire. Ces résultats restent à être démontrés *in vivo*, et les

mécanismes sous-jacents investigués dans des modèles de DC manipulables (MutuDC par exemple (Pigni, Ashok and Acha-Orbea, 2016; Pigni *et al.*, 2018)), cependant ils pourraient expliquer, au moins en partie, le retard de migration observé *in vivo*. Fonctionnellement, cette différence d'entrée calcique pourrait être mise en lien avec la chimiotaxie diminuée des DC envers CCL21 et CXCL12. On aurait alors un retard de migration lié à une moindre sensibilité des DC aux chimiokines responsables de leur migration vers les GL.

Finalement, on ne peut pas réellement conclure sur le fait que les DC GILZ^{ko} ont un défaut transitoire de migration induit par l'inflammation, ou si elles ont un défaut constitutif en permanence rattrapé, expliquant les nombres similaires de DC dans les GL des souris GILZ^{ko} et CTRL à l'homéostasie. Les DC GILZ^{ko} auraient alors toujours un retard d'arrivée aux GL. Pour vérifier cela, il faudrait pouvoir induire de manière non inflammatoire l'expression de la GFP dans les DC de la peau et suivre leur migration aux GL. Si nous démontrions un retard de migration dans ces conditions, nous pourrions conclure à un retard de migration constitutif. Nous pourrions pour cela utiliser des modèles murins exprimant des protéines photo-convertibles telles que les protéines kaede (Tomura and Kabashima, 2008).

GILZ et CXCR4 sont régulés par les glucocorticoïdes

GILZ tout comme CXCR4 sont des protéines dont l'expression est augmentée par les glucocorticoïdes (GC), molécules anti-inflammatoires (Caulfield *et al.*, 2002). De plus, le traitement de monocytes par les GC favorise leur chimiotaxie envers le FMLP, mais réduit leur adhérence aux surfaces (Ehrchen *et al.*, 2007). Si l'on peut faire l'hypothèse que la délétion de GILZ dans ces cellules inhibe l'effet des GC sur la chimiotaxie, le gain de fonction de CXCR4 serait-il redondant ou complémentaire de cette délétion ? Il faudrait tester l'effet des GC sur la chimiotaxie des DC envers CXCL12 dans un contexte de gain de fonction de CXCR4. L'effet des GC sur CXCR4 et l'adhérence des cellules est intéressant car, avec CCL21, CXCL12 est une chimiokine largement retrouvée en association avec la matrice extracellulaire. Il serait utile de savoir si les GC favorisent la

chimiotaxie des DC envers les gradients de chimiokines libres plutôt que les gradients de chimiokines fixées. En outre les DC ayant été traitées aux GC ont un phénotype anti-inflammatoire. Les GC, en favorisant la migration de DC anti inflammatoires pourraient ainsi réguler, via la migration, la tolérance immunitaire. Cependant il est à garder à l'esprit que la régulation de la chimiotaxie médié par les GC est dépendante de l'environnement (Ehrchen, Roth and Barczyk-Kahlert, 2019).

GILZ et la désensibilisation de CXCR4 limitent l'activation des DC

Après avoir vu que GILZ et CXCR4 ont des fonctions et des régulations communes sur la migration des DC, voyons leur impact sur l'activation des DC. GILZ est un facteur connu de la tolérance dans les DC (Hamdi *et al.*, 2007; Cathelin, Met and Svane, 2013; Calmette *et al.*, 2014; Karaki *et al.*, 2014). En effet, sa surexpression limite l'action de NFkB tout en diminuant l'expression de CMHII. De manière générale, le phénotype CMHII^{faible} des DC est associé avec des fonctions tolérogènes. Celles-ci associent une accumulation de Treg et une faible activation des réponses T effectrices. Nous montrons ici que le gain de fonction de CXCR4 promeut un phénotype inflammatoire sur les DC migrantes, une explication possible étant la sélection des DC les plus activées pour quitter le derme. Ceci suggère une action de limitation de l'inflammation pour la désensibilisation de ce ChR. Pour être plus précis, les DC *Cxcr4*^{+ /1013} migrantes des GL surexpriment CD86 par rapport à leur homologues CTRL. En revanche, les DC résidentes de la peau et les GL *Cxcr4*^{+ /1013} et CTRL ont une activation similaire. De même, les cultures de DC *in vitro* montrent une activation similaire des DC *Cxcr4*^{+ /1013} et CTRL en réponses au LPS et au ssRNA en présence ou non de CXCL12. Ainsi, si cette suractivation est liée à une synergie avec la signalisation de CXCR4, les facteurs impliqués restent inconnus. On peut cependant exclure le GM-CSF et le FLT3-L, tous deux présents dans les cultures *in vitro*. Il est aussi possible aussi que la nature du CXCL12 utilisé en culture ne soit pas similaire à celle du CXCL12 (Clivé ou non, dimères ou non...) retrouvé *in vivo*. Nous pourrions là encore utiliser des souris chimères, qui

permettraient de démontrer le rôle intrinsèque du gain de fonction de CXCR4 sur l'activation des DC.

Nous pensons donc que ces DC migrantes dans les GL ne se « suractivent » pas, mais qu'elles sont les plus activées du derme. Nous montrons aussi que, dans le contexte HPV, dans les GL, les DC *Cxcr4^{+ / 1013}* sur-expriment le CCR7 par rapport aux DC CTRL. Ainsi seul un petit groupe de DC très activées pourrait quitter le derme dans les souris *Cxcr4^{+ / 1013}* grâce à l'expression forte du ChR CCR7 leur permettant de dépasser la rétention induite par CXCL12. Ceci pourrait expliquer de fait le nombre réduit de DC migrante et leur état d'activation supérieur aux DC CTRL dans les GL. Il n'y aurait pas d'effet direct du gain de fonction de CXCR4 sur l'activation des DC. Il serait intéressant de continuer ces études dans un modèle Life-act GFP (souris exprimant la GFP en association de l'actine dans les DC). Ces modèles serviraient à réaliser des imageries *in vivo* en microscopie biphotonique sur des tissus vivants. Cela pourrait permettre de voir si les DC *Cxcr4^{+ / 1013}* sont capables ou non de s'extraire de leur interaction avec la membrane des cellules endothéliales lymphatiques. Finalement, des études de leur migration *in vitro* en présence de CXCL12 dimère, ou non, dont la queue C-ter est clivée ou non et en présence, ou non de structures facilitant l'adhérence des cellules pourrait permettre de mieux définir le rôle du gain de fonction de CXCR4 sur la chimio / haptotaxie des DC.

La désensibilisation de CXCR4 favorise l'apparition d'un phénotype tolérogène des DC

Nous avons continué les observations sur l'activation des DC dans un modèle murin d'inflammation chronique de la peau, les souris K14-HPV-*Cxcr4^{+ / 1013}*. Dans ce modèle nous reproduisons la diminution de l'expression du CMHII médiée par l'environnement dysplasique de la peau des souris K14-HPV, dans les DC de la peau et des ganglions (Mittal *et al.*, 2013; Chandra *et al.*, 2016). Cependant le gain de fonction de CXCR4 annule l'effet de HPV sur le phénotype des DC des GL, mais pas de la peau. Ainsi, là encore, ce serait les DC les plus activées, et donc exprimant le plus de CMHII, qui

seraient les plus aptes à se libérer de la rétention induite par CXCL12 qui migreraient aux GL. Cela laisse penser que la désensibilisation de CXCR4 joue un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire dans les tissus. L'inflammation importante médiée par le gain de fonction de CXCR4 dans les tissus pourrait avoir un effet distant sur la capacité des DC à se différencier en DC tolérogènes. Ainsi, le gain de fonction de CXCR4 diminue la migration des DC faiblement activées aux GL et favorise l'inflammation de la peau dans un contexte d'inflammation chronique. L'effet de la dysfonction de CXCR4 nous aide à mieux comprendre le rôle de la signalisation de CXCR4 dans la biologie des DC.

Effets du gain de fonction de CXCR4 sur l'induction de la susceptibilité accrue à HPV.

De ces résultats émergent une question importante. Comment combiner le fait que les DC porteuses du gain de fonction de CXCR4 soient plus inflammatoires avec le fait que cette mutation seule, dans les cellules myéloïdes, semble suffisante pour maintenir la pathogenèse cutanée accrue liée à l'infection par les virus HPV chez les patients WHIM ? Chez l'Homme, un cas clinique de guérison des verrues cutanée chez un patient WHIM, lié à la perte accidentelle de l'allèle *CXCR4* muté dans un progéniteur myéloïde a été rapporté (McDermott *et al.*, 2015). Ainsi, on peut faire l'hypothèse que le gain de fonction de CXCR4, même s'il favorise un phénotype pro-inflammatoire des DC dans les GL, inhibe en partie leur fonction d'induction des réponses lymphocytaires T en limitant leur nombre dans les GL. La perte du gain de fonction de CXCR4 dans les cellules myéloïdes, et donc les DC, mais pas l'environnement cutané, suffit à corriger les verrues induites par l'infection HPV. En outre un deuxième élément central est à prendre en compte. Dans nos études nous montrons que le gain de fonction de CXCR4 inhibe fortement la sortie des pDC de la moelle osseuse. Cependant ce gain de fonction ne module pas leur différenciation ni celle des précurseurs de cDC. En outre, le gain de fonction de CXCR4 n'impacte pas la capacité des pDC à s'activer en réponse à une injection intrapéritonéale de CpG, ligand du TLR9, ni leur capacité à produire des IFN

I et à activer les cellules NK. Ainsi, tout porte à penser que le gain de fonction de CXCR4 limite la réponse immunitaire en limitant le nombre de DC en circulation et dans les GL. Cette limitation du nombre de DC pourrait avoir comme conséquence de diminuer les ratios DC/T, limitant les réponses T spécifiques. En outre, il pourrait induire un appauvrissement des antigènes amenés aux GL et donc, une limitation de l'activation de LT spécifiques.

GILZ régule l'entrée de calcium dans les DC

L'un des mécanismes, impacté par la délétion de GILZ, les plus intéressants à étudier pour comprendre la modulation de migration des DC est la diminution de l'entrée calcique dans ces cellules. Nous montrons que les flux calciques sont largement réduits dans les DC GILZ^{ko}. L'entrée et l'homéostasie calcique sont diminuées, la sortie de calcium n'est pas augmentée. Les défauts d'entrée sont corrélés à une diminution de l'expression des canaux ORAI. C'est une piste convaincante quant à l'origine du défaut d'entrée calcique. Cependant, si le défaut d'expression et de distribution cellulaire d'ORAI1 coïncident avec une réduction d'entrée de Ca²⁺, les défauts d'expression d'ORAI2 sont contradictoires. En effet ORAI2 est connu, en particulier dans les macrophages et les LT, pour induire une entrée de calcium plus faible que celle médiée par ORAI1, limitant ainsi le SOCE. On considère ainsi que ORAI2, en s'associant à ORAI1 limite l'entrée de Ca²⁺ et contrôle son homéostasie. Il est envisageable que la perte de fonctionnalité d'ORAI1, ou la diminution chronique du Ca²⁺ cytosolique ait pour effet d'induire une boucle de rétroaction positive sur l'entrée calcique en limitant l'expression d'ORAI2. Ceci aurait pour effet de maximiser la fonction d'ORAI1 à la membrane plasmique. On peut par exemple imaginer que cette boucle passe par l'action de NFAT, diminué dans les DC GILZ^{ko} et qui aurait alors un effet positif sur l'expression d'ORAI2. Un autre facteur possible serait SGK1 dont la stabilisation par GILZ pourrait favoriser l'expression d'ORAI2. L'expression d'ORAI1 est, elle, démontrée comme dépendante de la fonction de SGK1. Ici, pour conclure, la diminution de l'expression d'ORAI1 pourrait être liée à une moindre fonctionnalité de SGK1, et celle

d'ORAI2, à la diminution d'un mécanisme de rétroaction positive sur l'entrée de Ca^{2+} qui limiterait les inhibiteurs de la fonction d'ORAI1.

Concernant la différence de localisation d'ORAI1, comme nous le présentons dans l'introduction, GILZ et SGK1 sont connus pour favoriser la stabilisation membranaire des canaux ENaC dans les cellules du rein. SGK1, stabilisé par GILZ, agit en phosphorylant NEDD4-L, une E3 ubiquitine ligase ayant ORAI1 pour cible. Il est donc possible que ce que nous observons dans les DC GILZ^{ko} soit un adressage augmenté, par rapport aux DC CTRL, vers les endolysosomes, et non une rétention d'ORAI1 dans les domaines sous membranaires où il se trouve adressé à l'homéostasie. Cela pourrait aussi expliquer la diminution protéique d'ORAI1 dans les expériences de cytométrie en flux. On pourrait aussi faire l'hypothèse qu'ORAI2 est lui aussi régulé par SGK1 et NEDD4-L, et que la perte de fonction de SGK1 induise sa déstabilisation. Ainsi, dans les DC, la stabilité membranaire d'ORAI1 et 2, mais pas celle d'ORAI3, serait médiée par le couple GILZ/SGK1 favorisant l'inhibition de NEDD4-L. La dilution d'ORAI1 dans le cytosol des DC GILZ^{ko} ou CTRL traitées à l'inhibiteur de SGK1 correspondrait alors à un adressage d'ORAI1 aux endolysosomes.

Il est aussi intéressant de remarquer que les expressions sous membranaire et membranaire d'ORAI1 ne semblent pas régulées par les mêmes mécanismes. En effet, les DC CTRL et GILZ^{ko}, mais surtout les DC GILZ^{ko} traitées avec l'inhibiteur de SGK1 conservent tout de même une expression membranaire de ORAI1. Il est donc possible qu'un stock d'ORAI1 soit en permanence exprimé à la membrane selon un mécanisme indépendant de GILZ ou de SGK1. Il est envisageable que les DC conservent toujours une expression membranaire d'ORAI1 et 3, leur permettant de mettre en place les courants non capacitifs médiés par ces protéines.

Finalement, on peut se demander s'il existe un ou plusieurs mécanismes de régulation de la localisation d'ORAI1. En effet, la délétion de GILZ mime l'inhibition fonctionnelle de SGK1 sur la localisation d'ORAI1, mais on ne peut ici pas conclure à l'existence d'un mécanisme unique ou celle de deux mécanismes nécessaires pour l'adressage/stabilité

d'ORAI1 à la membrane. En termes de mécanismes, on peut par exemple penser que GILZ agirait sur les ORAI d'une manière similaire que sur les canaux ENaC. GILZ inhiberait l'activité de ERK en interagissant physiquement avec cette protéine. ERK a pour fonction de phosphoryler les canaux ENaC les rendant ainsi détectables par NEDD4-L. En parallèle GILZ agirait en synergie avec SGK1 aboutissant à une co-répression de NEDD4-L. Finalement, GILZ inhiberait la phosphorylation de SPAK et la fonction de WNK4 et Raf-1. WNK4 est un inhibiteur de WNK1, retrouvé fortement exprimé dans les DC GILZ^{ko} dans nos expériences de transcriptomique. Une analyse plus poussée sur l'interactome des ORAI1-2 et 3 pourrait permettre de mettre une évidence l'indépendance relative d'ORAI3 à ces mécanismes.

La modulation de l'entrée calcique est-elle causale de la modulation de la vitesse de migration ? de celle de la chimiotaxie ?

On peut alors se demander si c'est par son effet sur l'homéostasie calcique ou celui sur l'activation des MAPK et de la macropinocytose que GILZ régule la chimiotaxie et la mobilité des DC. Si l'on peut corrélérer de manière directe le rôle de l'augmentation de la macropinocytose sur la limitation de la vitesse de migration dans les DC immatures, son rôle sur la migration des DC matures est nul. Ainsi, la diminution de l'entrée de Ca²⁺ est le seul mécanisme, dans nos études, pouvant limiter la chimiotaxie et la migration de ces cellules. Cependant, le rôle exact des flux calciques sur la migration est encore confus dans la littérature, même si un consensus semble se créer quant à l'importance de cet ion sur la fonction des DC. On peut se demander quel est le rôle exact du SOCE sur la modulation de migration dans les DC. Toujours est-il que ce processus semble jouer un rôle important sur la migration des DC et la délétion de STIM1 provoque un retard de migration très similaire à celui retrouvé après délétion de GILZ (Nunes-Hasler *et al.*, 2017). De plus, si l'on démontre une diminution de l'expression et une modification de la distribution d'ORAI1, le rôle causal de cette diminution sur l'entrée calcique reste à démontrer formellement. Nous montrons en outre une modification de l'homéostasie calcique des DC, qui ne corrèle pas

exactement avec une modification du SOCE seul. Nous pouvons donc conclure que le SOCE est fortement diminué dans les DC GILZ^{ko}, mais que ce processus n'est certainement pas le seul impacté et que sa place dans la régulation directe de la migration reste à démontrer. De plus, ici, l'étude de la fonction de la PLC β 4 semble centrale. Cette protéine pourrait faire un lien direct entre GILZ et la régulation de la macropinocytose et du SOCE. Cette protéine est d'autant plus intéressante au regard du fait que l'expression de la PLC β 2 est démontrée comme étant augmentée par un autre canal inhibiteur du SOCE, TRPM4, dans les DC (Barbet *et al.*, 2008). Cette régulation, positive cette fois, n'est pas sans rappeler celle de la PLC β 4 et d'ORAI2. Il serait intéressant de réaliser des études de chimiotaxie sur des DC traitées ou non par un inhibiteur de PLC β . Il serait bon de voir si l'inhibition des PLC β normalise la macropinocytose et augmente la vitesse de migration des DC GILZ^{ko} immatures par exemple.

Conclusion

L'ensemble de nos données semble dessiner un rôle particulier des GC sur la capacité des DC différenciées à s'extraire des tissus. C'est un rôle particulièrement intéressant au regard de la régulation circadienne, tonique des GC. Ainsi, nous proposons de nouvelles pistes de régulation, possiblement circadienne, de la réponse immunitaire des DC par les GC via la modulation de leur motilité, leur chimiotaxie, leur homéostasie calcique et in fine leur migration. L'utilisation de portoirs à dont on contrôle les rythmes d'éclairage pourraient permettre de mettre en évidence des modulation circadiennes de la migration homéostatiques des DC chez la souris. Nous pourrions alors voir les phénotypes associés notamment ceux liés à la tolérance immunitaire. Nous pourrions associer à ces expériences des groupes de souris traitées à la mifepristone, inhibiteur des récepteurs aux GC et des dosage de GC circulant. En outre, la production des GC est finement régulée, et est fortement augmentée dans certaines pathologies tels que les cancers (Yang *et al.*, 2019), mais aussi le stress. Ces résultats proposent de nouvelles pistes d'étude de la réponse immunitaire dans ces pathologies.

IV. REFERENCES

- [*] Abbas; Vu Manh; Valente; Collinet; Attaf; Dong; Naciri; Chelbi; Brelurut; Cervera-Marzal; Rauwel; Davignon; Bessou; Thomas-Chollier; Thieffry; Villani; Milpied; Dalod and Tomasello (2020) 'The activation trajectory of plasmacytoid dendritic cells in vivo during a viral infection', *Nature Immunology*, 21(9), p. 983–997. doi: 10.1038/s41590-020-0731-4.
- [*] Achim and Arendt (2014) 'Structural evolution of cell types by step-wise assembly of cellular modules', *Current Opinion in Genetics and Development*. Elsevier Ltd, 27, p. 102–108. doi: 10.1016/j.gde.2014.05.001.
- [*] Ainsua-Enrich; Hatipoglu; Kadel; Turner; Paul; Singh; Bagavant and Kovats (2019) 'IRF4-dependent dendritic cells regulate CD8+ T-cell differentiation and memory responses in influenza infection', *Mucosal Immunology*. Springer US, 12(4), p. 1025–1037. doi: 10.1038/s41385-019-0173-1.
- [*] Alansary; Kilch; Holzmann; Peinelt; Hoth and Lis (2014) 'Patch-clamp measurement of ICRAC and ORAI channel activity', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(6), p. 602–607. doi: 10.1101/pdb.top066795.
- [*] Alapi; Erdos; Kovács and Maródi (2007) 'Recurrent CXCR4 sequence variation in a girl with WHIM syndrome', *European Journal of Haematology*, 78(1), p. 86–88. doi: 10.1111/j.1600-0609.2006.00779.x.
- [*] Alcántara-Hernández; Leylek; Wagar; Engleman; Keler; Marinkovich; Davis; Nolan and Idoyaga (2017) 'High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization', *Immunity*, 47(6), p. 1037–1050.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.001.
- [*] Alculumbre; Saint-André; Di Domizio; Vargas; Sirven; Bost; Maurin; Maiuri; Wery; Roman; Savey; Touzot; Terrier; Saadoun; Conrad; Gilliet; Morillon and Soumelis (2018) 'Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus article', *Nature Immunology*, 19(1), p. 63–75. doi: 10.1038/s41590-017-0012-z.
- [*] Aliberti; Schulz; Pennington; Tsujimura; Reis e Sousa; Ozato and Sher (2003) 'Essential role for ICMBP in the in vivo development of murine CD8 α + dendritic cells', *Blood*, 101(1), p. 305–310. doi: 10.1182/blood-2002-04-1088.
- [*] Allan; Waithman; Bedoui; Jones; Villadangos; Zhan; Lew; Shortman; Heath and Carbone (2006) 'Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming', *Immunity*, 25(1), p. 153–162. doi: 10.1016/j.immuni.2006.04.017.
- [*] Allen; Zicha; Ridley and Jones (1998) 'A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis', *Journal of Cell Biology*, 141(5), p. 1147–1157. doi: 10.1083/jcb.141.5.1147.
- [*] Amon; Lehmann; Heger; Heidkamp and Dudziak (2020) 'The ontogenetic path of human dendritic cells', *Molecular Immunology*. Elsevier, 120(December 2019), p. 122–129. doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.010.
- [*] André; Corazao-Rozas; Idziorek; Quesnel; Kluza and Marchetti (2016) 'GILZ overexpression attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated cell death via the activation of mitochondrial oxidative phosphorylation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 478(2), p. 513–520. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.053.
- [*] André; Trinh; Balayssac; Maboudou; Dekiok; Malet-Martino; Quesnel; Idziorek; Kluza and Marchetti (2017) 'Metabolic rewiring in cancer cells overexpressing the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ): Activation of mitochondrial oxidative phosphorylation and sensitization to oxidative cell death induced by mitochondrial targeted drugs',

International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Elsevier Ltd, 85, p. 166–174. doi: 10.1016/j.biocel.2017.02.011.

[*] Arbeit; Munger; Howley and Hanahan (1994) 'Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice.', *Journal of Virology*, 68(7), p. 4358–4368.

[*] Arendt (2008) 'The evolution of cell types in animals: Emerging principles from molecular studies', *Nature Reviews Genetics*, 9(11), p. 868–882. doi: 10.1038/nrg2416.

[*] Arendt; Musser; Baker; Bergman; Cepko; Erwin; Pavlicev; Schlosser; Widder; Laubichler and Wagner (2016) 'The origin and evolution of cell types', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 17(12), p. 744–757. doi: 10.1038/nrg.2016.127.

[*] Arnold; Zhang; Artola-Boran; Fallegger; Sander; Johansen and Müller (2019) 'BATF3-dependent dendritic cells drive both effector and regulatory T-cell responses in bacterially infected tissues', *PLoS Pathogens*, 15(6), p. 1–23. doi: 10.1371/journal.ppat.1007866.

[*] Arrowsmith; Audia; Austin; Baell; Bennett; Blagg; Bountra; Brennan; Brown; Bunnage; Buser-Doepner; Campbell; Carter; Cohen; Copeland; Cravatt; Dahlin; Dhanak; Edwards; Frye; Gray; Grimshaw; Hepworth; Howe; Huber; Jin; Knapp; Kotz; Kruger; Lowe; Mader; Marsden; Mueller-Fahnow; Müller; O'Hagan; Overington; Owen; Rosenberg; Roth; Ross; Schapira; Schreiber; Shoichet; Sundström; Superti-Furga; Taunton; Toledo-Sherman; Walpole; Walters; Willson; Workman; Young and Zuercher (2015) 'The promise and peril of chemical probes', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 11(8), p. 536–541. doi: 10.1038/nchembio.1867.

[*] Arroyo; Lagnaz; Ronzaud; Vázquez; Ko; Moddes; Ruffieux-Daidié; Hausel; Koesters; Yang; Stokes; Hoover; Gamba and Staub (2011) 'Nedd4-2 modulates renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter via the aldosterone-SGK1-Nedd4-2 pathway', *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(9), p. 1707–1719. doi: 10.1681/ASN.2011020132.

[*] Arteaga; Wang; Ravid; Hochstrasser and Canessa (2006) 'An amphipathic helix targets serum and glucocorticoid-induced kinase 1 to the endoplasmic reticulum-associated ubiquitin-conjugation machinery', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), p. 11178–11183. doi: 10.1073/pnas.0604816103.

[*] Asselin-Labat; Biola-Vidamment; Kerbrat; Lombès; Bertoglio and Pallardy (2005) 'FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression', *Molecular Endocrinology*, 19(7), p. 1752–1764. doi: 10.1210/me.2004-0206.

[*] Asselin-Labat; David; Biola-Vidamment; Lecoëuche; Zennaro; Bertoglio and Pallardy (2004) 'GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis', *Blood*, 104(1), p. 215–223. doi: 10.1182/blood-2003-12-4295.Supported.

[*] Ayroldi; Migliorati; Bruscoli; Marchetti; Zollo; Cannarile; D'Adamio and Riccardi (2001) 'Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor κ B', *Blood*, 98(3), p. 743–753. doi: 10.1182/blood.V98.3.743.

[*] Ayroldi; Zollo; Bastianelli; Marchetti; Agostini; Di Virgilio and Riccardi (2007) 'GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling', *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), p. 1605–1615. doi: 10.1172/JCI30724.

[*] Ayroldi; Zollo; Macchiarulo; Di Marco; Marchetti and Riccardi (2002) 'Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Inhibits the Raf-Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Binding to Raf-1', *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), p. 7929–7941. doi: 10.1128/mcb.22.22.7929-7941.2002.

- [*] Bachelier; Ben-Baruch; Burkhardt; Combadiere; Farber; Graham; Horuk; Sparre-Ulrich; Locati; Luster; Mantovani; Matsushima; Murphy; Nibbs; Nomiyama; Power; Proudfoot; Rosenkilde; Rot; Sozzani; Thelen; Yoshie and Zlotnik (2014) 'International union of pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors', *Pharmacological Reviews*, 66(1), p. 1–79. doi: 10.1124/pr.113.007724.
- [*] Bachem; Güttler; Hartung; Ebstein; Schaefer; Tannert; Salama; Movassaghi; Opitz; Mages; Henn; Kloetzel; Gurka and Kroczeck (2010) 'Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells', *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), p. 1273–1281. doi: 10.1084/jem.20100348.
- [*] Baek; Lee; Roh and Jung (2018) 'Oral tolerance modulates the skin transcriptome in mice with induced atopic dermatitis', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73(4), p. 962–966. doi: 10.1111/all.13367.
- [*] Bagadia; Huang; Liu; Durai; Grajales-Reyes; Nitschké; Modrusan; Granja; Satpathy; Briseño; Gargaro; Iwata; Kim; Chang; Shaw; Murphy and Murphy (2019) 'An Nfil3–Zeb2–Id2 pathway imposes Irf8 enhancer switching during cDC1 development', *Nature Immunology*, 20(9), p. 1174–1185. doi: 10.1038/s41590-019-0449-3.
- [*] Bajaña; Roach; Turner; Paul and Kovats (2012) 'IRF4 Promotes Cutaneous Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes during Homeostasis and Inflammation', *The Journal of Immunology*, 189(7), p. 3368–3377. doi: 10.4049/jimmunol.1102613.
- [*] Balabanian; Lagane; Pablos; Laurent; Planchenault; Verola; Lebbe; Kerob; Dupuy; Hermine; Nicolas; Latger-Cannard; Bensoussan; Bordigoni; Baleux; Le Deist; Virelizier; Arenzana-Seisdedos and Bachelier (2005) 'WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12', *Blood*, 105(6), p. 2449–2457. doi: 10.1182/blood-2004-06-2289.
- [*] Balan; Arnold-Schrauf; Abbas; Couespel; Savoret; Imperatore; Villani; Vu Manh; Bhardwaj and Dalod (2018) 'Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity', *Cell Reports*, 24(7), p. 1902–1915.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.033.
- [*] Bandyopadhyay; Pingle and Ahern (2011) 'Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1', *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), p. 57–62. doi: 10.1189/jlb.0610381.
- [*] Baratin; Foray; Demaria; Habbeddine; Pollet; Maurizio; Verthuy; Davanture; Azukizawa; Flores-Langarica; Dalod and Lawrence (2015) 'Homeostatic NF-κB Signaling in Steady-State Migratory Dendritic Cells Regulates Immune Homeostasis and Tolerance', *Immunity*. Elsevier Inc., 42(4), p. 627–639. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.003.
- [*] Barbet; Demion; Moura; Serafini; Léger; Vrtovsni; Monteiro; Guinamard; Kinet and Launay (2008) 'The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells', *Nature Immunology*, 9(10), p. 1148–1156. doi: 10.1038/ni.1648.
- [*] Barger; Gauthier and Krendel (2020) 'Squeezing in a Meal: Myosin Functions in Phagocytosis', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Inc., 30(2), p. 157–167. doi: 10.1016/j.tcb.2019.11.002.
- [*] Bear and Haugh (2014) 'Directed migration of mesenchymal cells: Where signaling and the cytoskeleton meet', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 30(1), p. 74–82. doi: 10.1016/j.ceb.2014.06.005.

- [*] Beaulieu; Ngo; Santos; Yang; Smith; Jorgensen; Escriou; Scherman; Courties; Apparailly and Morand (2010) 'Glucocorticoid-induced leucine zipper is an endogenous antiinflammatory mediator in arthritis', *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), p. 2651–2661. doi: 10.1002/art.27566.
- [*] Bedoui; Whitney; Waithman; Eidsmo; Wakim; Caminschi; Allan; Wojtasiak; Shortman; Carbone; Brooks and Heath (2009) 'Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells', *Nature Immunology*, 10(5), p. 488–495. doi: 10.1038/ni.1724.
- [*] Benkhoucha; Molnarfi; Dunand-Sauthier; Merkler; Schneider; Bruscoli; Riccardi; Tabata; Funakoshi; Nakamura; Reith; Santiago-Raber and Lalive (2014) 'Hepatocyte Growth Factor Limits Autoimmune Neuroinflammation via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Expression in Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 193(6), p. 2743–2752. doi: 10.4049/jimmunol.1302338.
- [*] Berrebi; Bruscoli; Cohen; Foussat; Migliorati; Bouchet-Delbos; Maillot; Portier; Couderc; Galanaud; Peuchmaur; Riccardi and Emilie (2003) 'Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: An anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10', *Blood*, 101(2), p. 729–738. doi: 10.1182/blood-2002-02-0538.
- [*] Berridge (2016) 'The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease', *Physiological Reviews*, 96(4), p. 1261–1296. doi: 10.1152/physrev.00006.2016.
- [*] Bhandage; Kanatani and Barragan (2019) 'Toxoplasma-Induced Hypermigration of Primary Cortical Microglia Implicates GABAergic Signaling', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(MAR), p. 1–12. doi: 10.3389/fcimb.2019.00073.
- [*] Bhandaru; Yang; Rotte; Pasham and Lang (2012) 'Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger in dendritic cells by Akt2', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 463(2), p. 355–363. doi: 10.1007/s00424-011-1015-5.
- [*] Bhardwaj; Hediger and Demaurex (2016) 'Redox modulation of STIM-Orai signaling', *Cell Calcium*. Elsevier Ltd, 60(2), p. 142–152. doi: 10.1016/j.ceca.2016.03.006.
- [*] Binnewies; Mujal; Pollack; Combes; Hardison; Barry; Tsui; Ruhland; Kersten; Abushawish; Spasic; Giurintano; Chan; Daud; Ha; Ye; Roberts and Krummel (2019) 'Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4⁺ T Cell Immunity', *Cell*. Elsevier Inc., 177(3), p. 556–571.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.005.
- [*] Birnberg; Bar-On; Sapoznikov; Caton; Cervantes-Barragán; Makia; Krauthgamer; Brenner; Ludewig; Brockschneider; Riethmacher; Reizis and Jung (2008) 'Lack of Conventional Dendritic Cells Is Compatible with Normal Development and T Cell Homeostasis, but Causes Myeloid Proliferative Syndrome', *Immunity*, 29(6), p. 986–997. doi: 10.1016/j.immuni.2008.10.012.
- [*] Bobr; Igyarto; Haley; Li; Flavell and Kaplan (2012) 'Autocrine/paracrine TGF- β 1 inhibits Langerhans cell migration', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), p. 10492–10497. doi: 10.1073/pnas.1119178109.
- [*] Bogunovic; Ginhoux; Helft; Shang; Hashimoto; Greter; Liu; Jakubzick; Ingersoll; Leboeuf; Stanley; Nussenzweig; Lira; Randolph and Merad (2009) 'Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network', *Immunity*. Elsevier Ltd, 31(3), p. 513–525. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.010.
- [*] Bohdanowicz; Schlam; Hermansson; Rizzuti; Fairn; Ueyama; Somerharju; Du and Grinstein (2013) 'Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes', *Molecular Biology of the Cell*, 24(11), p. 1700–1712. doi: 10.1091/mbc.E12-11-0789.

[*] Bosteels; Neyt; Vanheerswynghels; van Helden; Sichien; Debeuf; De Prijck; Bosteels; Vandamme; Martens; Saeys; Louagie; Lesage; Williams; Tang; Mayer; Ronchese; Scott; Hammad; Guilliams and Lambrecht (2020) 'Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection', *Immunity*. Elsevier Inc., p. 1–18. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.005.

[*] Bosteels and Scott (2020) 'Transcriptional regulation of DC fate specification', *Molecular Immunology*, 121(October 2019), p. 38–46. doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.021.

[*] Bourdely; Anselmi; Vaivode; Ramos; Missolo-Koussou; Hidalgo; Tosselo; Nuñez; Richer; Vincent-Salomon; Saxena; Wood; Lladser; Piaggio; Helft and Guermontprez (2020) 'Transcriptional and Functional Analysis of CD1c+ Human Dendritic Cells Identifies a CD163+ Subset Priming CD8+CD103+ T Cells', *Immunity*, 53(2), p. 335–352.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.06.002.

[*] Bravo; Vicencio; Parra; Troncoso; Munoz; Bui; Quiroga; Rodriguez; Verdejo; Ferreira; Iglewski; Chiong; Simmen; Zorzano; Hill; Rothermel; Szabadkai and Lavandero (2011) 'Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress', *Journal of Cell Science*, 124(14), p. 2511. doi: 10.1242/jcs.095455.

[*] Breton; Lee; Zhou; Schreiber; Keler; Puh; Anandasabapathy; Schlesinger; Caskey; Liu and Nussenzweig (2015) 'Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells', *Journal of Experimental Medicine*, 212(3), p. 401–413. doi: 10.1084/jem.20141441.

[*] Bretou; Kumari; Malbec; Moreau; Obino; Pierobon; Randrian; Sáez and Lennon-Duménil (2016) 'Dynamics of the membrane–cytoskeleton interface in MHC class II-restricted antigen presentation', *Immunological Reviews*, 272(1), p. 39–51. doi: 10.1111/imr.12429.

[*] Bretou; Sáez; Sanséau; Maurin; Lankar; Chabaud; Spampanato; Malbec; Barbier; Muallem; Maiuri; Ballabio; Helft; Piel; Vargas and Lennon-Duménil (2017) 'Lysosome signaling controls the migration of dendritic cells', *Science Immunology*, 2(16). doi: 10.1126/sciimmunol.aak9573.

[*] Brewitz; Eickhoff; Dähling; Quast; Bedoui; Krocze; Kurts; Garbi; Barchet; Iannacone; Klauschen; Kolanus; Kaisho; Colonna; Germain and Kastenmüller (2017) 'CD8+ T Cells Orchestrate pDC-XCR1+ Dendritic Cell Spatial and Functional Cooperativity to Optimize Priming', *Immunity*, 46(2), p. 205–219. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.003.

[*] Briseño; Satpathy; Davidson; Ferris; Durai; Bagadia; O'Connor; Theisen; Murphy and Murphy (2018) 'Notch2-dependent DC2s mediate splenic germinal center responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(42), p. 10726–10731. doi: 10.1073/pnas.1809925115.

[*] Brown; Gudjonson; Pritykin; Deep; Lavallée; Mendoza; Fromme; Mazutis; Ariyan; Leslie; Pe'er and Rudensky (2019) 'Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity', *Cell*, 179(4), p. 846–863.e24. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.035.

[*] Broz; Binnewies; Boldajipour; Nelson; Pollack; Erle; Barczak; Rosenblum; Daud; Barber; Amigorena; van'tVeer; Sperling; Wolf and Krummel (2014) 'Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity', *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 26(5), p. 638–652. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.007.

[*] Calabro; Gallman; Gowthaman; Liu; Chen; Liu; Krishnaswamy; Nascimento; Xu; Patel; Williams; Tormey; Hod; Spitalnik; Zimring; zHendrickson; Stowell and Eisenbarth (2016) 'Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells', *Journal of Experimental Medicine*, 213(6), p. 887–896. doi: 10.1084/jem.20151720.

- [*] Calmeiro; Carrascal; Tavares; Ferreira; Gomes; Falcão; Cruz and Neves (2020) 'Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy: The role of human conventional type 1 dendritic cells', *Pharmaceutics*, 12(2), p. 1–20. doi: 10.3390/pharmaceutics12020158.
- [*] Calmette; Bertrand; Vétillard; Ellouze; Flint; Nicolas; Biola-Vidamment; Pallardy; Morand; Bachelerie; Godot and Schlecht-Louf (2016) 'Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Protein Controls Macropinocytosis in Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 197(11), p. 4247–4256. doi: 10.4049/jimmunol.1600561.
- [*] Calmette; Ellouze; Tran; Karaki; Ronin; Capel; Pallardy; Bachelerie; Krzysiek; Emilie; Schlecht-Louf and Godot (2014) 'Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Enhanced Expression in Dendritic Cells Is Sufficient To Drive Regulatory T Cells Expansion In Vivo', *The Journal of Immunology*, 193(12), p. 5863–5872. doi: 10.4049/jimmunol.1400758.
- [*] Cancel; Crozat; Dalod and Mattiuz (2019) 'Are Conventional Type 1 Dendritic Cells Critical for Protective Antitumor Immunity and How?', *Frontiers in Immunology*, 10(February). doi: 10.3389/fimmu.2019.00009.
- [*] Cannarile; Zollo; D'Adamio; Ayroldi; Marchetti; Tabilio; Bruscoli and Riccardi (2001) 'Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene [1]', *Cell Death and Differentiation*, 8(2), p. 201–203. doi: 10.1038/sj.cdd.4400798.
- [*] Canton; Schlam; Breuer; Gütschow; Glogauer and Grinstein (2016) 'Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages', *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms11284.
- [*] Cathelin; Met and Svane (2013) 'Silencing of the glucocorticoid-induced leucine zipper improves the immunogenicity of clinical-grade dendritic cells', *Cytotherapy*. Elsevier Inc, 15(6), p. 740–749. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.005.
- [*] Caulfield; Fernandez; Snetkov; Lee and Hawrylowicz (2002) 'CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells', *Immunology*, 105(2), p. 155–162. doi: 10.1046/j.0019-2805.2001.01359.x.
- [*] Chabaud; Heuze; Bretou; Vargas; Maiuri; Solanes; Maurin; Terriac; Le Berre; Lankar; Piolot; Adelstein; Zhang; Sixt; Jacobelli; Benichou; Voituriez; Piel and Lennon-Dumenil (2015) 'Cell migration and antigen capture are antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells', *Nature Communications*, 6(May), p. 1–15. doi: 10.1038/ncomms8526.
- [*] Chandra; Miao; Romoff and Frazer (2016) 'Epithelium expressing the E7 oncoprotein of HPV16 attracts immune-modulatory dendritic cells to the skin and suppresses their antigen-processing capacity', *PLoS ONE*, 11(3), p. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0152886.
- [*] Chugh and Paluch (2018) 'The actin cortex at a glance', *Journal of Cell Science*, 131(14), p. 1–9. doi: 10.1242/jcs.186254.
- [*] Cohen; Mouly; Hamdi; Maillot; Pallardy; Godot; Capel; Balian; Naveau; Galanaud; Lemoine and Emilie (2006) 'GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response', *Blood*, 107(5), p. 2037–2044. doi: 10.1182/blood-2005-07-2760.
- [*] Coillard and Segura (2019) 'In vivo differentiation of human monocytes', *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), p. 1–7. doi: 10.3389/fimmu.2019.01907.
- [*] Corbisier; Galès; Huszagh; Parmentier and Springael (2015) 'Biased signaling at chemokine receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 290(15), p. 9542–9554. doi: 10.1074/jbc.M114.596098.
- [*] Cougoule; Lastrucci; Guet; Mascarau; Meunier; Lugo-Villarino; Neyrolles; Poincloux and

Maridonneau-Parini (2018) 'Podosomes, but not the maturation status, determine the protease-dependent 3D migration in human dendritic cells', *Frontiers in Immunology*, 9(APR). doi: 10.3389/fimmu.2018.00846.

[*] Cramer (2010) 'Forming the cell rear first: Breaking cell symmetry to trigger directed cell migration', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(7), p. 628–632. doi: 10.1038/ncb0710-628.

[*] Crijns; Vanheule and Proost (2020) 'Targeting Chemokine—Glycosaminoglycan Interactions to Inhibit Inflammation', *Frontiers in Immunology*, 11(March). doi: 10.3389/fimmu.2020.00483.

[*] Crozat; Guiton; Contreras; Feuillet; Dutertre; Ventre; Manh; Baranek; Storset; Marvel; Boudinot; Hosmalin; Schwartz-Cornil and Dalod (2010) 'The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α + dendritic cells', *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), p. 1283–1292. doi: 10.1084/jem.20100223.

[*] Crozat; Tamoutounour; Vu Manh; Fossum; Luche; Ardouin; Guilliams; Azukizawa; Bogen; Malissen; Henri and Dalod (2011) 'Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8 + Type', *The Journal of Immunology*, 187(9), p. 4411–4415. doi: 10.4049/jimmunol.1101717.

[*] D'Adamio; Zollo; Moraca; Ayroldi; Bruscoli; Bartoli; Cannarile; Migliorati and Riccardi (1997) 'A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death', *Immunity*, 7(6), p. 803–812. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80398-2.

[*] Dalod; Salazar-Mather; Malmgaard; Lewis; Asselin-Paturel; Brière; Trinchieri and Biron (2002) 'Interferon α/β and interleukin 12 responses to viral infections: Pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo', *Journal of Experimental Medicine*, 195(4), p. 517–528. doi: 10.1084/jem.20011672.

[*] Das; Hoarau; Bandjee; Marianne and Gasque (2015) 'Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection', *Journal of General Virology*, 96(2), p. 294–310. doi: 10.1099/vir.0.071175-0.

[*] Debonneville; Flores; Kamynina; Plant; Tauxe; Thomas; Münster; Chraïbi; Pratt; Horisberger; Pearce; Loffing and Staub (2001) 'Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression', *EMBO Journal*, 20(24), p. 7052–7059. doi: 10.1093/emboj/20.24.7052.

[*] Decker; Yang; Rimer; Park-Min; Macaube; Mellins; Novack and Faccio (2015) 'Tmem178 acts in a novel negative feedback loop targeting NFATc1 to regulate bone mass', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(51), p. 15654–15659. doi: 10.1073/pnas.1511285112.

[*] Deckers; Hammad and Hoste (2018) 'Langerhans cells: Sensing the environment in health and disease', *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), p. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2018.00093.

[*] Dekker; Rhee; Hu; Lee; Lee; Iyer; Ehrlich; Georgiou; Tucker and Ippolito (2018) 'Lymphoid origin of a lineage of intrinsically activated plasmacytoid dendritic cell in mice and humans', *bioRxiv*, (512), p. 310680. doi: 10.1101/310680.

[*] Ding; Zhang; Biswas; Schugar; Brown; Byzova and Podrez (2017) 'Akt3 inhibits adipogenesis and protects from diet-induced obesity via WNK1/SGK1 signaling', *JCI insight*, 2(22). doi: 10.1172/jci.insight.95687.

[*] Ding; Zhang; Kim; Byzova and Podrez (2017) 'Akt3 kinase suppresses pinocytosis of low-density lipoprotein by macrophages via a novel WNK/SGK1/Cdc42 protein pathway', *Journal*

of *Biological Chemistry*, 292(22), p. 9283–9293. doi: 10.1074/jbc.M116.773739.

[*] Doodnauth; Grinstein and Maxson (2019) 'Constitutive and stimulated macropinocytosis in macrophages: Roles in immunity and in the pathogenesis of atherosclerosis', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1765). doi: 10.1098/rstb.2018.0147.

[*] Dress; Dutertre; Giladi; Schlitzer; Low; Shadan; Tay; Lum; Kairi; Hwang; Becht; Cheng; Chevrier; Larbi; Newell; Amit; Chen and Ginhoux (2019) 'Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D+ lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage', *Nature Immunology*. Springer US, 20(7), p. 852–864. doi: 10.1038/s41590-019-0420-3.

[*] Durai; Bagadia; Granja; Satpathy; Kulkarni; Davidson; Wu; Patel; Iwata; Liu; Huang; Briseño; Grajales-Reyes; Wöhner; Tagoh; Kee; Newberry; Busslinger; Chang; Murphy and Murphy (2019) 'Cryptic activation of an Irf8 enhancer governs cDC1 fate specification', *Nature Immunology*, 20(9), p. 1161–1173. doi: 10.1038/s41590-019-0450-x.

[*] Durand; Walter; Pirnay; Naessens; Gueguen; Goudot; Lameiras; Chang; Talaei; Ornatsky; Vassilevskaia; Baulande; Amigorena and Segura (2019) 'Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses', *Journal of Experimental Medicine*, 216(7), p. 1561–1581. doi: 10.1084/jem.20181994.

[*] Dutertre; Becht; Irac; Khalilnezhad; Narang; Khalilnezhad; Ng; van den Hoogen; Leong; Lee; Chevrier; Zhang; Yong; Koh; Lum; Howland; Mok; Chen; Larbi; Tan; Lim; Karagianni; Tzioufas; Malleret; Brody; Albani; van Roon; Radstake; Newell and Ginhoux (2019) 'Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells', *Immunity*. Elsevier Inc., 51(3), p. 573–589.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2019.08.008.

[*] Dyer; Salanga; Johns; Valdambrini; Fuster; Milner; Day and Handel (2016) 'The anti-inflammatory protein TSG-6 regulates chemokine function by inhibiting chemokine/glycosaminoglycan interactions', *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), p. 12627–12640. doi: 10.1074/jbc.M116.720953.

[*] Ehrchen; Roth and Barczyk-Kahlert (2019) 'More than suppression: Glucocorticoid action on monocytes and macrophages', *Frontiers in Immunology*, 10(AUG). doi: 10.3389/fimmu.2019.02028.

[*] Ehrchen; Steinmüller; Barczyk; Tenbrock; Nacken; Eisenacher; Nordhues; Sorg; Sunderkötter and Roth (2007) 'Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes', *Blood*, 109(3), p. 1265–1274. doi: 10.1182/blood-2006-02-001115.

[*] Eisenbarth (2018) 'Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function', *Nature Reviews Immunology*. Springer US. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1.

[*] Eisenbarth (2019) 'Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function', *Nature Reviews Immunology*. Springer US, 19(2), p. 89–103. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1.

[*] Eisenmann; West; Hildebrand; Kitchen; Peng; Sigler; Zhang; Siminovitch and Alberts (2007) 'T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDia1 knock-out mice', *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), p. 25152–25158. doi: 10.1074/jbc.M703243200.

[*] Escribano; Delgado-Martín and Rodríguez-Fernández (2009) 'CCR7-Dependent Stimulation of Survival in Dendritic Cells Involves Inhibition of GSK3 β ', *The Journal of Immunology*, 183(10), p. 6282–6295. doi: 10.4049/jimmunol.0804093.

[*] Eylestein; Gehring; Heise; Shumilina; Schmidt; Sztejn; Münzer; Nurbaeva; Eichenmüller; Tyan; Regel; Föllner; Kuhl; Soboloff; Penner and Lang (2011) 'Stimulation of Ca²⁺-channel

Orai1/STIM1 by serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1)', *FASEB Journal*, 25(6), p. 2012–2021. doi: 10.1096/fj.10-178210.

[*] Eylestein; Schmidt; Gu; Yang; Schmid; Schmidt; Alesutan; Szteyn; Regel; Shumilina and Lang (2012) 'Transcription factor NF- κ B regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions', *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), p. 2719–2730. doi: 10.1074/jbc.M111.275925.

[*] Faouzi; Hague; Potier; Ahidouch; Sevestre and Ouadid-Ahidouch (2011) 'Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells', *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), p. 542–551. doi: 10.1002/jcp.22363.

[*] Farache; Koren; Milo; Gurevich; Kim; Zigmond; Furtado; Lira and Shakhar (2013) 'Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation', *Immunity*. Elsevier Inc., 38(3), p. 581–595. doi: 10.1016/j.immuni.2013.01.009.

[*] Faure-André; Vargas; Yuseff; Heuzé; Diaz; Lankar; Steri; Manry; Hugues; Vascotto; Boulanger; Raposo; Bono; Roseblatt; Piel and Lennon-Duménil (2008) 'Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain', *Science*, 322(5908), p. 1705–1710. doi: 10.1126/science.1159894.

[*] Félix; Crottès; Delalande; Fauconnier; Lebranchu; Le Guennec and Velge-Roussel (2013) 'The Orai-1 and STIM-1 Complex Controls Human Dendritic Cell Maturation', *PLoS ONE*, 8(5). doi: 10.1371/journal.pone.0061595.

[*] Feske; Gwack; Prakriya; Srikanth; Puppel; Tanasa; Hogan; Lewis; Daly and Rao (2006) 'A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function', *Nature*, 441(7090), p. 179–185. doi: 10.1038/nature04702.

[*] Feske; Wulff and Skolnik (2015) *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity*, *Annual Review of Immunology*. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112212.

[*] Fiol; Mak and Kültz (2007) 'Specific TSC22 domain transcripts are hypertonically induced and alternatively spliced to protect mouse kidney cells during osmotic stress', *FEBS Journal*, 274(1), p. 109–124. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05569.x.

[*] Flynn; Dankers and Morand (2019) 'Could GILZ be the answer to glucocorticoid toxicity in lupus?', *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), p. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2019.01684.

[*] Freitas; Wittner; Nguyen; Rondeau; Biajoux; Akin; Gaudin; Beaussant-Cohen; Bertrand; Bellanné-Chantelot; Donadieu; Bachelerie; Espéli; Dalloul; Louache and Balabanian (2017) 'Lymphoid differentiation of hematopoietic stem cells requires efficient Cxcr4 desensitization', *Journal of Experimental Medicine*, 214(7), p. 2023–2040. doi: 10.1084/jem.20160806.

[*] Gao; Nish; Jiang; Hou; Licona-Limón; Weinstein; Zhao and Medzhitov (2013) 'Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells', *Immunity*, 39(4), p. 722–732. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.028.

[*] Godot; Garcia; Capel; Arock; Durand-Gasselín; Asselin-Labat; Emilie and Humbert (2006) 'Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 61(7), p. 886–890. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01065.x.

[*] Gomez de Agüero; Kaiserlian; Dubois; Sparwasser; Taillardet; Hacini-Rachinel; Vocanson; Malissen and Kissenpfennig (2012) 'Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8+ T cells and activating Foxp3+ regulatory T cells', *Journal of Clinical Investigation*, 122(5), p. 1700–1711. doi: 10.1172/JCI59725.1700.

- [*] Goudot; Coillard; Villani; Gueguen; Cros; Sarkizova; Tang-Huau; Bohec; Baulande; Hacohen; Amigorena and Segura (2017) 'Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages', *Immunity*, 47(3), p. 582-596.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.016.
- [*] Grajales-Reyes; Iwata; Albring; Wu; Tussiwand; Kc; Kretzer; Briseño; Durai; Bagadia; Haldar; Schönheit; Rosenbauer; Murphy and Murphy (2015) 'Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 α + conventional DC clonogenic progenitor', *Nature Immunology*, 16(7), p. 708-717. doi: 10.1038/ni.3197.
- [*] Granucci; Ferrero; Foti; Aggujaro; Vettoretto and Ricciardi-Castagnoli (1999) 'Early events in dendritic cell maturation induced by LPS', *Microbes and Infection*, 1(13), p. 1079-1084. doi: 10.1016/S1286-4579(99)00209-9.
- [*] Greter; Helft; Chow; Hashimoto; Mortha; Agudo-Cantero; Bogunovic; Gautier; Miller; Leboeuf; Lu; Aloman; Brown; Pollard; Xiong; Randolph; Chipuk; Frenette and Merad (2012) 'GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells', *Immunity*. Elsevier Inc., 36(6), p. 1031-1046. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.027.
- [*] Gu; Ding; Tang; Lei; Jiang and Xu (2018) 'A synthesized glucocorticoid- induced leucine zipper peptide inhibits retinal müller cell gliosis', *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR), p. 1-11. doi: 10.3389/fphar.2018.00331.
- [*] Guilliams; Crozat; Henri; Tamoutounour; Grenot; Devilard; Alexopoulou; Dalod and Malissen (2010) 'Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103- dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3 regulatory T cells', *Blood*, 115(10), p. 1-3. doi: 10.1182/blood-2009-09-245274.The.
- [*] Guilliams; Dutertre; Scott; McGovern; Sichen; Chakarov; Van Gassen; Chen; Poidinger; De Prijck; Tavernier; Low; Irac; Mattar; Sumatoh; Low; Chung; Chan; Tan; Hon; Fossum; Bogen; Choolani; Chan; Larbi; Luche; Henri; Saeys; Newell; Lambrecht; Malissen and Ginhoux (2016) 'Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species', *Immunity*, 45(3), p. 669-684. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.015.
- [*] Guilliams; Ginhoux; Jakubzick; Naik; Onai; Schraml; Segura; Tussiwand and Yona (2014) 'Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny', *Nature Reviews Immunology*, 14(8), p. 571-578. doi: 10.1038/nri3712.
- [*] Guo; Zhou; Wu; Zhu; Lai and Wu (2016) 'Generation of mouse and human dendritic cells in vitro', *Journal of Immunological Methods*, 432, p. 24-29. doi: 10.1016/j.jim.2016.02.011.
- [*] Guttman-Yassky; Lowes; Fuentes-Duculan; Whynot; Novitskaya; Cardinale; Haider; Khatcherian; Carucci; Bergman and Krueger (2007) 'Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(5), p. 1210-1217. doi: 10.1016/j.jaci.2007.03.006.
- [*] Den Haan and Bevan (2002) 'Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8+ and CD8- dendritic cells in vivo', *Journal of Experimental Medicine*, 196(6), p. 817-827. doi: 10.1084/jem.20020295.
- [*] Hamdi; Godot; Maillot; Prejean; Cohen; Krzysiek; Lemoine; Zou and Emilie (2007) 'Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper', *Blood*, 110(1), p. 211-219. doi: 10.1182/blood-2006-10-052506.
- [*] Haniffa; Shin; Bigley; McGovern; Teo; See; Wasan; Wang; Malinarich; Malleret; Larbi; Tan; Zhao; Poidinger; Pagan; Cookson; Dickinson; Dimmick; Jarrett; Renia; Tam; Song; Connolly;

Chan; Gehring; Bertoletti; Collin and Ginhoux (2012) 'Human Tissues Contain CD141 hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103 + Nonlymphoid Dendritic Cells', *Immunity*, 37(1), p. 60–73. doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.012.

[*] Hauser; Schaeuble; Kindinger; Impellizzeri; Krueger; Hauck; Boyman and Legler (2016) 'Inflammation-Induced CCR7 Oligomers Form Scaffolds to Integrate Distinct Signaling Pathways for Efficient Cell Migration', *Immunity*. Elsevier Inc., 44(1), p. 59–72. doi: 10.1016/j.immuni.2015.12.010.

[*] He; Chen; Fu; Tang; Li; Cao; Wang and Zheng (2018) 'Infectious bursal disease virus protein VP4 suppresses type I interferon expression via inhibiting K48-linked ubiquitylation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)', *Immunobiology*. Elsevier, 223(4–5), p. 374–382. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.048.

[*] Heath; Belz; Behrens; Smith; Forehan; Parish; Davey; Wilson; Carbone and Villadangos (2004) 'Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens', *Immunological Reviews*, 199, p. 9–26. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00142.x.

[*] Heger; Balk; Lühr; Heidkamp; Lehmann; Hatscher; Purbojo; Hartmann; Garcia-Martin; Nishimura; Cesnjevar; Nimmerjahn and Dudziak (2018) 'CLEC10A Is a specific marker for human CD1c+ dendritic cells and enhances their toll-like receptor 7/8-Induced cytokine secretion', *Frontiers in Immunology*, 9(APR), p. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2018.00744.

[*] Heidkamp; Sander; Lehmann; Heger; Eissing; Baranska; Lühr; Hoffmann; Reimer; Lux; Söder; Hartmann; Zenk; Ulas; McGovern; Alexiou; Spriewald; Mackensen; Schuler; Schauf; Forster; Repp; Fasching; Purbojo; Cesnjevar; Ullrich; Ginhoux; Schlitzer; Nimmerjahn; Schultze and Dudziak (2016) 'Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment', *Science Immunology*, 1(6), p. 40–50. doi: 10.1126/sciimmunol.aai7677.

[*] Heise; Shumilina; Nurbaeva; Schmid; Sztejn; Yang; Xuan; Wang; Zemtsova; Duszenko and Lang (2011) 'Effect of dexamethasone on Na⁺/Ca²⁺ exchanger in dendritic cells', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 300(6). doi: 10.1152/ajpcell.00396.2010.

[*] Helft; Anjos-Afonso; van der Veen; Chakravarty; Bonnet and Reis e Sousa (2017) 'Dendritic Cell Lineage Potential in Human Early Hematopoietic Progenitors', *Cell Reports*. ElsevierCompany., 20(3), p. 529–537. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.075.

[*] Helft; Böttcher; Chakravarty; Zelenay; Huotari; Schraml; Goubau and Reis e Sousa (2015) 'GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells', *Immunity*, 42(6), p. 1197–1211. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.018.

[*] Henri; Poulin; Tamoutounour; Ardouin; Guilliams; De Bovis; Devilard; Viret; Azukizawa; Kissenpfennig and Malissen (2010) 'CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells', *Journal of Experimental Medicine*, 207(1), p. 189–206. doi: 10.1084/jem.20091964.

[*] Hernandez; Gorlin; Lukens; Taniuchi; Bohinjec; Francois; Klotman and Diaz (2003) 'Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease', *Nature Genetics*, 34(1), p. 70–74. doi: 10.1038/ng1149.

[*] Hildner; Edelson; Purtha; Diamond; Matsushita; Kohyama; Calderon; Schraml; Unanue; Diamond; Schreiber; Murphy and Murphy (2008) 'Science-2008-Hildner-1097-100', 1144(November), p. 2006–2009.

[*] Hilligan and Ronchese (2020) 'Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses', *Cellular and Molecular Immunology*. Springer US, 17(6), p.

587–599. doi: 10.1038/s41423-020-0465-0.

- [*] Hjortø; Larsen; Steen; Daugvilaite; Berg; Fares; Hansen; Ali and Rosenkilde (2016) 'Differential CCR7 targeting in dendritic cells by three naturally occurring CC-chemokines', *Frontiers in Immunology*, 7(DEC), p. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2016.00568.
- [*] Hodeify; Selvaraj; Wen; Arredouani; Hubrack; Dib; Al-Thani; McGraw; And and Machaca (2012) 'A STIM1-dependent "trafficking trap" mechanism regulates Orai1 plasma membrane residence and Ca²⁺ influx levels', *Stem Cells*, (February).
- [*] Hogan; Lewis and Rao (2010) 'Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI', *Annual Review of Immunology*, 28(1), p. 491–533. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132550.
- [*] Holmberg and Perlmann (2012) 'Maintaining differentiated cellular identity', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 13(6), p. 429–439. doi: 10.1038/nrg3209.
- [*] Hong; Lee; Choi; Jung; Vo; Hoang; Kim and Lee (2016) 'Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 (SERCA2) reduces the migratory capacity of CCL21-treated monocyte-derived dendritic cells', *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, 48(8), p. e253-9. doi: 10.1038/emm.2016.69.
- [*] Hou; Pedi; Diver and Long (2012) 'Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel orai1', *Science*, 338(6112), p. 1308–1313. doi: 10.1126/science.1228757.
- [*] Hours and Mery (2010) 'The N-terminal domain of the type 1 Ins(1,4,5)P₃ receptor stably expressed in MDCK cells interacts with myosin IIA and alters epithelial cell morphology', *Journal of Cell Science*, 123(9), p. 1449–1459. doi: 10.1242/jcs.057687.
- [*] Hsieh; Chen; Chang; Lee and Liou (2017) 'Cortical actin contributes to spatial organization of ER-PM junctions', *Molecular Biology of the Cell*, 28(23), p. 3171–3180. doi: 10.1091/mbc.E17-06-0377.
- [*] Huang; Wulff; Völkl; Loffing; Richter; Kuhl; Lang and Vallon (2004) 'Impaired Regulation of Renal K⁺ Elimination in the sgk1-Knockout Mouse', *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(4), p. 885–891. doi: 10.1097/01.ASN.0000120368.59693.A8.
- [*] Humblet-Baron; Barber; Roca; Lenaerts; Koni and Liston (2019) 'Murine myeloproliferative disorder as a consequence of impaired collaboration between dendritic cells and CD4 T cells', *Blood*, 133(4), p. 319–330. doi: 10.1182/blood-2018-05-850321.
- [*] Inaba; Inaba; Romani; Aya; Deguchi; Ikehara; Muramatsu and Steinman (1992) 'Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor', *Journal of Experimental Medicine*, 176(6), p. 1693–1702. doi: 10.1084/jem.176.6.1693.
- [*] Inaba; Steinman; Van Voorhis and Muramatsu (1983) 'Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(19 I), p. 6041–6045. doi: 10.1073/pnas.80.19.6041.
- [*] Iwai; Michikawa; Bosanac; Ikura and Mikoshiba (2007) 'Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), p. 12755–12764. doi: 10.1074/jbc.M609833200.
- [*] Jing; He; Sun; Quintana; Ding; Ma; Tan; Liang; Zheng; Chen; Shi; Zhang; Zhong; Huang; Dong; Walker; Hogan; Wang and Zhou (2015) 'Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx', *Nature Cell Biology*, 17(10), p. 1339–1347. doi: 10.1038/ncb3234.
- [*] Joha; Nugues; Héтуin; Berthon; Dezitter; Dauphin; Mahon; Roche-Lestienne; Preudhomme;

- Quesnel and Idziorek (2012) 'GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL+ cells', *Oncogene*, 31(11), p. 1419–1430. doi: 10.1038/onc.2011.328.
- [*] Johansson; Aoude; Wadt; Glasson; Warriar; Hewitt; Kiilgaard; Heegaard; Isaacs; Franchina; Ingvar; Vermeulen; Whitehead; Schmidt; Palmer; Symmons; Gerdes; Jönsson and Hayward (2016) 'Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4', *Oncotarget*, 7(4), p. 4624–4631. doi: 10.18632/oncotarget.6614.
- [*] Johnson and Jackson (2013) 'The chemokine CX3CL1 promotes trafficking of dendritic cells through inflamed lymphatics Running Title: CX3CL1-dependent lymphatic trafficking 7', *JCS Advance Online Article. Posted on*, 4(September 2013). doi: 10.1242/jcs.135343.
- [*] Jones; Perera; Fan; Russ; Harris and Morand (2015) 'GILZ regulates Th17 responses and restrains IL-17-mediated skin inflammation', *Journal of Autoimmunity*. Elsevier Ltd, 61, p. 73–80. doi: 10.1016/j.jaut.2015.05.010.
- [*] Jones; Toh; Odobasic; Oudin; Cheng; Lee; White; Russ; Infantino; Light; Tarlinton; Harris and Morand (2016) 'Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) inhibits B cell activation in systemic lupus erythematosus', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(4), p. 739–747. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207744.
- [*] Jongbloed; Kassianos; McDonald; Clark; Ju; Angel; Chen; Dunbar; Wadley; Jeet; Vulink; Hart and Radford (2010) 'Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens', *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), p. 1247–1260. doi: 10.1084/jem.20092140.
- [*] Jørgensen; Rosenkilde and Hjortø (2018) 'Biased signaling of G protein-coupled receptors – From a chemokine receptor CCR7 perspective', *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 258, p. 4–14. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.07.004.
- [*] Kabashima; Shiraishi; Sugita; Mori; Onoue; Kobayashi; Sakabe; Yoshiki; Tamamura; Fujii; Inaba and Tokura (2007) 'CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells', *American Journal of Pathology*, 171(4), p. 1249–1257. doi: 10.2353/ajpath.2007.070225.
- [*] Kaplan; Jenison; Saeland; Shlomchik and Shlomchik (2005) 'Epidermal Langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity', *Immunity*, 23(6), p. 611–620. doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.008.
- [*] Karaki; Garcia; Tcherakian; Capel; Tran; Pallardy; Humbert; Emilie and Godot (2014) 'Enhanced glucocorticoid-induced leucine zipper in dendritic cells induces allergen-specific regulatory CD4+T-cells in respiratory allergies', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69(5), p. 624–631. doi: 10.1111/all.12379.
- [*] Kashem; Haniffa and Kaplan (2017) 'Antigen-Presenting Cells in the Skin', *Annual Review of Immunology*, 35(1), p. 469–499. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052215.
- [*] Khan; Sleno; Gora; Zylbergold; Laverdure; Labbé; Miller and Hébert (2013) 'The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action', *Pharmacological Reviews*, 65(2), p. 545–577. doi: 10.1124/pr.111.005603.
- [*] Kiermaier; Moussion; Veldkamp; Gerardy-Schahn; De Vries; Williams; Chaffee; Phillips; Freiburger; Imre; Taleski; Payne; Braun; Förster; Mechtler; Mühlenhoff; Volkman and Sixt (2016) 'Polysialylation controls dendritic cell trafficking by regulating chemokine recognition', *Science*, 351(6269), p. 186–190. doi: 10.1126/science.aad0512.
- [*] Kim; Bagadia; Iii; Iwata; Murphy; Murphy; Kim; Bagadia; Iii; Liu; Huang and Theisen (2020) 'Article High Amount of Transcription Factor IRF8 Engages AP1-IRF Composite Elements in Enhancers to Direct Type 1 Conventional Dendritic Cell Identity Article High Amount of

- Transcription Factor IRF8 Engages AP1-IRF Composite Elements in Enhancers to Drive', *Immunity*. Elsevier Inc., p. 1–16. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.018.
- [*] King; Kroenke and Segal (2010) 'GM-CSF-dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization', *Journal of Experimental Medicine*, 207(5), p. 953–961. doi: 10.1084/jem.20091844.
- [*] Kobayashi; Glatz; Horiuchi; Kawasaki; Akiyama; Kaplan; Kong; Amagai and Nagao (2015) 'Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis', *Immunity*. Elsevier Inc., 42(4), p. 756–766. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.014.
- [*] Köberle; Göppel; Grandl; Gaentzsch; Manncke; Berchtold; Müller; Lüscher; Asselin-Labat; Pallardy; Sorg; Langer; Barth; Zumbihl; Autenrieth and Bohn (2012) 'Yersinia enterocolitica YopT and clostridium difficile toxin B induce expression of GILZ in epithelial cells', *PLoS ONE*, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0040730.
- [*] Kohara; Omatsu; Sugiyama; Noda; Fujii and Nagasawa (2007) 'Development of plasmacytoid dendritic cells in bone marrow stromal cell niches requires CXCL12-CXCR4 chemokine signaling', *Blood*, 110(13), p. 4153–4160. doi: 10.1182/blood-2007-04-084210.
- [*] Krueger; Fretzin; Suárez-Fariñas; Haslett; Phipps; Cameron; McColm; Katcharian; Cueto; White; Banerjee and Hoffman (2013) 'IL-17A is Essential for Cell Activation and Inflammatory Gene Circuits in Psoriasis', *J Allergy Clin Immunol*, 130(1), p. 1–18. doi: 10.1016/j.jaci.2012.04.024.IL-17A.
- [*] Krug; Uppaluri; Facchetti; Dorner; Sheehan; Schreiber; Cella and Colonna (2002) 'Cutting Edge: IFN-Producing Cells Respond to CXCR3 Ligands in the Presence of CXCL12 and Secrete Inflammatory Chemokines upon Activation', *The Journal of Immunology*, 169(11), p. 6079–6083. doi: 10.4049/jimmunol.169.11.6079.
- [*] Kurotaki; Yamamoto; Nishiyama; Uno; Ban; Ichino; Sasaki; Matsunaga; Yoshinari; Ryo; Nakazawa; Ozato and Tamura (2014) 'IRF8 inhibits C/EBP α activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, p. 1–15. doi: 10.1038/ncomms5978.
- [*] Lämmermann; Bader; Monkley; Worbs; Wedlich-Söldner; Hirsch; Keller; Förster; Critchley; Fässler and Sixt (2008) 'Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing', *Nature*, 453(7191), p. 51–55. doi: 10.1038/nature06887.
- [*] Lämmermann and Sixt (2009) 'Mechanical modes of "amoeboid" cell migration', *Current Opinion in Cell Biology*, 21(5), p. 636–644. doi: 10.1016/j.ceb.2009.05.003.
- [*] Lang; Stournaras; Zacharopoulou; Voelkl and Alesutan (2019) 'Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and the response to cell stress', *Cell Stress*, 3(1), p. 1–8. doi: 10.15698/cst2019.01.170.
- [*] De Laté; Pépin; Assaf-Vandecasteele; Espinasse; Nicolas; Asselin-Labat; Bertoglio; Pallardy and Biola-Vidamment (2010) 'Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner', *Journal of Biological Chemistry*, 285(8), p. 5594–5605. doi: 10.1074/jbc.M109.068346.
- [*] Laufer; Hauser; Kindinger; Purvanov; Pauli and Legler (2019) 'Chemokine Receptor CCR7 Triggers an Endomembrane Signaling Complex for Spatial Rac Activation', *Cell Reports*. Elsevier Company., 29(4), p. 995–1009.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.031.
- [*] Lebson; Wang; Jiang and Whartenby (2011) 'Induction of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene limits the efficacy of dendritic cell vaccines', *Cancer Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 18(8), p. 563–570. doi: 10.1038/cgt.2011.23.
- [*] Lee; Breton; Oliveira; Zhou; Aljoufi; Pühr; Cameron; Sékaly; Nussenzweig and Liu (2015)

'Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow', *Journal of Experimental Medicine*, 212(3), p. 385–399. doi: 10.1084/jem.20141442.

[*] Lee; Zhou; Ma; Zhang; Aljoufi; Luh; Lucero; Liang; Thomsen; Bhagat; Shen and Liu (2017) 'Lineage specification of human dendritic cells is marked by IRF8 expression in hematopoietic stem cells and multipotent progenitors', *Nature Immunology*, 18(8), p. 877–888. doi: 10.1038/ni.3789.

[*] Leithner; Eichner; Müller; Reversat; Brown; Schwarz; Merrin; De Gorter; Schur; Bayerl; De Vries; Wieser; Hauschild; Lai; Moser; Kerjaschki; Rottner; Small; Stradal and Sixt (2016) 'Diversified actin protrusions promote environmental exploration but are dispensable for locomotion of leukocytes', *Nature Cell Biology*, 18(11), p. 1253–1259. doi: 10.1038/ncb3426.

[*] Lelouard; Fallet; De Bovis; Méresse and Gorvel (2012) 'Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores', *Gastroenterology*. Elsevier Inc., 142(3), p. 592-601.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2011.11.039.

[*] Lewis (2020) 'Store-operated calcium channels: From function to structure and back again', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(5). doi: 10.1101/cshperspect.a035055.

[*] Leylek; Alcántara-Hernández; Lanzar; Lüdtke; Perez; Reizis and Idoyaga (2019) 'Integrated Cross-Species Analysis Identifies a Conserved Transitional Dendritic Cell Population', *Cell Reports*, 29(11), p. 3736-3750.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.042.

[*] Liu; Le Berre; Lautenschlaeger; Maiuri; Callan-Jones; Heuzé; Takaki; Voituriez and Piel (2015) 'Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells', *Cell*, 160(4), p. 659–672. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.007.

[*] Liu and Shi (2014) 'Role of G protein-coupled receptors in control of dendritic cell migration', *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2014. doi: 10.1155/2014/738253.

[*] López-Cotarelo; Escribano-Díaz; González-Bethencourt; Gómez-Moreira; Deguiz; Torres-Bacete; Gómez-Cabañas; Fernández-Barrera; Delgado-Martín; Mellado; Rigueiro; Miranda-Carús and Rodríguez-Fernández (2015) 'A novel MEK-ERK-AMPK signaling axis controls chemokine receptor CCR7-dependent survival in human mature dendritic cells', *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), p. 827–840. doi: 10.1074/jbc.M114.596551.

[*] Vander Lugt; Riddell; Khan; Hackney; Lesch; DeVoss; Weirauch; Singh and Mellman (2017) 'Transcriptional determinants of tolerogenic and immunogenic states during dendritic cell maturation', *The Journal of cell biology*, 216(3), p. 779–792. doi: 10.1083/jcb.201512012.

[*] Luo; Busillo; Stumm and Benovic (2017) 'G protein-coupled receptor kinase 3 and protein kinase C phosphorylate the distal C-terminal tail of the chemokine receptor CXCR4 and mediate recruitment of β -arrestin', *Molecular Pharmacology*, 91(6), p. 554–566. doi: 10.1124/mol.116.106468.

[*] Luo and Dalod (2020) 'The quest for faithful in vitro models of human dendritic cells types', *Molecular Immunology*. Elsevier, 123(December 2019), p. 40–59. doi: 10.1016/j.molimm.2020.04.018.

[*] Lyon and Tesmer (2013) 'Structural insights into phospholipase C- β function', *Molecular Pharmacology*, 84(4), p. 488–500. doi: 10.1124/mol.113.087403.

[*] Macri; Pang; Patton and O'Keeffe (2018) 'Dendritic cell subsets', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 84, p. 11–21. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.12.009.

[*] Maiuri; Rupprecht; Wieser; Rupprecht; Bénichou; Carpi; Coppey; De Beco; Gov; Heisenberg; Lage Crespo; Lautenschlaeger; Le Berre; Lennon-Dumenil; Raab; Thiam; Piel; Sixt and Voituriez (2015) 'Actin flows mediate a universal coupling between cell speed and cell persistence',

Cell, 161(2), p. 374–386. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.056.

[*] Malavasi; Deaglio; Funaro; Ferrero; Horenstein; Ortolan; Vaisitti and Aydin (2008) 'Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology', *Physiological Reviews*, 88(3), p. 841–886. doi: 10.1152/physrev.00035.2007.

[*] Malissen; Tamoutounour and Henri (2014) 'The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 14(6), p. 417–428. doi: 10.1038/nri3683.

[*] Maravillas-Montero and Santos-Argumedo (2012) 'The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells', *Journal of Leukocyte Biology*, 91(1), p. 35–46. doi: 10.1189/jlb.0711335.

[*] Marchese and Benovic (2001) 'Agonist-promoted Ubiquitination of the G Protein-coupled Receptor CXCR4 Mediates Lysosomal Sorting', *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), p. 45509–45512. doi: 10.1074/jbc.C100527200.

[*] Di Marco; Massetti; Bruscoli; Macchiarulo; Di Virgilio; Velardi; Donato; Migliorati and Riccardi (2007) 'Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF- κ B interaction: Role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain', *Nucleic Acids Research*, 35(2), p. 517–528. doi: 10.1093/nar/gkl1080.

[*] Marioni and Arendt (2017) 'How single-cell genomics is changing evolutionary and developmental biology', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(August), p. 537–553. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060818.

[*] Martínez-López; Iborra; Conde-Garrosa and Sancho (2015) 'Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania* major infection in mice', *European Journal of Immunology*, 45(1), p. 119–129. doi: 10.1002/eji.201444651.

[*] Maschalidi; Nunes-Hasler; Nascimento; Sallent; Lannoy; Garfa-Traore; Cagnard; Sepulveda; Vargas; Lennon-Duménil; Van Ender; Capiod; Demaurex; Darrasse-Jèze and Manoury (2017) 'UNC93B1 interacts with the calcium sensor STIM1 for efficient antigen cross-presentation in dendritic cells', *Nature Communications*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01601-5.

[*] Mass; Ballesteros; Farlik; Halbritter; Günther; Crozet; Jacome-Galarza; Händler; Klughammer; Kobayashi; Gomez-Perdiguero; Schultze; Beyer; Bock and Geissmann (2016) 'Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis', *Science*, 353(6304). doi: 10.1126/science.aaf4238.

[*] Matzner; Zemtsova; Xuan; Duszenko; Shumilina and Lang (2008) 'Ion Channels Modulating Mouse Dendritic Cell Functions', *The Journal of Immunology*, 181(10), p. 6803–6809. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6803.

[*] Mayer; Ghorbani; Nandan; Dudek; Arnold-Schrauf; Hesse; Berod; Stüve; Puttur; Merad and Sparwasser (2014) 'Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103⁺ dendritic cells from mouse bone marrow', *Blood*, 124(20), p. 3081–3091. doi: 10.1182/blood-2013-12-545772.

[*] McDermott; Gao; Liu; Siwicki; Martens; Jacobs; Velez; Yim; Bryke; Hsu; Dai; Marquesen; Stregevsky; Kwatema; Theobald; Long Priel; Pittaluga; Raffeld; Calvo; Maric; Desmond; Holmes; Kuhns; Balabanian; Bachelier; Porcella; Malech and Murphy (2015) 'Chromothriptic cure of WHIM syndrome', *Cell*, 160(4), p. 686–699. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.014.

[*] McKimmie; Singh; Hewit; Lopez-Franco; Le Brocq; Rose-John; Lee; Baker; Wheat; Blackburn; Nibbs and Graham (2013) 'An analysis of the function and expression of D6 on lymphatic endothelial cells', *Blood*, 121(18), p. 3768–3777. doi: 10.1182/blood-2012-04-

425314.

- [*] Merad; Ginhoux and Collin (2008) 'Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells', *Nature Reviews Immunology*, 8(12), p. 935–947. doi: 10.1038/nri2455.
- [*] Mignen and Shuttleworth (2000) 'I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca²⁺ entry channel', *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), p. 9114–9119. doi: 10.1074/jbc.275.13.9114.
- [*] Mignen; Thompson and Shuttleworth (2008) 'Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels', *Journal of Physiology*, 586(1), p. 185–195. doi: 10.1113/jphysiol.2007.146258.
- [*] Miller; Brown; Shay; Gautier; Jojic; Cohain; Pandey; Leboeuf; Elpek; Helft; Hashimoto; Chow; Price; Greter; Bogunovic; Angelique; Frenette; Randolph; Turley; Merad and Consortium (2014) 'Deciphering the transcriptional network of the DC lineage', 13(9), p. 888–899. doi: 10.1038/ni.2370.Deciphering.
- [*] Mittal; Kassianos; Tran; Bergot; Gosmann; Hofmann; Blumenthal and Leggatt, GR and Frazer (2013) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase Activity Contributes to Local Immune Suppression in the Skin Expressing Human Papillomavirus Oncoprotein E7', *Journal of Investigative Dermatology*, 176(1), p. 100–106. doi: 10.1038/jid.2013.222.
- [*] Mittelstadt and Ashwell (2001) 'Inhibition of AP-1 by the Glucocorticoid-inducible Protein GILZ', *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), p. 29603–29610. doi: 10.1074/jbc.M101522200.
- [*] Monaco; Decrock; Akl; Ponsaerts; Vervliet; Luyten; De Maeyer; Missiaen; Distelhorst; De Smedt; Parys; Leybaert and Bultynck (2012) 'Selective regulation of IP 3-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 19(2), p. 295–309. doi: 10.1038/cdd.2011.97.
- [*] Moreau; Blanch-Mercader; Attia; Alraies; Maurin; Bouso; Joanny; Voituriez; Piel and Lennon-Duménil (2018) 'Macropinocytosis Overcomes Directional Bias Due to Hydraulic Resistance to Enhance Space Exploration by Dendritic Cells', *Ssrn*. doi: 10.2139/ssrn.3155703.
- [*] Moreau; Blanch-Mercader; Attia; Maurin; Alraies; Sanséau; Malbec; Delgado; Bouso; Joanny; Voituriez; Piel and Lennon-Duménil (2019) 'Macropinocytosis Overcomes Directional Bias in Dendritic Cells Due to Hydraulic Resistance and Facilitates Space Exploration', *Developmental Cell*, 49(2), p. 171–188.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.024.
- [*] Moreau; Piel; Voituriez and Lennon-Duménil (2018) 'Integrating Physical and Molecular Insights on Immune Cell Migration', *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, 39(8), p. 632–643. doi: 10.1016/j.it.2018.04.007.
- [*] Motiani; Abdullaev and Trebak (2010) 'A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: Selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells', *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), p. 19173–19183. doi: 10.1074/jbc.M110.102582.
- [*] Mouriès; Moron; Schlecht; Escriou; Dadaglio and Lederer (2008) 'Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation', *Blood*, 112(9), p. 3713–3722. doi: 10.1182/blood-2008-03-146290.
- [*] Murphy (2012) 'Double Duty by CCL21 in Dendritic Cell Trafficking', *Immunity*, 32(5), p. 590–592. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.004.Double.
- [*] Naik; Perié; Swart; Gerlach; Van Rooij; De Boer and Schumacher (2013) 'Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors', *Nature*, 496(7444), p. 229–

232. doi: 10.1038/nature12013.

[*] Ng; Hsu; Mandell; Roediger; Hoeller; Mrass; Iparraguirre; Cavanagh; Triccas; Beverley; Scott and Weninger (2008) 'Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites', *PLoS Pathogens*, 4(11). doi: 10.1371/journal.ppat.1000222.

[*] Ng; Jennings; Wang; Molina; Nelson and Wang (2017) 'Non-canonical glucocorticoid receptor transactivation of gilz by alcohol suppresses cell inflammatory response', *Frontiers in Immunology*, 8(JUN), p. 8–11. doi: 10.3389/fimmu.2017.00661.

[*] Ngo; Beaulieu; Gu; Leaney; Santos; Fan; Yang; Kao; Xu; Escriou; Loiler; Vervoordeldonk and Morand (2013) 'Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of inflammation and arthritis', *Arthritis and Rheumatism*, 65(5), p. 1203–1212. doi: 10.1002/art.37858.

[*] Nobes and Hall (1999) 'Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement', *Journal of Cell Biology*, 144(6), p. 1235–1244. doi: 10.1083/jcb.144.6.1235.

[*] Nunes-Hasler; Maschalidi; Lippens; Castelbou; Bouvet; Guido; Bermont; Bassoy; Page; Merkler; Hugues; Martinvalet; Manoury and Demaurex (2017) 'STIM1 promotes migration, phagosomal maturation and antigen cross-presentation in dendritic cells', *Nature Communications*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01600-6.

[*] Nunes; Cornut; Bochet; Hasler; Oh-Hora; Waldburger and Demaurex (2012) 'STIM1 juxtaposes ER to phagosomes, generating Ca²⁺ hotspots that boost phagocytosis', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 22(21), p. 1990–1997. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.049.

[*] Nurbaeva; Schmid; Sztejn; Yang; Viollet; Shumilina and Lang (2012) 'Enhanced Ca²⁺ entry and Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity in dendritic cells from AMP-activated protein kinase-deficient mice', *FASEB Journal*, 26(7), p. 3049–3058. doi: 10.1096/fj.12-204024.

[*] Nutt and Chopin (2020) 'Transcriptional Networks Driving Dendritic Cell Differentiation and Function', *Immunity*, 52(6), p. 942–956. doi: 10.1016/j.immuni.2020.05.005.

[*] O'Hayre; Salanga; Handel and Allen (2008) 'Chemokines and cancer: Migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment', *Biochemical Journal*, 409(3), p. 635–649. doi: 10.1042/BJ20071493.

[*] Ohl; Mohaupt; Czeloth; Hintzen; Kiafard; Zwirner; Blankenstein; Henning and Förster (2004) 'CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions', *Immunity*, 21(2), p. 279–288. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.014.

[*] Ohnmacht; Pullner; King; Drexler; Meier; Brouckers and Voehringer (2009) 'Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity', *Journal of Experimental Medicine*, 206(3), p. 549–559. doi: 10.1084/jem.20082394.

[*] Onai; Kurabayashi; Hosoi-Amaike; Toyama-Sorimachi; Matsushima; Inaba and Ohteki (2013) 'A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential', *Immunity*. Elsevier Inc., 38(5), p. 943–957. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.006.

[*] Otero; Groettrup and Legler (2006) 'Opposite Fate of Endocytosed CCR7 and Its Ligands: Recycling versus Degradation', *The Journal of Immunology*, 177(4), p. 2314–2323. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2314.

[*] Otsuka; Watanabe; Shinya; Okura; Saeki; Geijtenbeek and Takahashi (2018) 'Differentiation of Langerhans Cells from Monocytes and Their Specific Function in Inducing IL-22-Specific Th Cells', *The Journal of Immunology*, 201(10), p. 3006–3016. doi: 10.4049/jimmunol.1701402.

[*] Palmada; Embark; Yun; Böhmer and Lang (2003) 'Molecular requirements for the regulation of the renal outer medullary K⁺ channel ROMK1 by the serum- and

- glucocorticoid-inducible kinase SGK1', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(3), p. 629–634. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.10.037.
- [*] Pan; Cao; Yang; Ding; Fan; Xiong; Hamrick; Isales and Shi (2014) 'Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in bone acquisition', *Journal of Biological Chemistry*, 289(28), p. 19373–19382. doi: 10.1074/jbc.M113.535237.
- [*] Park; Lapteva; Seethammagari; Slawin and Spencer (2006) 'An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy', *Nature Biotechnology*, 24(12), p. 1581–1590. doi: 10.1038/nbt1262.
- [*] Perez; Mahaira; Demirtzoglou; Sotiropoulou; Ioannidis; Iliopoulou; Gritzapis; Sotiriadou; Baxevanis and Papamichail (2005) 'A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival', *Blood*, 106(1), p. 158–166. doi: 10.1182/blood-2004-08-3232.
- [*] Perié and Naik (2015) 'Toward defining a "lineage" - The case for dendritic cells', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 41, p. 3. doi: 10.1016/j.semcd.2015.02.004.
- [*] Pigni; Ashok and Acha-Orbea (2016) 'Derivation and utilization of functional CD8+ dendritic cell lines', *Methods in Molecular Biology*, 1423, p. 39–49. doi: 10.1007/978-1-4939-3606-9_3.
- [*] Pigni; Ashok; Stevanin and Acha-Orbea (2018) 'Establishment and Characterization of a Functionally Competent Type 2 Conventional Dendritic Cell Line', *Frontiers in immunology*, 9(August), p. 1912. doi: 10.3389/fimmu.2018.01912.
- [*] Prakriya and Lewis (2006) 'Regulation of CRAC channel activity by recruitment of silent channels to a high open-probability gating mode', *Journal of General Physiology*, 128(3), p. 373–386. doi: 10.1085/jgp.200609588.
- [*] Del Prete; Shao; Mitola; Santoro; Sozzani and Haribabu (2007) 'Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function', *Blood*, 9(1), p. 509–520. doi: 10.1182/blood-2006-02-003665.The.
- [*] Del Prete; Vermi; Dander; Otero; Barberis; Luini; Bernasconi; Sironi; Santoro; Garlanda; Facchetti; Wymann; Vecchi; Hirsch; Mantovani and Sozzani (2004) 'Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3K γ -deficient mice', *EMBO Journal*, 23(17), p. 3505–3515. doi: 10.1038/sj.emboj.7600361.
- [*] Prole and Taylor (2019) 'Structure and function of ip3 receptors', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(4), p. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a035063.
- [*] Prudent; Popgeorgiev; Gadet; Deygas; Rimokh and Gillet (2016) 'Mitochondrial Ca²⁺ uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(October), p. 1–13. doi: 10.1038/srep36570.
- [*] Randolph; Ochando and Partida-Sánchez (2008) 'Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors', *Annual Review of Immunology*, 26(1), p. 293–316. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254.
- [*] Rashmi; Colussi; Ng; Wu; Kidwai and Pearce (2017) 'Glucocorticoid-induced leucine zipper protein regulates sodium and potassium balance in the distal nephron', *Kidney International*. Elsevier Inc, 91(5), p. 1159–1177. doi: 10.1016/j.kint.2016.10.038.
- [*] Reizis (2019) 'Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function', *Immunity*, 50(1), p. 37–50. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.027.
- [*] Ricci; Ronchetti; Pericolini; Gabrielli; Cari; Gentili; Roselletti; Migliorati; Vecchiarelli and Riccardi (2017) 'Role of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene in dexamethasone-

induced inhibition of mouse neutrophil migration via control of annexin A1 expression', *FASEB Journal*, 31(7), p. 3054–3065. doi: 10.1096/fj.201601315R.

[*] Riol-Blanco; Sánchez-Sánchez; Torres; Tejedor; Narumiya; Corbí; Sánchez-Mateos and Rodríguez-Fernández (2005) 'The Chemokine Receptor CCR7 Activates in Dendritic Cells Two Signaling Modules That Independently Regulate Chemotaxis and Migratory Speed', *The Journal of Immunology*, 174(7), p. 4070–4080. doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4070.

[*] Robert-Nicoud; Flahaut; Elalouf; Nicod; Salinas; Bens; Doucet; Wincker; Artiguenave; Horisberger; Vandewalle; Rossier and Firsov (2001) 'Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: Effects of aldosterone and vasopressin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), p. 2712–2716. doi: 10.1073/pnas.051603198.

[*] Rodrigues; Alberti-Servera; Eremin; Grajales-Reyes; Ivanek and Tussiwand (2018) 'Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells', *Nature Immunology*. Springer US, 19(7), p. 711–722. doi: 10.1038/s41590-018-0136-9.

[*] Rodríguez-Fernández and Criado-García (2020) 'The Chemokine Receptor CCR7 Uses Distinct Signaling Modules With Biased Functionality to Regulate Dendritic Cells', *Frontiers in Immunology*, 11(April), p. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2020.00528.

[*] Rong; Bultynck; Aromolaran; Zhong; Parys; De Smedt; Mignery; Roderick; Bootman and Distelhorst (2009) 'The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), p. 14397–14402. doi: 10.1073/pnas.0907555106.

[*] Rotty; Brighton; Craig; Asokan; Cheng; Ting and Bear (2017) 'Arp2/3 Complex Is Required for Macrophage Integrin Functions but Is Dispensable for FcR Phagocytosis and In Vivo Motility', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 42(5), p. 498–513.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2017.08.003.

[*] Sadik and Luster (2012) 'Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation', *Journal of Leukocyte Biology*, 91(2), p. 207–215. doi: 10.1189/jlb.0811402.

[*] Sáez; Sáez; Lennon-Duménil and Vargas (2018) 'Role of calcium permeable channels in dendritic cell migration', *Current Opinion in Immunology*, 52, p. 74–80. doi: 10.1016/j.coi.2018.04.005.

[*] Saéz; Vargas; Shoji; Harcha; Lennon-Duméni and Saéz (2017) 'ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X7 receptors', *Science Signaling*, 10(506). doi: 10.1126/scisignal.aah7107.

[*] Sakata; Taniguchi; Yasuda; Adachi-Morishima; Hamazaki; Nakayama; Miki; Minato and Narumiya (2007) 'Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1', *Journal of Experimental Medicine*, 204(9), p. 2031–2038. doi: 10.1084/jem.20062647.

[*] Salmon; Idoyaga; Rahman; Leboeuf; Remark; Jordan; Casanova-Acebes; Khudoynazarova; Agudo; Tung; Chakarov; Rivera; Hogstad; Bosenberg; Hashimoto; Gnjatic; Bhardwaj; Palucka; Brown; Brody; Ginhoux and Merad (2016) 'Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition', *Immunity*, 44(4), p. 924–938. doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.012.

[*] Sanchez-Sanchez; Riol-Blanco; de la Rosa; Puig-Kroger; Garcia-Bordas; Martin; Longo; Cuadrado; Cabanas; L. Corbí; Sanchez-Mateos; And and Rodríguez-Fernández (2004)

'Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells', *Blood*, 104(3), p. 619–625. doi: 10.1182/blood-2003-11-3943.

[*] Sancho; Joffre; Keller; Rogers; Martínez; Hernanz-Falcón; Rosewell and Sousa (2009) 'Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity', *Nature*, 458(7240), p. 899–903. doi: 10.1038/nature07750.

[*] Sathe; Pooley; Vremec; Mintern; Jin; Wu; Kwak; Villadangos and Shortman (2011) 'The Acquisition of Antigen Cross-Presentation Function by Newly Formed Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 186(9), p. 5184–5192. doi: 10.4049/jimmunol.1002683.

[*] Sathe; Vremec; Wu; Corcoran and Shortman (2013) 'Convergent differentiation: Myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells', *Blood*, 121(1), p. 11–19. doi: 10.1182/blood-2012-02-413336.

[*] Satpathy; KC; Albring; Edelson; Kretzer; Bhattacharya; Murphy and Murphy (2012) 'Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages', *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), p. 1135–1152. doi: 10.1084/jem.20120030.

[*] Schlam and Canton (2017) 'Every day I'm rufflin': Calcium sensing and actin dynamics in the growth factor-independent membrane ruffling of professional phagocytes', *Small GTPases*. Taylor & Francis, 8(2), p. 65–70. doi: 10.1080/21541248.2016.1197873.

[*] Schlecht; Garcia; Escriou; Freitas; Leclerc and Dadaglio (2004) 'Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8_T-cell responses in vivo after viral stimulation', *Blood*, 104(6), p. 1808–1815. doi: 10.1182/blood-2004-02-0426.

[*] Schlitzer; McGovern; Teo; Zelante; Atarashi; Low; Ho; See; Shin; Wasan; Hoeffel; Malleret; Heiseke; Chew; Jardine; Purvis; Hilkens; Tam; Poidinger; Stanley; Krug; Renia; Sivasankar; Ng; Collin; Ricciardi-Castagnoli; Honda; Haniffa and Ginhoux (2013) 'IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b⁺ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses', *Immunity*. Elsevier Inc., 38(5), p. 970–983. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.011.

[*] Schlitzer; Sivakamasundari; Chen; Sumatoh; Schreuder; Lum; Malleret; Zhang; Larbi; Zolezzi; Renia; Poidinger; Naik; Newell; Robson and Ginhoux (2015) 'Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 16(7), p. 718–728. doi: 10.1038/ni.3200.

[*] Schmid; Bhandaru; Nurbaeva; Yang; Szteyn; Russo; Leibrock; Tyan; Pearce; Shumilina and Lang (2012) 'SGK3 regulates Ca²⁺ entry and migration of dendritic cells', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(6), p. 1423–1435. doi: 10.1159/000343330.

[*] Schmitt; Sell; Koch; Seefried; Sonnewald; Daniel; Winkler and Nitschke (2016) 'Siglec-H protects from virus-triggered severe systemic autoimmunity', *Journal of Experimental Medicine*, 213(8), p. 1627–1644. doi: 10.1084/jem.20160189.

[*] Schumann; Lämmermann; Bruckner; Legler; Polleux; Spatz; Schuler; Förster; Lutz; Sorokin and Sixt (2010) 'Immobilized Chemokine Fields and Soluble Chemokine Gradients Cooperatively Shape Migration Patterns of Dendritic Cells', *Immunity*, 32(5), p. 703–713. doi: 10.1016/j.immuni.2010.04.017.

[*] Schwartz; Frimurer; Holst; Rosenkilde and Elling (2006) 'Molecular Mechanism of 7Tm Receptor Activation—a Global Toggle Switch Model', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46(1), p. 481–519. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141218.

[*] Schwarz; Bierbaum; Vaahtomeri; Hauschild; Brown; de Vries; Leithner; Reversat; Merrin; Tarrant; Bollenbach and Sixt (2017) 'Dendritic Cells Interpret Haptotactic Chemokine

- Gradients in a Manner Governed by Signal-to-Noise Ratio and Dependent on GRK6', *Current Biology*. Elsevier Ltd., 27(9), p. 1314–1325. doi: 10.1016/j.cub.2017.04.004.
- [*] See; Dutertre; Chen; Günther; McGovern; Irac; Gunawan; Beyer; Händler; Duan; Bin Sumatoh; Ruffin; Jouve; Gea-Mallorquí; Hennekam; Lim; Yip; Wen; Malleret; Low; Shadan; Fen; Tay; Lum; Zolezzi; Larbi; Poidinger; Chan; Chen; Rénia; Haniffa; Benaroch; Schlitzer; Schultze; Newell and Ginhoux (2017) 'Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques', *Science*, 356(6342). doi: 10.1126/science.aag3009.
- [*] Segura; Albiston; Wicks; Chai and Villadangos (2009) 'Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), p. 20377–20381. doi: 10.1073/pnas.0910295106.
- [*] Segura; Durand and Amigorena (2013) 'Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells', *Journal of Experimental Medicine*, 210(5), p. 1035–1047. doi: 10.1084/jem.20121103.
- [*] Segura; Touzot; Bohineust; Cappuccio; Chiochia; Hosmalin; Dalod; Soumelis and Amigorena (2013) 'Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation', *Immunity*. Elsevier Inc., 38(2), p. 336–348. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.018.
- [*] Segura; Valladeau-Guilemond; Donnadieu; Sastre-Garau; Soumelis and Amigorena (2012) 'Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes', *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), p. 653–660. doi: 10.1084/jem.20111457.
- [*] Sevilla and Pérez (2019) 'Glucocorticoids and Glucocorticoid-Induced-Leucine-Zipper (GILZ) in Psoriasis', *Frontiers in Immunology*, 10(September), p. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2019.02220.
- [*] Shi; Partida-Sánchez; Misra; Tighe; Borchers; Lee; Simon and Lund (2007) 'Identification of an alternative Gαq-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes', *Journal of Experimental Medicine*, 204(11), p. 2705–2718. doi: 10.1084/jem.20071267.
- [*] Shklovskaya; O'Sullivan; Ng; Roediger; Thomas; Weninger and Fazekas De St. Groth (2011) 'Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), p. 18049–18054. doi: 10.1073/pnas.1110076108.
- [*] Shortman; Sathe; Vremec; Naik and O'Keeffe (2013) *Plasmacytoid Dendritic Cell Development*. 1st edn, *Advances in Immunology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00004-1.
- [*] Shute (2011) *Glycosaminoglycan and Chemokine/Growth Factor Interactions*, *Handbook of Experimental Pharmacology*. Edited by R. Lever et al. doi: 10.1007/978-3-642-23056-1.
- [*] Shuttleworth; Thompson and Mignen (2007) 'STIM1 and the noncapacitative ARC channels', *Cell Calcium*, 42(2), p. 183–191. doi: 10.1016/j.ceca.2007.01.012.
- [*] Sichien; Scott; Martens; Vanderkerken; Van Gassen; Plantinga; Joeris; De Prijck; Vanhoutte; Vanheerswynghels; Van Isterdael; Toussaint; Madeira; Vergote; Agace; Clausen; Hammad; Dalod; Saey; Lambrecht and Guilliams (2016) 'IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively', *Immunity*, 45(3), p. 626–640. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.013.
- [*] Siedlar; Rudzki; Strach; Trzyna; Pituch-Noworolska; Błaut-Szlósarczyk; Bukowska-Strakova; Lenart; Grodzicki and Zembala (2008) 'Familial occurrence of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis (WHIM) syndrome', *Archivum Immunologiae et Therapiae*

Experimentalis, 56(6), p. 419–425. doi: 10.1007/s00005-008-0046-x.

[*] Smith; Pietrancosta; Davidson; Dutrieux; Chauveau; Cutolo; Dy; Scott-Algara; Manoury; Zirafi; McCort-Tranchepain; Durroux; Bachelier; Schwartz; Münch; Wack; Nisole and Herbeuval (2017) 'Natural amines inhibit activation of human plasmacytoid dendritic cells through CXCR4 engagement', *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/ncomms14253.

[*] Smyth; Hwang; Tomita; DeHaven; Mercer and Putney (2010) 'Activation and regulation of store-operated calcium entry', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(10), p. 2337–2349. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01168.x.

[*] Soboloff; Spassova; Hewavitharana; He; Xu; Johnstone; Dziadek and Gill (2006) 'STIM2 Is an Inhibitor of STIM1-Mediated Store-Operated Ca²⁺ Entry', *Current Biology*, 16(14), p. 1465–1470. doi: 10.1016/j.cub.2006.05.051.

[*] Solanes; Heuze; Maurin; Bretou; Lautenschlaeger; Maiuri; Terriac; Thoulouze; Launay; Piel; Vargas and Lennon-Dumenil (2015) 'Space exploration by dendritic cells requires maintenance of myosin II activity by IP3 receptor 1', *The EMBO Journal*, 34(6), p. 798–810. doi: 10.15252/embj.201489056.

[*] Soundararajan; Melters; Shih; Wang and Pearce (2009) 'Epithelial sodium channel regulated by differential composition of a signaling complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19), p. 7804–7809. doi: 10.1073/pnas.0809892106.

[*] Soundararajan; Wang; Melters and Pearce (2007) 'Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms', *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), p. 36303–36313. doi: 10.1074/jbc.M707287200.

[*] Soundararajan; Wang; Melters and Pearce (2010) 'Glucocorticoid-induced leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization', *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), p. 39905–39913. doi: 10.1074/jbc.M110.161133.

[*] Soundararajan; Zhang; Wang; Vandewalle and Pearce (2005) 'A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport', *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), p. 39970–39981. doi: 10.1074/jbc.M508658200.

[*] Srikanth; Woo; Wu; El-Sherbiny; Leung; Chupradit; Rice; Seo; Calmettes; Ramakrishna; Cantin; An; Sun; Wu; Jung; Savic and Gwack (2019) 'The Ca²⁺ sensor STIM1 regulates the type I interferon response by retaining the signaling adaptor STING at the endoplasmic reticulum', *Nature Immunology*. Springer US, 20(2), p. 152–162. doi: 10.1038/s41590-018-0287-8.

[*] Srinivasan and Janardhanam (2011) 'Novel p65 binding glucocorticoid-induced leucine zipper peptide suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis', *Journal of Biological Chemistry*, 286(52), p. 44799–44810. doi: 10.1074/jbc.M111.279257.

[*] Stephens and Handel (2013) *Chemokine receptor oligomerization and allostery*, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. doi: 10.1016/B978-0-12-394587-7.00009-9.

[*] Strandt; Pinheiro; Kaplan; Wirth; Gratz; Hammerl; Thalhamer and Stoecklinger (2017) 'Neoantigen Expression in Steady-State Langerhans Cells Induces CTL Tolerance', *The Journal of Immunology*, 199(5), p. 1626–1634. doi: 10.4049/jimmunol.1602098.

[*] Strobl; Krump and Borek (2019) 'Micro-environmental signals directing human epidermal Langerhans cell differentiation', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 86, p. 36–43. doi: 10.1016/j.semcd.2018.02.016.

[*] Stutte; Quast; Gerbitzki; Savinko; Novak; Reifenberger; Homey; Kolanus; Alenius and

- Förster (2010) 'Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), p. 8736–8741. doi: 10.1073/pnas.0906126107.
- [*] Sumoza-Toledo; Lange; Cortado; Bhagat; Mori; Fleig; Penner and Partida-Sanchez (2011) 'Dendritic cell maturation and chemotaxis is regulated by TRPM2-mediated lysosomal Ca²⁺ release', *The FASEB Journal*, 25(10), p. 3529–3542. doi: 10.1096/fj.10-178483.
- [*] Sun; Guo and Fässler (2016) 'Integrin-mediated mechanotransduction'. doi: 10.1083/jcb.201609037 JCB.
- [*] Swiecki and Colonna (2015) 'The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(8), p. 471–485. doi: 10.1038/nri3865.
- [*] Tal; Lim; Gurevich; Milo; Shipony; Ng; Angeli and Shakhar (2011) 'DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling', *Journal of Experimental Medicine*, 208(10), p. 2141–2153. doi: 10.1084/jem.20102392.
- [*] Tamoutounour; Guilliams; MontananaSanchis; Liu; Terhorst; Malosse; Pollet; Ardouin; Luche; Sanchez; Dalod; Malissen and Henri (2013) 'Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin', *Immunity*, 39(5), p. 925–938. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.004.
- [*] Tamura; Tailor; Yamaoka; Kong; Tsujimura; O'Shea; Singh and Ozato (2005) 'IFN Regulatory Factor-4 and -8 Govern Dendritic Cell Subset Development and Their Functional Diversity', *The Journal of Immunology*, 174(5), p. 2573–2581. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2573.
- [*] Tassone; Moratto; Vermi; De Francesco; Notarangelo; Porta; Lougaris; Facchetti; Plebani and Badolato (2010) 'Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients', *Blood*, 116(23), p. 4870–4873. doi: 10.1182/blood-2010-03-272096.
- [*] Tel; Schreibelt; Sittig; Mathan; Buschow; Cruz; Lambeck; Figdor and De Vries (2013) 'Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets', *Blood*, 121(3), p. 459–467. doi: 10.1182/blood-2012-06-435644.
- [*] Thelen and Stein (2008) 'How chemokines invite leukocytes to dance', *Nature Immunology*, 9(9), p. 953–959. doi: 10.1038/ni.f.207.
- [*] Thiam; Vargas; Carpi; Crespo; Raab; Terriac; King; Jacobelli; Alberts; Stradal; Lennon-Dumenil and Piel (2016) 'Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 7, p. 1–14. doi: 10.1038/ncomms10997.
- [*] Thion; Low; Silvin; Chen; Grisel; Schulte-Schrepping; Blecher; Ulas; Squarzoni; Hoeffel; Culpier; Siopi; David; Scholz; Shihui; Lum; Amoyo; Larbi; Poidinger; Buttgereit; Lledo; Greter; Chan; Amit; Beyer; Schultze; Schlitzer; Pettersson; Ginhoux and Garel (2018) 'Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner', *Cell*. Elsevier Inc., 172(3), p. 500-516.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.042.
- [*] Tiberio; Del Prete; Schioppa; Sozio; Bosisio and Sozzani (2018) 'Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration review-article', *Cellular and Molecular Immunology*. Springer US, 15(4). doi: 10.1038/s41423-018-0005-3.
- [*] Tomasello; Naciri; Chelbi; Bessou; Fries; Gressier; Abbas; Pollet; Pierre; Lawrence; Vu Manh and Dalod (2018) 'Molecular dissection of plasmacytoid dendritic cell activation in vivo

during a viral infection', *The EMBO Journal*, 37(19), p. 1–19. doi: 10.15252/embj.201798836.

[*] Tomura and Kabashima (2008) 'Analysis of cell movement between skin and other anatomical sites in vivo using photoconvertible fluorescent protein "kaede"-transgenic mice', *Methods in Molecular Biology*, 961(31), p. 279–286. doi: 10.1007/978-1-62703-227-8_18.

[*] Tsing-Lee; Paul; Christel; Mélanie; Bohec; Sylvain; Benoit; Sebastian and Elodie (2019) 'Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 86, p. 44–49. doi: 10.1016/j.semcd.2018.02.018.

[*] Turcotte; Gauthier; Tuite; Mullick; Malo and Gros (2005) 'A mutation in the Icsbp1 gene causes susceptibility to infection and a chronic myeloid leukemia - Like syndrome in BXH-2 mice', *Journal of Experimental Medicine*, 201(6), p. 881–890. doi: 10.1084/jem.20042170.

[*] Tussiwand and Gautier (2015) 'Transcriptional regulation of mononuclear phagocyte development', *Frontiers in Immunology*, 6(OCT), p. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2015.00533.

[*] Ulvmar; Werth; Braun; Kelay; Hub; Eller; Chan; Lucas; Novitzky-Basso; Nakamura; Rüllicke; Nibbs; Worbs; Förster and Rot (2014) 'The atypical chemokine receptor CCRL1 shapes functional CCL21 gradients in lymph nodes', *Nature Immunology*, 15(7), p. 623–630. doi: 10.1038/ni.2889.

[*] Umemoto; Otani; Ikeno; Verjan Garcia; Hayasaka; Bai; Jang; Tanaka; Nagasawa; Ueda and Miyasaka (2012) 'Constitutive Plasmacytoid Dendritic Cell Migration to the Splenic White Pulp Is Cooperatively Regulated by CCR7- and CXCR4-Mediated Signaling', *The Journal of Immunology*, 189(1), p. 191–199. doi: 10.4049/jimmunol.1200802.

[*] Vaahtomeri; Brown; Hauschild; De Vries; Leithner; Mehling; Kaufmann and Sixt (2017) 'Locally Triggered Release of the Chemokine CCL21 Promotes Dendritic Cell Transmigration across Lymphatic Endothelia', *Cell Reports*. Elsevier, 19(5), p. 902–909. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.027.

[*] Vaeth; Yang; Yamashita; Zee; Eckstein; Knosp; Kaufmann; Jani; Lacruz; Flockerzi; Kacs Kovics; Prakriya and Feske (2017) 'ORAI2 modulates store-operated calcium entry and T cell-mediated immunity', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, p. 1–17. doi: 10.1038/ncomms14714.

[*] Vaeth; Zee; Concepcion; Maus; Shaw; Portal-Celhay; Zahra; Kozhaya; Weidinger; Philips; Unutmaz and Feske (2015) 'Ca²⁺ Signaling but Not Store-Operated Ca²⁺ Entry Is Required for the Function of Macrophages and Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 195(3), p. 1202–1217. doi: 10.4049/jimmunol.1403013.

[*] Vargas; Chabaud; Thiam; Lankar; Piel and Lennon-Dumenil (2016) 'Study of dendritic cell migration using micro-fabrication', *Journal of Immunological Methods*. Elsevier B.V., 432, p. 30–34. doi: 10.1016/j.jim.2015.12.005.

[*] Vargas; Maiuri; Bretou; Saéz; Pierobon; Maurin; Chabaud; Lankar; Obino; Terriac; Raab; Thiam; Brouck; Kitchen-Goosen; Alberts; Sunareni; Xia; Li; Voituriez; Piel and Lennon-Duménil (2016) 'Innate control of actin nucleation determines two distinct migration behaviours in dendritic cells', *Nature Cell Biology*, 18(1), p. 43–53. doi: 10.1038/ncb3284.

[*] Vétillard and Schlecht-Louf (2018) 'Glucocorticoid-induced leucine zipper: Fine-tuning of dendritic cells function', *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), p. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2018.01232.

[*] Vicente-Manzanares; Ma; Adelstein and Horwitz (2009) 'Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10(11), p. 778–790. doi: 10.1038/nrm2786.

- [*] Villani; Satija; Reynolds; Sarkizova; Shekhar; Fletcher; Griesbeck; Butler; Zheng; Lazo; Jardine; Dixon; Stephenson; Nilsson; Grundberg; McDonald; Filby; Li; De Jager; Rozenblatt-Rosen; Lane; Haniffa; Regev and Hacohen (2017) 'Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors', *Science*, 356(6335). doi: 10.1126/science.aah4573.
- [*] Villar and Segura (2020) 'The More, the Merrier: DC3s Join the Human Dendritic Cell Family', *Immunity*. Elsevier Inc., 53(2), p. 233–235. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.014.
- [*] van Vliet; Giordano; Gerlo; Segura; Van Eygen; Molenberghs; Rocha; Houcine; Derua; Verfaillie; Vangindertael; De Keersmaecker; Waelkens; Tavernier; Hofkens; Annaert; Carmeliet; Samali; Mizuno and Agostinis (2017) 'The ER Stress Sensor PERK Coordinates ER-Plasma Membrane Contact Site Formation through Interaction with Filamin-A and F-Actin Remodeling', *Molecular Cell*. Elsevier, 65(5), p. 885–899.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.01.020.
- [*] Waskow; Liu; Darrasse-Jèze; Guernonprez; Ginhoux; Merad; Shengelia; Yao and Nussenzweig (2008) 'The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues', *Nature Immunology*, 9(6), p. 676–683. doi: 10.1038/ni.1615.
- [*] Watts; West and Zaru (2010) 'TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 22(1), p. 124–130. doi: 10.1016/j.coi.2009.12.005.
- [*] Weber; Hauschild; Schwarz; Moussion; De Vries; Legler; Luther; Bollenbach and Sixt (2013) 'Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients', *Science*, 339(6117), p. 328–332. doi: 10.1126/science.1228456.
- [*] Webster Marketon; Corry and Teng (2014) 'The respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural proteins mediate RSV suppression of glucocorticoid receptor transactivation', *Virology*. Elsevier, 449, p. 62–69. doi: 10.1016/j.virol.2013.11.014.
- [*] Wei; Wang; Zheng and Cheng (2012) 'Calcium gradients underlying cell migration', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 24(2), p. 254–261. doi: 10.1016/j.ceb.2011.12.002.
- [*] West, MA; RP; SP; HG; Zaru and HG (2004) 'Enhanced dendritic cell antigen capture via Toll-like receptor-induced actin remodeling', *Science*, 305(August), p. 1153–1157. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1099153>.
- [*] West; Wallin; Matthews; Svensson; Zaru; Ljunggren; Prescott and Watts (2004) 'Enhanced dendritic cell antigen capture via Toll-like receptor-induced actin remodeling', *Science*, 305(5687), p. 1153–1157. doi: 10.1126/science.1099153.
- [*] Wilck; Balogh; Markó; Bartolomeus and Müller (2019) 'The role of sodium in modulating immune cell function', *Nature Reviews Nephrology*, 15(9), p. 546–558. doi: 10.1038/s41581-019-0167-y.
- [*] De Witte; Nabatov; Pion; Fluitsma; De Jong; De Gruijl; Piguet; Van Kooyk and Geijtenbeek (2007) 'Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells', *Nature Medicine*, 13(3), p. 367–371. doi: 10.1038/nm1541.
- [*] Woodruff; Heesters; Herndon; Groom; Thomas; Luster; Turley and Carroll (2014) 'Trans-nodal migration of resident dendritic cells into medullary interfollicular regions initiates immunity to influenza vaccine', *Journal of Experimental Medicine*, 211(8), p. 1611–1621. doi: 10.1084/jem.20132327.
- [*] Worbs; Hammerschmidt and Förster (2017) 'Dendritic cell migration in health and disease', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 17(1), p. 30–48. doi: 10.1038/nri.2016.116.

- [*] Wu (2005) 'Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis', *Cell Research*, 15(1), p. 52–56. doi: 10.1038/sj.cr.7290265.
- [*] Wu; Buchanan; Luik and Lewis (2006) 'Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane', *Journal of Cell Biology*, 174(6), p. 803–813. doi: 10.1083/jcb.200604014.
- [*] Yan; Almilaji; Schmid; Elvira; Shimshek; Van Der Putten; Wagner; Shumilina and Lang (2015) 'Leucine-rich repeat kinase 2-sensitive Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity in dendritic cells', *FASEB Journal*, 29(5), p. 1701–1710. doi: 10.1096/fj.14-264028.
- [*] Yan; Zhao; Gao; Liu; Zhao; Wei and Gao (2019) 'Leucine-rich repeat kinase 2 regulates mouse dendritic cell migration by ORAI2', *The FASEB Journal*, 33(9), p. 9775–9784. doi: 10.1096/fj.201802550r.
- [*] Yang; Morimoto; Rai; Chiga; Sohara; Ohno; Uchida; Lin; Moriguchi; Shibuya; Kondo; Sasaki and Uchida (2007) 'Molecular Pathogenesis of Pseudohypoaldosteronism Type II: Generation and Analysis of a Wnk4D561A/+ Knockin Mouse Model', *Cell Metabolism*, 5(5), p. 331–344. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.009.
- [*] Yang; Nurbaeva; Schmid; Russo; Almilaji; Szteyn; Yan; Faggio; Shumilina and Lang (2014) 'Akt2-and ETS1-dependent IP3 receptor 2 expression in dendritic cell migration', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(1), p. 222–236. doi: 10.1159/000356664.
- [*] Yang; Xia; Chen; Zhang; Martin; Li; Lin; Chen; Calmette; Lu; Fu; Yang; Pan; Yu; He; Morand; Schlecht-Louf; Krzysiek; Zitvogel; Kang; Zhang; Leader; Zhou; Lanfumey; Shi; Kroemer and Ma (2019) 'Stress–glucocorticoid–TSC22D3 axis compromises therapy-induced antitumor immunity', *Nature Medicine*. Springer US, 25(9), p. 1428–1441. doi: 10.1038/s41591-019-0566-4.
- [*] Ye; Gaugler; Mohty and Malard (2020) 'Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases', *Clinical and Translational Immunology*, 9(5), p. 1–19. doi: 10.1002/cti2.1139.
- [*] Yen and Lewis (2019) 'Numbers count: How STIM and Orai stoichiometry affect store-operated calcium entry', *Cell Calcium*. Elsevier, 79(February), p. 35–43. doi: 10.1016/j.ceca.2019.02.002.
- [*] Yin; Yu; Jin; Li; Guo; Shi; Yin; Xu; Wang; Liu; Wang and Zhang (2017) 'Human Blood CD1c + Dendritic Cells Encompass CD5 high and CD5 low Subsets That Differ Significantly in Phenotype, Gene Expression, and Functions', *The Journal of Immunology*, 198(4), p. 1553–1564. doi: 10.4049/jimmunol.1600193.
- [*] Yoo; Kim; Campo; Nance; King; Maouyo and Welling (2003) 'Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A', *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), p. 23066–23075. doi: 10.1074/jbc.M212301200.
- [*] Yosef; Shalek; Gaublomme; Jin; Lee; Awasthi; Wu; Karwacz; Xiao; Jorgolli; Gennert; Satija; Shakya; Lu; Trombetta; Pillai; Ratcliffe; Coleman; Bix; Tantin; Park; Kuchroo and Regev (2013) 'Dynamic regulatory network controlling TH 17 cell differentiation', *Nature*. Nature Publishing Group, 496(7446), p. 461–468. doi: 10.1038/nature11981.
- [*] Zaru; Mollahan and Watts (2008) '3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 deficiency perturbs toll-like receptor signaling events and actin cytoskeleton dynamics in dendritic cells', *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), p. 929–939. doi: 10.1074/jbc.M708069200.
- [*] Zheng; Stathopoulos; Li and Ikura (2008) 'Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2', *Biochemical and*

Biophysical Research Communications, 369(1), p. 240–246. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.129.
[*] Zhou; Ho; Schlitzer; Tang; Wong; Wong; Chua; Angeli; Mortellaro; Ginhoux and Kemeny (2014) 'GM-CSF–Licensed CD11b + Lung Dendritic Cells Orchestrate Th2 Immunity to *Blomia tropicalis*', *The Journal of Immunology*, 193(2), p. 496–509. doi: 10.4049/jimmunol.1303138.
[*] Zimmer; Bouley; Le Mignon; Pliquet; Horiot; Turfkruyer; Baron-Bodo; Horak; Nony; Louise; Moussu; Mascarell and Moingeon (2012) 'A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), p. 1020–1030. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.014.

V. ANNEXE



Tailor the adaptive immune response with
Vaccine Adjuvants



Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Protein Controls Macropinocytosis in Dendritic Cells

This information is current as of March 1, 2017.

Joseph Calmette, Matthieu Bertrand, Mathias Vétillard, Mehdi Ellouze, Shaun Flint, Valérie Nicolas, Armelle Biola-Vidamment, Marc Pallardy, Eric Morand, Françoise Bachelerie, Véronique Godot and Géraldine Schlecht-Louf

J Immunol 2016; 197:4247-4256; Prepublished online 28 October 2016;

doi: 10.4049/jimmunol.1600561

<http://www.jimmunol.org/content/197/11/4247>

-
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2016/10/27/jimmunol.1600561.DCSupplemental>
- References** This article **cites 58 articles**, 32 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/197/11/4247.full#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright © 2016 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Protein Controls Macropinocytosis in Dendritic Cells

Joseph Calmette,* Matthieu Bertrand,*¹ Mathias Vétillard,*¹ Mehdi Ellouze,[†] Shaun Flint,[‡] Valérie Nicolas,[§] Armelle Biola-Vidamment,[¶] Marc Pallardy,[¶] Eric Morand,^{||} Françoise Bachelier,* Véronique Godot,[†] and Géraldine Schlecht-Louf*

Ag sampling is a key process in dendritic cell (DC) biology. DCs use constitutive macropinocytosis, receptor-mediated endocytosis, and phagocytosis to capture exogenous Ags for presentation to T cells. We investigated the mechanisms that regulate Ag uptake by DCs in the steady-state and after a short-term LPS exposure *in vitro* and *in vivo*. We show that the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ), already known to regulate effector versus regulatory T cell activation by DCs, selectively limits macropinocytosis, but not receptor-mediated phagocytosis, in immature and recently activated DCs. *In vivo*, the GILZ-mediated inhibition of Ag uptake is restricted to the CD8 α^+ DC subset, which expresses the highest GILZ level among splenic DC subsets. In recently activated DCs, we further establish that GILZ limits p38 MAPK phosphorylation, providing a possible mechanism for GILZ-mediated macropinocytosis control. Finally, our results demonstrate that the modulation of Ag uptake by GILZ does not result in altered Ag presentation to CD4 T cells but impacts the efficiency of cross-presentation to CD8 T cells. Altogether, our results identify GILZ as an endogenous inhibitor of macropinocytosis in DCs, the action of which contributes to the fine-tuning of Ag cross-presentation. *The Journal of Immunology*, 2016, 197: 4247–4256.

Dendritic cells (DCs) are immune sentinels that regulate immunity and tolerance (1–3). Within tissues, DCs collect Ags and sense the potential danger signals. They then traffic to the T cell zone of secondary lymphoid organs where they present antigenic peptides to T cells to maintain tolerance or to orchestrate adaptive-immune responses. Three main DC subsets, plasmacytoid DCs (pDCs) and CD8 α^+ and CD8 α^- conventional DCs (cDCs), which were identified according to their ontogeny (2), cooperate to initiate appropriate immune responses (4). Although these DC subsets share a common Ag-presenting function, their capacity for Ag capture, danger detection, migration, Ag processing, and T cell (cross)-priming are distinct and differentially regulated, in support of their functional specialization. One hallmark of CD8 α^+ cDCs is their constitutive capacity to cross-present Ag to CD8 T cells, which was attributed to a low degradative potential in their endocytic pathway and dedicated phagosome-to-cytosol transport machinery (5).

Ag capture is critical to DC function. DCs use three main mechanisms to acquire Ags: macropinocytosis, receptor-mediated endocytosis, and phagocytosis. Macropinocytosis is a nonselective actin-dependent process that is characterized by the formation of endocytic vesicles

ranging from 0.2 to 5 μ m in diameter and allows the internalization of large quantities of fluid-phase solute. It is constitutively active in DCs and is regulated by the small GTPases Rac1 and Cdc42 (6–9). Receptor-mediated endocytosis by DCs depends upon Ag binding to receptors that are internalized through clathrin-dependent or -independent mechanisms (10). Finally, DCs also take up large particles by actin-dependent phagocytosis, either nonspecifically or after receptor engagement. These endocytic processes are differentially regulated upon DC maturation. Macropinocytosis increases transiently in the first 2 h following DC activation by TLR engagement *in vitro* through a mechanism that depends upon the activation of MAPK-activated kinase Rsk (p90 ribosomal S6 kinase) by Erk1/2 and p38 MAPKs (11). At later time points following *in vitro* activation, macropinocytosis is dramatically reduced in DCs (12–14) as a result of a reduction in Cdc42 Rho GTPase activity (12). *In vivo*, macropinocytosis was reported to remain active several hours after DC activation, pointing to differences between *in vitro* and *in vivo* regulation (15), but no study has investigated macropinocytosis in recently activated DCs. Although nonspecific phagocytosis is reduced after DC maturation (12), receptor-dependent endocytosis and phagocytosis remain essentially unaltered upon DC activation,

*UMR996-Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Clamart 92140, France; [†]UMR955, Team 16, Institut de Recherche Vaccinal, INSERM, Université Paris Est Créteil, Créteil 94010, France; [‡]Addenbrooke's Hospital, Cambridge CB2 0QQ, United Kingdom; [§]Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, SFR-UMS, Chatenay Malabry 92296, France; [¶]UMR996-Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Chatenay Malabry 92296, France; and ^{||}Southern Clinical School, Monash University Faculty of Medicine, Nursing, and Health Sciences, Clayton, Victoria 3168, Australia

¹M.B. and M.V. contributed equally to this work.

ORCID: 0000-0002-1359-8756 (M.E.); 0000-0002-5282-9334 (S.F.); 0000-0002-9507-3338 (E.M.).

Received for publication March 30, 2016. Accepted for publication September 27, 2016.

This work was supported by INSERM and by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR 09-GENO-030-01), the Université Paris-Sud (AAP Attractivité

2012), and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. J.C. was supported by a doctoral fellowship from the Ecole Doctorale Innovation Thérapeutique (ED 569). M.E. was supported by a doctoral fellowship from INSERM. M.B. received financial support from the Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Géraldine Schlecht-Louf, UMR996-Inflammation, Chemokines, and Immunopathologie, INSERM, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 32 rue des Carnets, Clamart 92140, France. E-mail address: geraldine.schlecht-louf@u-psud.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BM-DC, bone marrow-derived DC; cDC, conventional DC; DC, dendritic cell; Dex, dexamethasone; GILZ^{KO}, GILZ knockout; KO, knockout; LY, Lucifer Yellow; MFI, mean fluorescence intensity; OVA-AF488, OVA-Alexa Fluor 488; pDC, plasmacytoid DC.

Copyright © 2016 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/16/\$30.00

both in vitro and in vivo (9, 10, 12, 16, 17). Importantly, the route of Ag internalization by DC determines, at least in part, whether the antigenic peptides are presented to CD4 T cells or cross-presented to CD8 T cells (18, 19) and, thus, is critical for immune response activation.

Glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ), first reported as a glucocorticoid-responsive gene (20), is a key factor contributing to the well-known anti-inflammatory effects of glucocorticoids (21–23). GILZ is expressed in a large set of cells and exerts pleiotropic effects through binding to promoter regions (24), interactions with transcription factors, such as NF- κ B (23, 25) and AP-1 (26), or nuclear exclusion of FOXO3 (27, 28). GILZ also associates with signaling proteins like Ras/Raf-1 and mTORC2, thereby inhibiting the MEK/Erk1/2 and mTORC2/AKT pathways, respectively (29–31). We showed that the level of GILZ expression in DCs is modulated in pathologic conditions (32) and controls their capacity to favor effector or regulatory T cell expansion, both ex vivo in humans (32–34) and in vivo in mice (35). In DCs, GILZ expression is also reported to modulate IL-6 production and, thus, the differentiation of Th17 cells (36). Thus, GILZ expression in DCs is a key control point for the induction of pathogenic versus regulatory T cell responses in allergy and autoimmunity (32, 35–37).

To gain further insight into the physiologic role of GILZ in DC function, we investigated GILZ expression levels in DC subsets and the impact of its modulation on Ag capture and presentation in vivo and in vitro, in the steady-state or upon TLR4 engagement by LPS. We establish that GILZ expression is heterogeneous among DC subsets and is downregulated upon LPS treatment. Using conditional deficient mice that do not express GILZ in DCs (CD11c-GILZ^{KO} mice), we further show that GILZ selectively limits macropinocytosis, but not receptor-dependent phagocytosis, by DCs. In vivo, this inhibition of macropinocytosis operates only in the CD8 α^+ DC subset, which expresses the highest GILZ levels. We further demonstrate that GILZ also limits macropinocytosis in recently activated bone marrow-derived DCs (BM-DCs) through a mechanism that may depend, in part, upon p38 MAPK, but not Erk1/2, inhibition. Finally, despite higher Ag capture, we show that GILZ knockout (GILZ^{KO}) DCs activate CD4 T cells similarly to control DCs but are less efficient at cross-presentation. Altogether, our results point to a key role for GILZ in macropinocytosis regulation in immature and recently activated DCs, which may contribute to the fine-tuning of T cell activation by CD8 α^+ DCs in vivo.

Materials and Methods

Mice

B6.Cg-Tg(Igax-cre)1-IReiz/J male mice [kind gift from Prof. B. Reizis (38)] were crossed with homozygous GILZ^{loxed} female mice [given by Prof. E. Morand (39)] to generate CD11c-GILZ^{KO} mice. CD11c-GILZ^{fl} mice were described previously (35). Mice were bred in the Animex animal facility (Clamart, France) under specific pathogen-free conditions. Experimentation was approved by the local Ethics Committee for Animals (C2EA-26; Animal Care and use Committee, Villejuif, France) and complied with French and European guidelines for the use of laboratory animals. Male mice were used between 8 and 12 wk of age.

Cells

Splenic DCs were recovered by perfusion with 400 U/ml collagenase type IV, 50 μ g/ml DNase I (Roche Diagnostics, Meylan, France), and either anti-CD11c or anti-mPDCA-1 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Paris, France) (40). B cells were purified using a B Cell Isolation Kit. Magnetic cell sorting was done using autoMACS (Miltenyi Biotec). Cell purity ranged from 90 to 95%. BM-DCs were generated as previously described (41) in the presence of 20 ng/ml murine rGM-CSF (Miltenyi Biotec). Each culture contained >90% CD11c⁺ cells. The OVA_{257–264}-specific H-2K^b-restricted B3Z hybridoma (42) and the OVA_{265–280}-specific I-A^b-restricted CD4 T cell hybridoma (43)

were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Life Technologies BRL).

Ags and TLR agonist

OVA was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and LPS EK was from InvivoGen (Cayla SAS, Toulouse, France). The OVA_{257–264} (SIINFEKL) peptide corresponding to the immunodominant K^b-restricted T cell epitope from OVA was purchased from AnaSpec (Fremont, CA). LPS was used at 50 ng/ml. The following compounds were used to assess Ag internalization: 70-kDa dextran-FITC and Lucifer Yellow (LY; Sigma-Aldrich), OVA–Alexa Fluor 488 (OVA-AF488), and zymosan-FITC (Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies). OVA-DQ (Molecular Probes, Invitrogen, Life Technologies) was used to assess Ag processing (35).

Quantitative RT-PCR

RNA were extracted using an RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Les Ulis, France). Reverse transcription was done with MuLV Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). Real-time quantitative RT-PCR was done with a SYBR Green I Master Mix kit and a LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Results are normalized over β -actin expression. The primer sequences are available upon request.

Western blots

Cells were lysed in the presence of leupeptin, aprotinin, and pepstatin (Roche Diagnostics). Proteins were quantified with a Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Twenty-five micrograms of proteins was loaded on 12% polyacrylamide gels (NuPage; Invitrogen, Courtabouef, France). Anti-GILZ (FL-134 and G5; Santa Cruz Biotechnology), anti-p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-phospho-p44/42 MAPK (p-Erk1/2) (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), p38 MAPK, and anti-phospho-p38 MAPK were used as described by the manufacturer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Anti- α -tubulin Abs (DM1A; Sigma-Aldrich) were used for loading control.

Capture assays

For in vitro assays, 2×10^5 DCs per well were plated in 96-well microplates and incubated with several Ag concentration for various times at 4 or 37°C. In some experiments, DCs were pretreated with LPS or with 10^{-7} M dexamethasone (Dex; Sigma-Aldrich). Ag capture by CD11c⁺ cells was measured on an LSR Fortessa (BD Biosciences) or Mithras (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The mean fluorescence intensity (MFI) at 4°C was subtracted from the MFI at 37°C to calculate Δ MFI. For in vivo assays, mice were injected i.v. with 1 mg dextran-FITC in the absence or presence of 25 μ g of LPS. Spleens were harvested 1 h later and prepared for flow cytometry.

Presentation assays

BM-DCs were loaded with OVA or OVA_{257–264} peptide, washed, and used to stimulate B3Z (10^5 cells per well) and MF2.2D9 (5×10^4 cells per well) hybridomas for 18 h. BM-DC/hybridoma ratios ranged from 1:5 to 1:160. IL-2 concentrations were measured by ELISA (BD Biosciences).

Flow cytometry

After an incubation with Fc Block (2.4G2 clone), cells were labeled for 30 min in PBS-FCS 2% at 4°C in the dark with combinations of the following mAbs (clone): anti-CD11c (HL-3), anti-B220 (RA3-6B2), anti-CD11b (M1/70), anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD40 (HM40-3), anti-CD86 (GL1), anti-MHC class II (M5/114.15.2), anti-PD-L1 (MIH5), anti-CD206 (MR5D3), and anti-GILZ (CFMKG15). mAbs and isotype controls were from BD Biosciences (San Diego, CA) and eBioscience (San Diego, CA). Fluorescence was acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences), and analyses were done with FlowJo software (TreeStar).

Confocal microscopy

BM-DCs were observed using an inverted confocal laser-scanning microscope (LSM 510 META; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), using a Plan-Apochromat 63 \times /1.4 oil-objective lens, equipped with an argon laser (488-nm excitation wavelength). The green fluorescence emission was collected with a 505-nm long-pass emission filter. Differential interference contrast images were collected simultaneously with the green channel. The pinhole was set at 1.0 Airy unit. Twelve-bit numerical images were acquired with LSM 510 software version 3.2.

Statistical analysis

Statistical analyses were done with GraphPad Prism software.

Results

GILZ expression in DC subsets from CD11c-GILZ^{KO} and control mice

Conditional knockout (KO) mice were generated by crossing *GILZ^{flxed}* mice (39) with B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J mice (38). CD11c-GILZ^{KO} mice are fertile, with litters having normal size and sex ratio and no overt clinical alterations. These mice display normal distribution and numbers of pDC and cDC subsets in their lymphoid organs (Supplemental Figs. 1, 2). The basal phenotype of CD8 α ⁻ and CD8 α ⁺ cDCs and pDCs is not altered in CD11c-GILZ^{KO} mice compared with DCs from control littermates (Fig. 1A). *Gilz* expression is almost completely extinguished in cDCs from CD11c-GILZ^{KO} mice, whereas no modification is observed in B cells (Fig. 1B). As expected from CD11c expression levels, the extinction of *gilz* is less important in the pDC population (38). *GILZ* mRNA and protein are also absent in BM-DCs from CD11c-GILZ^{KO} mice (Fig. 1C, 1D), even upon stimulation with the most powerful *GILZ* inducer, Dex (Fig. 1C). We then checked *GILZ* expression using an intracellular staining approach, which confirmed a clear decrease in *GILZ* expression in CD8 α ⁻ and CD8 α ⁺ DCs from CD11c-GILZ^{KO} mice, whereas *GILZ* extinction was incomplete in pDCs, as expected (Fig. 1E, 1F). Remarkably, these data also revealed a previously unsuspected heterogeneity in

GILZ expression by DC subsets, with CD8 α ⁺ DCs containing significantly higher levels of *GILZ* protein than CD8 α ⁻ DCs and pDCs.

GILZ deficiency limits macropinocytosis, but not phagocytosis, in DCs

We studied the capacity of DC subsets from CD11c-GILZ^{KO} mice to take up a fluorescent tracer *in vivo*. CD11c-GILZ^{KO} and control mice were injected with dextran-FITC, which is broadly used to analyze fluid phase uptake but can also be internalized by mannose receptor (CD206)-mediated endocytosis (13, 15, 44). Splenic DC subsets were analyzed for dextran-FITC capture 1 h later. The three DC subsets exhibit different capacities for dextran-FITC capture, with pDCs being the most efficient, as reported previously (45), in terms of the frequency of positive cells (Fig. 2A, 2B) and quantity of fluorescent material internalized (Fig. 2A, 2C). CD8 α ⁺ DCs show an intermediate efficiency for dextran uptake, and CD8 α ⁻ DCs are the least efficient, consistent with previous studies using OVA-FITC (6, 46). Although dextran-FITC uptake is not altered in GILZ^{KO} CD8 α ⁻ DCs and pDCs compared with control subsets, we observed a slight, but reproducible, increase in the frequency of FITC⁺CD8 α ⁺ DCs and the quantity of dextran-FITC internalized by GILZ^{KO} CD8 α ⁺ DCs compared with control CD8 α ⁺ DCs (Fig. 2B, 2C). These results strongly suggest that *GILZ* expression levels have an impact on dextran capture by CD8 α ⁺ DCs *in vivo*.

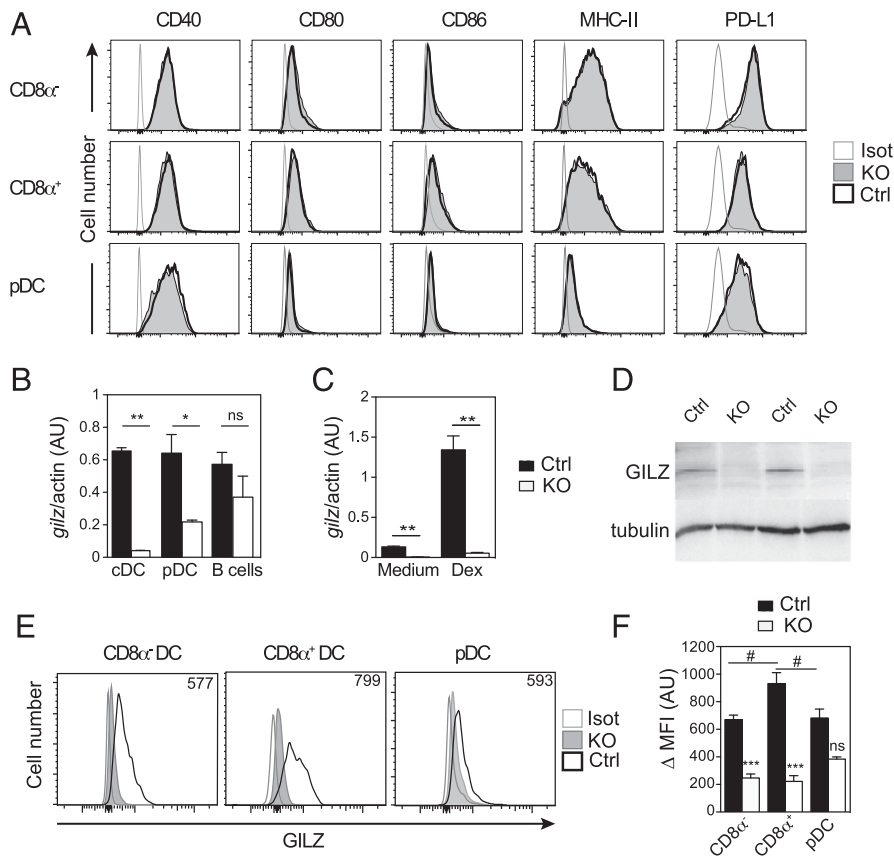


FIGURE 1. *GILZ* expression is abrogated in DCs from CD11c-GILZ^{KO} mice. (A) Expression of MHC class II, costimulatory, and inhibitory molecules by splenic DC subsets from CD11c-GILZ^{KO} (KO) and littermate control (Ctrl) mice was assessed by flow cytometry. DC subsets were defined as CD11c⁺CD8 α ⁺ (CD8 α ⁺), CD11c⁺CD8 α ⁻ (CD8 α ⁻), and CD11c⁺PDCA-1⁺ (pDC) cells. Representative line graphs are shown. *gilz* mRNA was detected by quantitative RT-PCR in splenic DCs, B cells (B) and BM-DCs (C) from CD11c-GILZ^{KO} mice and normalized over β -actin mRNA. (C) BM-DCs were treated or not with 10⁻⁷ M Dex for 18 h. (B) Data are mean \pm SEM ($n = 4$ mice per group). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, Mann-Whitney *U* test. (C) Data are mean \pm SEM ($n = 6$ independent BM-DC cultures per genotype). ** $p < 0.01$, Kruskal-Wallis test followed by the Dunn multiple-comparison test. (D) BM-DCs from GILZ^{KO} and Ctrl BM-DCs were assessed for *GILZ* expression by Western blot. One representative blot is shown. (E and F) *GILZ* expression was assessed by intracellular cell staining in CD8 α ⁺, CD8 α ⁻, and pDCs. Representative line graphs (E) and bar graphs (means \pm SEM) (F) are shown ($n = 8$ mice per group, cumulative data from three independent experiments with two or three mice per group). *** $p < 0.001$, Ctrl versus KO DCs, two-tailed Mann-Whitney *U* test. # $p < 0.01$, comparison of *GILZ* levels between DC subsets in Ctrl mice. ns, not significant.

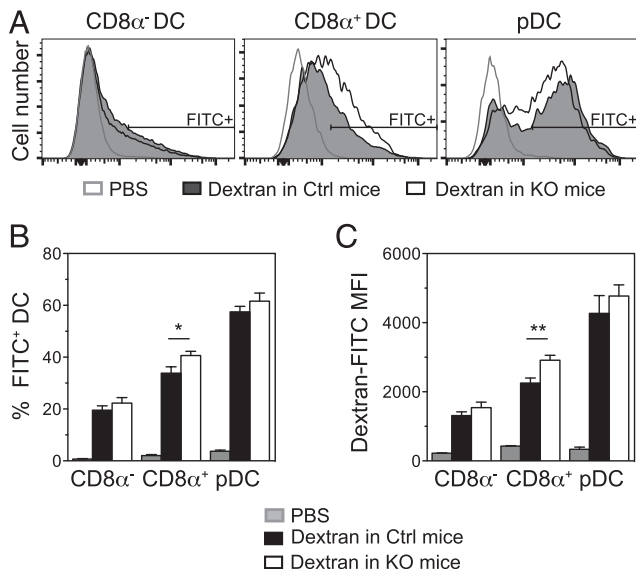


FIGURE 2. Ag internalization by $GILZ^{KO}$ and control DC subsets in vivo. One milligram of dextran-FITC was injected i.v. into CD11c- $GILZ^{KO}$ and littermate control mice. One hour later, spleens were harvested, and dextran-FITC internalization was assessed in DC subsets. (A) Representative line graphs showing dextran-FITC uptake by $CD8\alpha^{-}$ DCs, $CD8\alpha^{+}$ DCs, and pDCs. The regions used to determine the percentage of FITC⁺ cells are shown. Frequencies of FITC⁺ cells (B) and dextran-FITC MFI (C) among DC subsets. Data are mean \pm SEM (PBS: $n = 4$ mice; Dextran Ctrl: $n = 8$ mice; Dextran KO: $n = 7$ mice; cumulative data from four independent experiments). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $GILZ^{KO}$ $CD8\alpha^{+}$ DCs versus control $CD8\alpha^{+}$ DCs, Mann-Whitney U test.

To characterize the impact of GILZ deficiency on Ag uptake, control and $GILZ^{KO}$ BM-DCs were incubated for different times with dextran-FITC, and internalization was analyzed by flow cytometry (Fig. 3A–C). As observed in vivo for the $CD8\alpha^{+}$ DC subset, the frequency of FITC⁺ cells and the efficiency of dextran-FITC uptake were increased in $GILZ^{KO}$ BM-DCs compared with control DCs (Fig. 3A, 3B) at all time points and concentrations tested (Fig. 3C). To confirm these results, we used OVA-AF488, an Ag that is captured by similar mechanisms as dextran (15, 44). For all of the doses and time points tested, $GILZ^{KO}$ BM-DCs internalized higher amounts of OVA-AF488 than did control BM-DCs (Fig. 3D, 3E). To validate the hypothesis that higher GILZ expression is related to lower Ag capture, we used BM-DCs derived from CD11c- $GILZ^{hi}$ mice that constitutively overexpress GILZ in DCs (35). As reported previously (35), $GILZ^{hi}$ BM-DCs are less efficient at OVA-AF488 capture than are control BM-DCs (Fig. 3F). Thus, GILZ levels influence Ag uptake by DCs in vitro and in vivo.

Dextran and OVA can be internalized upon macropinocytosis and CD206-mediated clathrin-dependent endocytosis (13, 15, 44). Therefore, we analyzed CD206 expression in control, $GILZ^{KO}$, and $GILZ^{hi}$ splenic DC subsets and BM-DCs by flow cytometry. As previously reported (47), $CD8\alpha^{+}$ DCs and BM-DCs express CD206 (Supplemental Fig. 3). The levels of CD206 expression were similar, regardless of the genotype for *gilz*. Thus, these results rule out the possibility that the increase in dextran capture by $GILZ^{KO}$ $CD8\alpha^{+}$ DCs and BM-DCs results from higher CD206 expression.

We next investigated dextran-FITC internalization into DCs using confocal microscopy. FITC-labeled vesicles that had the typical appearance and distribution of macropinosomes were detected in 59% of the $GILZ^{KO}$ DCs and 53% of the control BM-DCs. These vesicles were similar in size but were more abundant

in $GILZ^{KO}$ DCs (Fig. 4A). This suggests that GILZ could inhibit macropinosomes. To strengthen the hypothesis that GILZ regulates macropinocytosis, we investigated LY internalization, which strictly depends upon receptor-independent macropinocytosis (48). The $GILZ^{KO}$ BM-DCs tended to be more efficient than control BM-DCs with regard to LY internalization (Fig. 4B). Altogether, these results indicate that GILZ limits macropinocytosis in DCs.

To determine whether GILZ exerts a general control on Ag internalization by DCs, we next analyzed the uptake of zymosan-FITC particles. Zymosan particles enter cells upon src- and syk-dependent lectin-1-mediated phagocytosis (49). As opposed to the results obtained with the Ags that are captured by macropinocytosis, zymosan-FITC was endocytosed with similar efficiency by $GILZ^{KO}$ and control BM-DCs at all of the time points and concentrations tested (Fig. 4C, 4D). Thus, GILZ does not impact receptor-dependent phagocytosis in DCs.

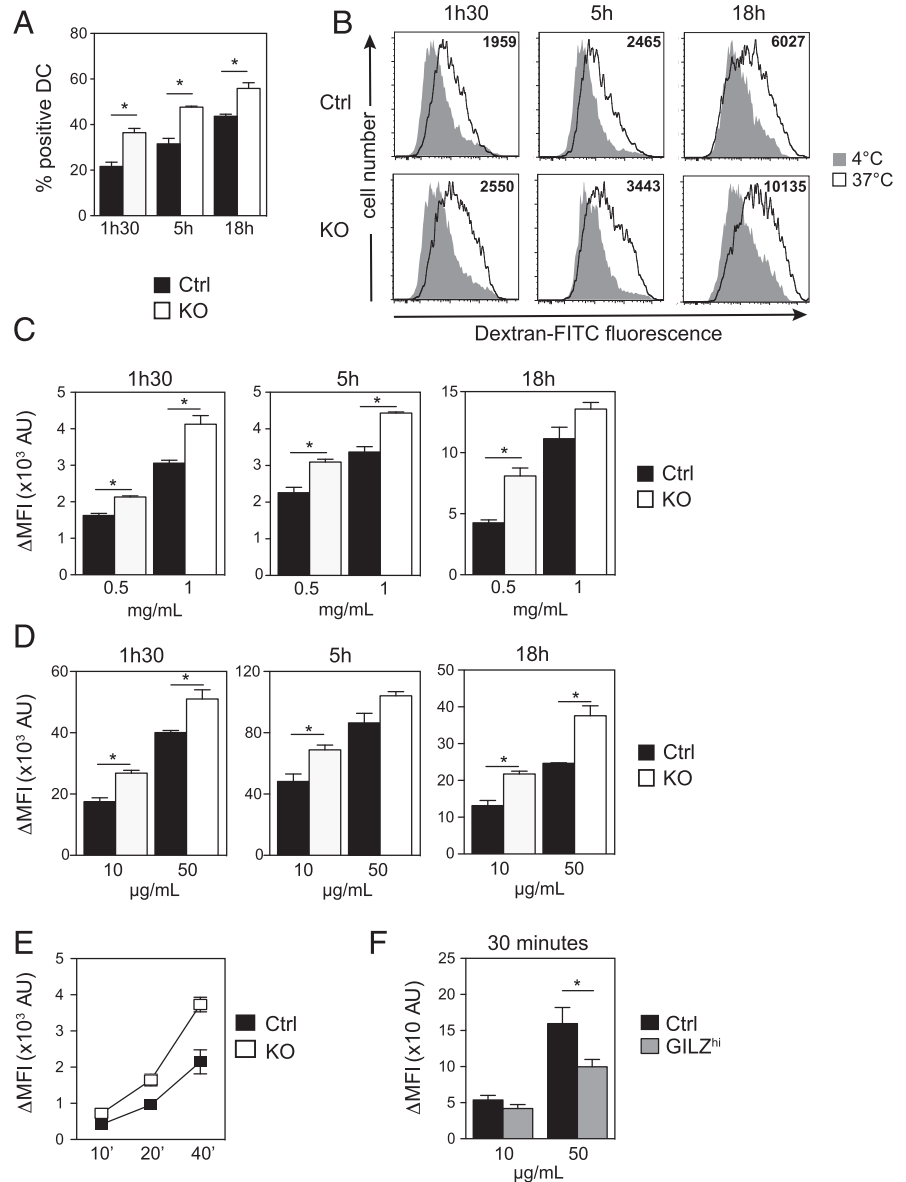
GILZ limits macropinocytosis in recently activated DCs in vitro but not in vivo

Upon TLR4 engagement by LPS in vitro, BM-DCs rapidly and transiently increase macropinocytosis, which is maximal at 30–45 min post-LPS exposure (14). Considering the inverse association between GILZ levels and macropinocytosis that we observed, we sought to determine GILZ levels in LPS-treated BM-DCs. Analysis of GILZ expression in BM-DCs from control mice revealed that GILZ protein levels are very quickly downregulated upon LPS activation, with a 50–70% reduction after a 45-min activation detected by Western blot and flow cytometry (Fig. 5A, 5B), and they remained low at 18 h postactivation. As expected, BM-DC treatment with Dex induced GILZ upregulation (Fig. 5B).

To determine whether there is a causal link between GILZ downregulation and the macropinocytosis increase in DCs upon LPS stimulation, we investigated whether $GILZ^{KO}$ BM-DCs can increase their macropinocytosis upon short-term stimulation with LPS. Similar to what was reported by West et al. (14), $GILZ^{KO}$ and control BM-DCs were exposed to LPS for 45 min and incubated for an additional 45 min with dextran-FITC, OVA-AF488, or zymosan-FITC. Consistent with other studies (9, 14), short-term DC stimulation with LPS induced an increase in dextran-FITC and OVA-AF488 macropinocytosis (Fig. 5C). This increase was observed for $GILZ^{KO}$ and control BM-DCs; dextran capture was increased by a factor of 18.2 ± 5.2 in LPS-treated control DCs and by a factor of 10.7 ± 1.6 in LPS-treated KO DCs. Remarkably, $GILZ^{KO}$ BM-DCs still internalized more Ag than control BM-DCs following activation, although the difference did not reach statistical significance. In contrast, zymosan-FITC phagocytosis was not modified upon BM-DC maturation, whatever their genotype. As expected, the increase in Ag macropinocytosis upon DC activation was transient (14, 50), and BM-DCs incubated for 18 h with LPS before dextran-FITC addition displayed reduced macropinocytosis compared with untreated BM-DCs (Fig. 5D). Altogether, these data demonstrate that GILZ downregulation is not required for increased macropinocytosis in recently activated DCs but that GILZ limits macropinocytosis in immature and recently activated BM-DCs, despite its reduced level in the latter.

We next investigated macropinocytosis by recently activated DCs in vivo. We injected mice with 25 μ g of LPS in addition to dextran-FITC and analyzed Ag capture 1 h later. Consistent with our in vitro results, GILZ expression was quickly reduced in DC subsets upon LPS treatment of control mice (Fig. 5E, 5F). Remarkably, in LPS-treated mice, the frequencies of DCs that took up dextran-FITC and the quantities of internalized Ag increased significantly only for the $CD8\alpha^{+}$ DC subset (Fig. 5G), whatever

FIGURE 3. Increased Ag internalization by GILZ^{KO} BM-DCs. (A–C) BM-DCs from CD11c-GILZ^{KO} (KO) and littermate control (Ctrl) mice were incubated with 0.5 or 1 mg/ml of dextran-FITC at 4 or 37°C for 1.5, 5, or 18 h. Dextran-FITC internalization was measured by flow cytometry. (A) Frequency of FITC⁺ cells after a 1.5, 5, and 18 h-incubation with 0.5 mg/ml dextran-FITC. (B) Representative line graphs showing FITC association with CD11c⁺ cells in (A). MFI at 37°C is shown in the upper right corner of each panel. (C) Δ MFI after 1.5, 5, and 18 h-incubation with dextran-FITC. For the Ctrl BM-DCs, MFI at 4°C were 333 \pm 23 for 0.5 mg/ml, 1h30; 395 \pm 62 for 1 mg/ml, 1h30; 206 \pm 34 for 0.5 mg/ml, 5 h; 456 \pm 92 for 1 mg/ml, 5 h; 1575 \pm 235 for 0.5 mg/ml, 18 h; and 1812 \pm 298 for 1 mg/ml, 18 h. For the KO BM-DCs, MFI at 4°C were 418 \pm 45 for 0.5 mg/ml, 1h30; 441 \pm 72 for 1 mg/ml, 1h30; 349 \pm 56 for 0.5 mg/ml, 5 h; 387 \pm 69 for 1 mg/ml, 5 h; 1642 \pm 329 for 0.5 mg/ml, 18 h; and 1976 \pm 356 for 1 mg/ml, 18 h. BM-DCs from CD11c-GILZ^{KO} (D and E), CD11c-GILZ^{hi} (F), and control mice were incubated for different times with several doses of OVA-AF488, at 4 or 37°C. (D and F) Δ MFI after incubation with OVA-AF488. (E) Early kinetics of OVA-AF488 internalization (10 μ g/ml). Data are mean \pm SEM for three independent BM-DC cultures per genotype. (A, C, D, and F) Data are mean \pm SEM for four to eight BM-DC cultures per genotype and were obtained from three or four independent experiments. **p* < 0.05, Mann-Whitney *U* test.



their genotype for *gilz*. As opposed to the results obtained *in vitro*, Ag capture by LPS-activated GILZ^{KO} and control CD8 α ⁺ DCs was equivalent. Overall, these data show that GILZ exerts an inhibitory effect on constitutive, but not LPS-promoted, macropinocytosis in CD8 α ⁺ DCs *in vivo* in contrast to the results obtained *in vitro*, at least under these experimental conditions.

GILZ deficiency results in increased p38 MAPK activation in response to LPS stimulation

The enhancement of macropinocytosis in short-term LPS-treated DCs depends upon Rsk phosphorylation by the Erk1/2 and p38 MAPKs (11). Because GILZ is known to interact with Ras and, thereby, inhibit Erk1/2 MAPK activation (29) and inhibit TNF- α -induced Erk1/2 and p38 MAPK activation in endothelial cells (51), we investigated Erk1/2 and p38 MAPK activation in GILZ^{KO} DCs compared with control DCs. We assessed the phosphorylation of Erk1/2 and p38 MAPKs in GILZ^{KO} and control BM-DCs, in resting DCs, and at different time points after LPS treatment (Fig. 6). The basal phosphorylation of p38 MAPK and Erk1/2 was similar in GILZ^{KO} and control BM-DCs (Fig. 6A, 6B), demonstrating that the increased macropinocytosis in GILZ^{KO} BM-DCs does not result from constitutive overactivation of these

pathways. Upon LPS treatment, Erk1/2 is phosphorylated to similar levels in GILZ^{KO} and control BM-DCs (Fig. 6C), but the phosphorylation of p38 MAPK was significantly higher in LPS-treated GILZ^{KO} BM-DCs than in LPS-treated control BM-DCs (Fig. 6D). These data demonstrate that GILZ inhibits LPS-induced p38 MAPK activation in BM-DCs, thus identifying a possible mechanism for GILZ-dependent limitation of macropinocytosis in recently activated BM-DCs.

GILZ deficiency in DCs impacts cross-presentation

We next analyzed the impact of GILZ expression in DCs on Ag processing and presentation. First, we verified whether the Ags captured by GILZ^{KO} DCs were efficiently degraded. Therefore, GILZ^{KO} and control BM-DCs were incubated with OVA-DQ for 1.5, 5, and 18 h and analyzed for Ag degradation owing to fluorescence emission (Fig. 7A). GILZ^{KO} BM-DCs displayed an increase in OVA degradation compared with control BM-DCs for both concentrations and for all time points tested. As shown by a Spearman correlation test, OVA degradation by GILZ^{KO} BM-DCs increased with OVA internalization. Furthermore, linear regression revealed that OVA-degradation efficiency was similar in GILZ^{KO} BM-DCs and control BM-DCs (Supplemental Fig. 4). We then investigated

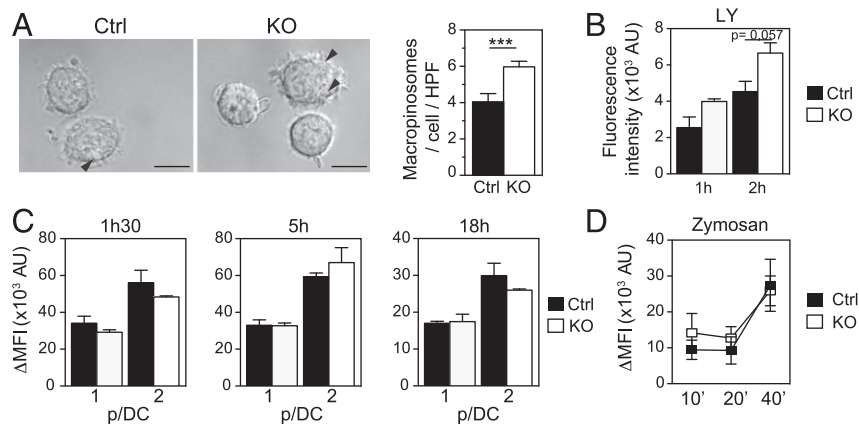


FIGURE 4. GILZ deficiency increases macropinocytosis but not receptor-dependent phagocytosis in DCs. **(A)** BM-DCs were incubated for 10 min with dextran-FITC. Internalization was analyzed by confocal microscopy. Representative images are shown (left and middle panels). The macropinosomes were counted in DCs from 15–20 fields ($n = 140$ for control, $n = 114$ for GILZ^{KO}). Arrowheads show representative macropinosomes. Scale bars, 10 μ m. Bar graph shows the mean (\pm SEM) numbers of macropinosomes per DC per high-power field (HPF) (right panel). **(B)** BM-DCs were incubated with LY (250 μ g/ml) for 1 or 2 h. LY capture was measured using a Mithras. **(C and D)** BM-DCs from CD11c-GILZ^{KO} or control mice were incubated for different times with several doses of zymosan-FITC, at 4 or 37°C. **(D)** Early kinetics of zymosan-FITC (one particle per DC) internalization. **(B–D)** Data are mean \pm SEM for four to eight BM-DC cultures per genotype and were obtained from two to four independent experiments. *** $p < 0.001$, Mann-Whitney U test.

Ag presentation to CD4⁺ and CD8⁺ T cell hybridomas by GILZ^{KO} DCs. Surprisingly, despite increased OVA capture and efficient degradation, GILZ^{KO} BM-DCs induced a similar activation of the MF2.2D9 CD4 T cell hybridoma as control BM-DCs, regardless of the number of DCs or the concentration of Ag used (Fig. 7B, 7D). Thus, the increase in macropinocytosis observed in GILZ^{KO} BM-DCs did not result in increased Ag presentation to CD4⁺ T cells. We next tested the impact of GILZ on cross-presentation by DCs. OVA-loaded GILZ^{KO} BM-DCs are less efficient than control BM-DCs in B3Z CD8 T cell hybridoma stimulation (Fig. 7C, 7E). In contrast, when GILZ^{KO} and control BM-DCs were loaded with synthetic OVA_{257–264} peptide, they induced similar activation of the CD8 T cell hybridoma (Fig. 7F), ruling out a difference in the expression of MHC class I molecules between GILZ^{KO} and control BM-DCs. These results support the conclusion that, although GILZ limits the quantity of Ag acquired upon macropinocytosis, it favors cross-presentation by DCs.

Discussion

In this study, we used conditional KO mice to investigate the physiologic role of GILZ in DC subsets, with a focus on Ag capture and presentation. Our results highlight the heterogeneity of GILZ expression by DC subsets and its downregulation in DCs activated via LPS treatment in vitro and in vivo. In addition, our work identifies a previously unsuspected role for GILZ in the differential regulation of endocytic processes in DCs in vitro and in vivo.

To investigate Ag capture by DCs, we used several well-characterized compounds. Dextran and OVA are internalized by macropinocytosis and by CD206-mediated clathrin-dependent endocytosis (13, 15, 44), and LY enters cells through macropinocytosis independently of any receptor (48). In agreement with the fact that GILZ downregulation in DCs results in increased OVA uptake (52), our results demonstrate that GILZ^{KO} DCs exhibit an increased efficiency for dextran, OVA, and LY internalization compared with control DCs, consistent with the reduction in OVA capture by GILZ^{hi} DCs demonstrated previously (35) and confirmed in this study. This increased efficiency is detected in terms of the frequency of cells that take up the Ag and the quantity of Ag internalized, and it is also associated with more macropinosomes. In contrast, GILZ^{KO} DCs behaved similarly to control DCs with regard to dectin-1-dependent phagocytosis of zymosan particles

(49). Overall, these data support the conclusion that GILZ inhibits fluid phase uptake in DCs but not phagocytosis. Because dextran and OVA can be internalized in a CD206-dependent manner, we cannot exclude that GILZ also controls CD206-mediated endocytosis through a mechanism that would not depend on CD206 expression modulation. However, the concentrations of dextran and OVA that we used in our experimental settings were reported to favor CD206-independent uptake (53). In addition, dextran and OVA capture are highly increased upon short-term activation by LPS, which was reported to upregulate macropinocytosis but not receptor-mediated endocytosis (10, 50). Therefore, we favor the hypothesis that GILZ selectively inhibits macropinocytosis.

Macropinocytosis is tightly regulated upon DC maturation, with a strong increase reported in the 2 h following in vitro activation. To our knowledge, this is the first article to report that recently activated DCs also increase macropinocytosis in vivo, as well as to identify CD8 α ⁺ DCs as the most responsive subset in such a setting, shedding light on the rapid and subset-specific regulation of Ag capture in vivo. Our data also show for the first time, to our knowledge, that GILZ is quickly downregulated upon DC treatment with LPS both in vitro and in vivo. Therefore, we investigated whether the decrease in GILZ levels contributes to the rapid enhancement of macropinocytosis in recently activated DCs. We observed a strong increase in macropinocytosis in vitro in LPS-treated GILZ^{KO} BM-DCs and in vivo in CD8 α ⁺ GILZ^{KO} DCs from LPS-injected mice, indicating that the reduction in GILZ levels is not the control point for the increase in macropinocytosis in recently activated DCs. Our results also clearly establish that GILZ deficiency increases macropinocytosis in recently activated BM-DCs in vitro, pointing to the fact that GILZ action on Ag capture can operate in immature and mature DCs; however, we did not observe the same results in activated splenic DCs in vivo. Although it may result from the type of DCs used, this difference also supports previous observations that the capacity of DCs to capture Ag is differentially regulated after in vitro and in vivo activation (15).

The molecular mechanisms that regulate macropinocytosis in DCs remain poorly described. Constitutive macropinocytosis by DCs is reported to depend primarily upon the Rho family GTPase Rac, whereas the requirement for the Rac-related GTPases Rho and Cdc42 remains modest (9, 12, 54). The increase in macropinocytosis

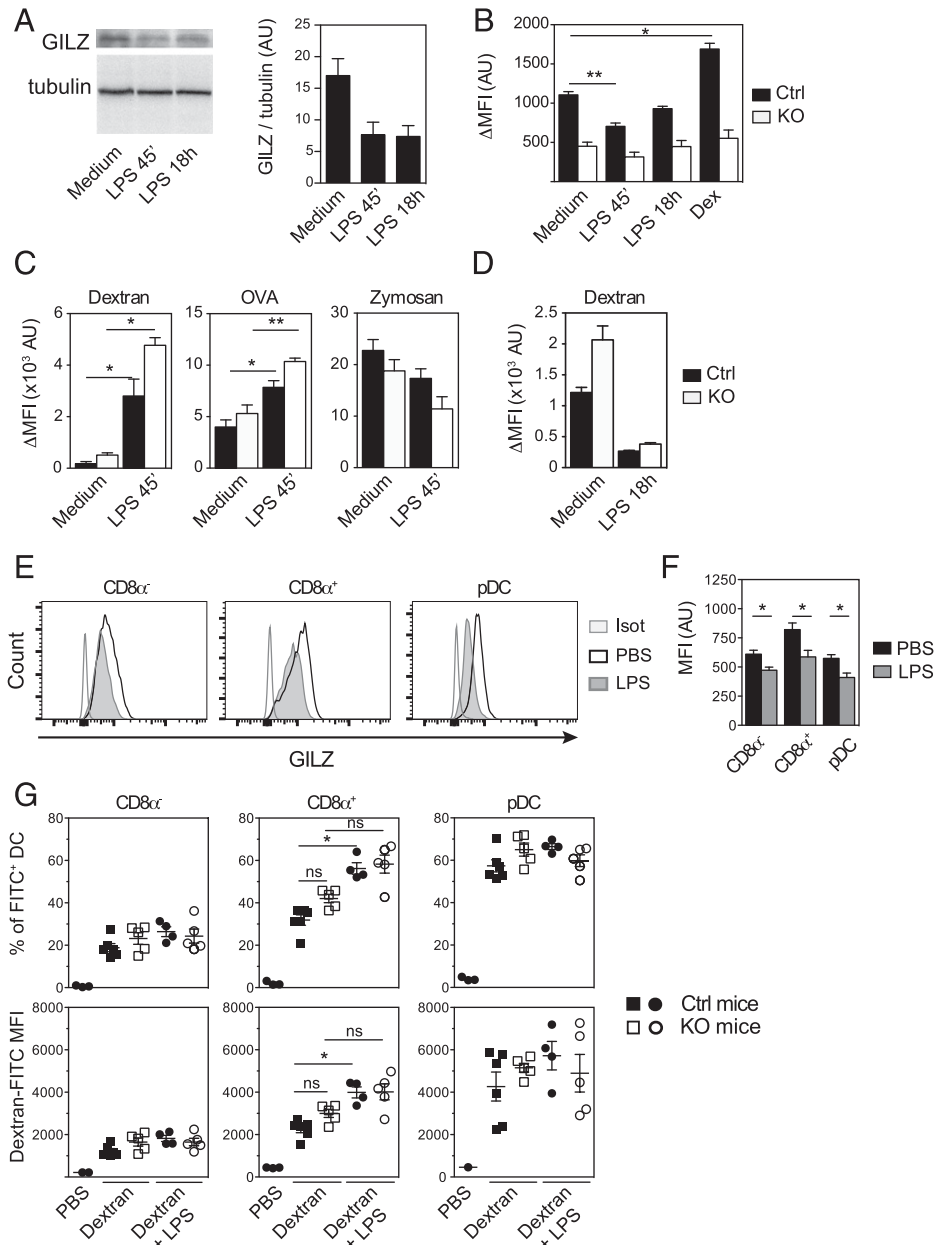


FIGURE 5. GILZ limits macropinocytosis in LPS-activated DCs in vitro but not in vivo. **(A)** BM-DCs from control mice were incubated with 50 ng/ml LPS for 45 min or 18 h, and GILZ protein was detected by Western blot (left panel) and normalized over tubulin (right panel). The blot is representative of three experiments, and the normalized data show cumulative results from three experiments. **(B)** GILZ^{KO} or control BM-DCs were incubated with LPS for 45 min or 18 h or with 10⁻⁷ M Dex. GILZ protein was detected by intracellular flow cytometry. Mean ± SEM from 10 BM-DC cultures per genotype are shown, from five independent experiments. ***p* < 0.01, **p* < 0.05, Kruskal–Wallis analysis followed by the Dunn multiple-comparison test. **(C)** GILZ^{KO} or control BM-DCs were stimulated with LPS for 45 min and incubated for an additional 45 min with 0.5 mg/ml dextran-FITC, 10 μg/ml OVA-AF488, or one particle of zymosan-FITC per DC. Uptake of the fluorescent compounds was measured by flow cytometry. Bar graphs show mean ± SEM from eight BM-DC cultures per genotype and were obtained from three independent experiments. ***p* < 0.01, **p* < 0.05, Kruskal–Wallis analysis followed by the Dunn multiple-comparison test. **(D)** GILZ^{KO} or control BM-DCs were stimulated with LPS for 18 h and incubated with dextran-FITC for an additional 45 min before FACS analysis. Data are mean ± SEM from three BM-DC cultures per genotype from two independent experiments. CD11c-GILZ^{KO} and Ctrl mice received 1 mg of dextran-FITC, with or without 25 μg of LPS. GILZ expression **(E and F)** and dextran-FITC internalization **(G)** were assessed in DC subsets 1 h later. Representative line graphs (E) and bar graph (mean ± SEM) (F) showing GILZ expression in CD8α⁺ DCs, CD8α DCs, and pDCs from control mice (*n* = 4 mice from four independent experiments for each group). **p* < 0.05, Mann–Whitney *U* test. **(G)** Frequencies of FITC⁺ cells (upper panels) and MFI (lower panels) in DC subsets. Data are mean ± SEM (PBS: *n* = 4 mice; Dextran Ctrl: *n* = 6 mice; Dextran GILZ^{KO}: *n* = 5 mice; Dextran + LPS Ctrl: *n* = 4 mice; Dextran + LPS GILZ^{KO}: *n* = 5 mice; data obtained from four independent experiments). **p* < 0.05, Kruskal–Wallis analysis, followed by the Dunn multiple-comparison test. ns, not significant.

upon short-term activation by TLR agonists in vitro is controlled by phosphorylation of the MAPK-activated kinase Rsk as a consequence of Erk and p38 MAPK activation (11). Given that GILZ is known to inhibit Erk and p38 MAPK pathways in several cell types (29, 51), we hypothesized that these pathways might be constitutively overactivated

in GILZ^{KO} DCs, thus explaining their enhanced basal macropinocytic activity. The basal phosphorylation of Erk1/2 and p38 MAPKs was similar in GILZ^{KO} and control DCs, indicating that GILZ inhibits macropinocytosis through the modulation of another pathway in nonactivated DCs. The Ras GTPase is one possible candidate to

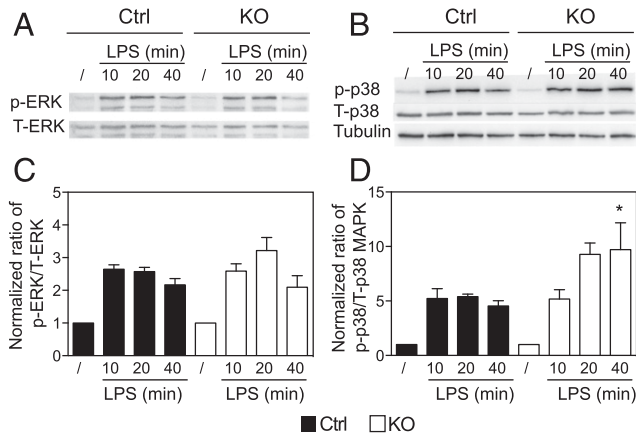


FIGURE 6. LPS activation results in higher p38 MAPK activation in $GILZ^{KO}$ BM-DCs. $GILZ^{KO}$ or control BM-DCs were incubated with 50 ng/ml LPS for 10, 20, or 40 min. Cell lysates were assessed for Erk1/2 (A) and p38 MAPK (B) phosphorylation (p-Erk and p-p38) by Western blot. Total Erk1/2 and p38 MAPK (T-ERK and T-p38) were also assessed. Representative data from one of five individual experiments are shown. (C and D) Phosphorylated proteins were quantified and normalized over total protein (T-Erk1/2 and T-p38) for each BM-DC culture. Mean \pm SEM are shown. $*p < 0.05$, p38 phosphorylation in Ctrl versus KO BM-DCs at each time point, Kruskal-Wallis analysis followed by the Dunn multiple-comparison test.

mediate GILZ's effect on macropinocytosis (29), because it was reported to control this endocytic process in several cell types (7). We further showed that GILZ inhibits activation of the p38 MAPK pathway, but not of the Erk1/2 pathway, downstream of TLR4 engagement in BM-DCs. Therefore, we propose that GILZ-mediated control of macropinocytosis in activated BM-DCs could depend, at least in part, upon the regulation of p38 MAPK phosphorylation.

Previous studies reported that DC-isolation procedures can modify Ag uptake by DCs as a result of the releases of collagen fragments upon enzymatic digestion (53). Moreover, Ag capture depends upon DC activation, and DC isolation per se may alter this process (55). For these reasons, we investigated capture by DC subsets in their natural environment, after dextran-FITC injection to mice. We demonstrate that GILZ limits dextran internalization by $CD8\alpha^+$ DCs, but not by $CD8\alpha^-$ DCs or pDCs, with the last being the subset that takes up dextran the most efficiently in vivo. We cannot exclude that this modulation of Ag capture in $CD8\alpha^+$ DCs is due to their expression of CD206, which is known to contribute to dextran endocytosis (56). However, it may also be explained by the fact that $CD8\alpha^+$ DCs constitutively display higher levels of GILZ than do pDCs and $CD8\alpha^-$ DCs. A differential regulation of macropinocytosis and apoptotic cell uptake between DC subsets was reported in several articles (6, 46, 57). In particular, the study by Kerksiek et al. (6) established that Rac1 is critical to control Ag internalization by the $CD8\alpha^+$ DC subset but not by $CD8\alpha^-$ DCs. Our study confirms that Ag capture by DC subsets is differentially regulated in vivo and establishes that GILZ contributes to this subset-specific modulation, possibly through selective modulation of small GTPases. An important consequence of this regulation of the Ag-capture mechanisms is the shaping of the antigenome available for processing and presentation by $CD8\alpha^+$ DCs depending on their GILZ expression (i.e., on their activation state), with a possible qualitative impact on the repertoire of peptides that they present.

The analysis of Ag presentation revealed that, despite their higher Ag capture, $GILZ^{KO}$ DCs are not more efficient than control DCs at CD4 T cell activation and are even less efficient at CD8 T cell cross-priming. This uncoupling between the quantity of internalized Ag and its level of presentation raises a question about Ag processing after its internalization by macropinocytosis in $GILZ^{KO}$ DCs. Our

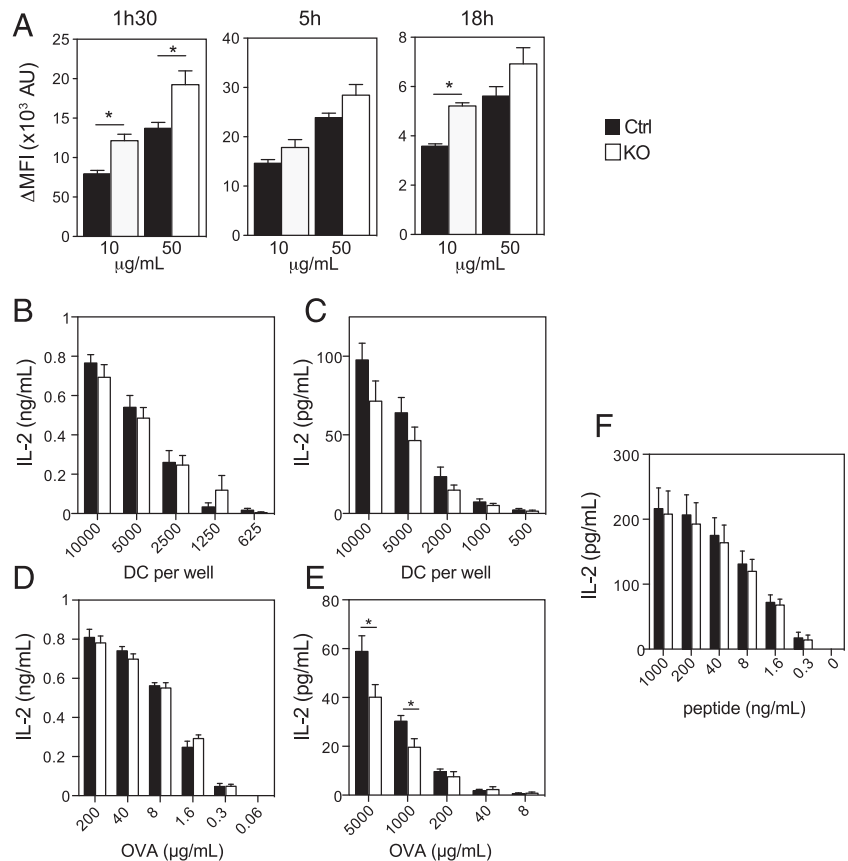


FIGURE 7. Ag processing and presentation by $GILZ^{KO}$ BM-DCs. (A) BM-DCs were incubated with OVA-DQ for 1.5, 5, or 18 h, and Ag degradation was measured by flow cytometry. BM-DCs were incubated with 50 μ g/ml OVA for 1.5 h (B) or with 1 mg/ml OVA for 4 h (C) and used for Ag presentation to MF2.2D9 hybridoma (B) or cross-presentation to B3Z hybridoma (C) at various DC/T cell ratios. BM-DCs were incubated with various doses of OVA for 4 h or OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide for 1.5 h and tested for Ag presentation to MF2.2 hybridoma (D) or B3Z hybridoma (E and F). All data are mean \pm SEM for five to seven BM-DC cultures per genotype and were obtained from three or four independent experiments. $*p < 0.05$, Kruskal-Wallis analysis followed by the Dunn multiple-comparison test.

data support the conclusion that Ag is efficiently degraded in GILZ^{KO} DCs. The equivalent Ag presentation to CD4 T cells by GILZ^{KO} and control DCs could result from excessive protein degradation or saturation of the MHC class II-restricted Ag-presentation pathway in GILZ^{KO} DCs. An increase in protein degradation after macropinocytosis in GILZ^{KO} DCs could also account for their reduced cross-presentation capacity. Indeed, cross-presentation requires transient Ag preservation for further translocation in the cytosol (5, 18, 19, 58). Alternatively, it is conceivable that the specific machinery involved in cross-presentation is altered in GILZ^{KO} DCs compared with control DCs or is not recruited to the compartments where OVA is routed upon GILZ-regulated macropinocytosis. Importantly, CD8 α^+ DCs are known to be constitutively efficient in Ag cross-presentation (5). This suggests that GILZ expression in this DC subset may contribute to the fine-tuning of CD8 T cell priming in vivo. Further work is needed to decipher the mechanisms underlying GILZ's impact on cross-presentation and to assess possible links with macropinocytosis modulation.

The physiological relevance of the modulation of Ag capture by GILZ still needs to be addressed in vivo. One may hypothesize that high GILZ levels in DCs promote tolerance by reducing the quantity of Ag that they acquire upon macropinocytosis, modulating the relative quantities of Ag internalized upon specific versus nonspecific mechanisms, and favoring tolerogenic presentation to T cells. Conversely, low GILZ levels increase the Ag cargo taken up by DCs, with a bias toward nonspecific Ag capture. Our experiments did not reveal any increase in CD4 T cell activation by GILZ^{KO} DCs, but we could not address the possible qualitative modifications in the peptides that were presented to these T cells in our model, which may arise in vivo upon alteration of the relative importance of receptor-dependent and -independent capture processes. This qualitative analysis of GILZ's impact on peptide presentation requires further investigation with dedicated models in vivo. One alternative hypothesis is that Ag taken up by DCs upon the GILZ-modulated macropinocytic process are not dedicated to MHC-restricted presentation to T cells. Indeed, these Ags may also be stored in particular endosomal compartment for later transfer to B cells, as was reported for the CD103⁺ DC subset (57), which is ontogenically related to the CD8 α^+ DC subset. In this case, GILZ downregulation in DCs upon activation would allow the storage of large cargos of Ags, with a focus on molecules not recognized by cell surface receptors or innate/adaptive proteins.

In conclusion, we report for the first time, to our knowledge, that GILZ expression is crucial to selectively regulate Ag macropinocytosis in DCs and that this regulation operates in the CD8 α^+ DC subset in vivo. GILZ is known to modulate the capacity of DCs to activate effector versus regulatory T cells, by modulating DC phenotype and cytokine secretion (32–37). Our work now supports the conclusion that GILZ controls Ag acquisition and addressing to processing machinery in a DC subset-specific manner. Thereby, GILZ modulation in pathologic settings may regulate the initial steps of CD8 α^+ DC function as APCs, with possible consequences on CD8 T cell cross-tolerance and cross-priming in vivo.

Acknowledgments

We thank H. Gary and M.-L. Akin (Plaimmo, Unité Mixte de Service Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique, Chatenay-Malabry, France) for excellent technical assistance and M. Levant and Baptiste Lecomte (Animex, Unité Mixte de Service Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique) for mice handling. We are grateful to B. Reizis (Department of Microbiology and Immunology, Columbia University Medical Center) for providing *Itgax-Cre* mice, to N. Shastri (University of California, Berkeley) and E. Tartour (INSERM U970 Paris Cardiovascular Research Center, Sorbonne Paris-Cité, Paris, France) for the B3Z hybridoma, and to K. Rock

(University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA) for the MF2.2D9 hybridoma.

Disclosures

S.F. has had salary support and Ph.D. funding from GlaxoSmithKline that was not relevant to this study. The other authors have no financial conflicts of interest.

References

- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 563–604.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685–711.
- Mildner, A., and S. Jung. 2014. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40: 642–656.
- Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 557–569.
- Kerksiek, K. M., F. Niedergang, P. Chavrier, D. H. Busch, and T. Brocker. 2005. Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* 105: 742–749.
- Lim, J. P., and P. A. Gleeson. 2011. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* 89: 836–843.
- Liu, Z., and P. A. Roche. 2015. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front. Physiol.* 6: 1.
- West, M. A., A. R. Prescott, E. L. Eskelinen, A. J. Ridley, and C. Watts. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr. Biol.* 10: 839–848.
- Platt, C. D., J. K. Ma, C. Chalouni, M. Ebersold, H. Bou-Reslan, R. A. Carano, I. Mellman, and L. Delamarre. 2010. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 4287–4292.
- Zaru, R., N. Ronkina, M. Gaestel, J. S. Arthur, and C. Watts. 2007. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nat. Immunol.* 8: 1227–1235.
- Garrett, W. S., L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galán, and I. Mellman. 2000. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102: 325–334.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389–400.
- West, M. A., R. P. Wallin, S. P. Matthews, H. G. Svensson, R. Zaru, H. G. Ljunggren, A. R. Prescott, and C. Watts. 2004. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305: 1153–1157.
- Drutman, S. B., and E. S. Trombetta. 2010. Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. *J. Immunol.* 185: 2140–2146.
- Gil-Torregrosa, B. C., A. M. Lennon-Duménil, B. Kessler, P. Guermonprez, H. L. Ploegh, D. Fruci, P. van Endert, and S. Amigorena. 2004. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 34: 398–407.
- Young, L. J., N. S. Wilson, P. Schnorrer, A. Mount, R. J. Lundie, N. L. La Gruta, S. Crabb, G. T. Belz, W. R. Heath, and J. A. Villadangos. 2007. Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 17753–17758.
- Burgdorf, S., C. Schölz, A. Kautz, R. Tampé, and C. Kurts. 2008. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* 9: 558–566.
- Kamphorst, A. O., P. Guermonprez, D. Dudziak, and M. C. Nussenzweig. 2010. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J. Immunol.* 185: 3426–3435.
- D'Adamo, F., O. Zollo, R. Moraca, E. Ayroldi, S. Bruscoli, A. Bartoli, L. Cannarile, G. Migliorati, and C. Riccardi. 1997. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7: 803–812.
- Vago, J. P., L. P. Tavares, C. C. Garcia, K. M. Lima, L. O. Perucci, E. L. Vieira, C. R. Nogueira, F. M. Soriani, J. O. Martins, P. M. Silva, et al. 2015. The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. *J. Immunol.* 194: 4940–4950.
- Beaulieu, E., D. Ngo, L. Santos, Y. H. Yang, M. Smith, C. Jorgensen, V. Escricou, D. Scherman, G. Courties, F. Apparailly, and E. F. Morand. 2010. Glucocorticoid-induced leucine zipper is an endogenous antiinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis Rheum.* 62: 2651–2661.
- Berrebi, D., S. Bruscoli, N. Cohen, A. Foussat, G. Migliorati, L. Bouchet-Delbos, M. C. Maillol, A. Portier, J. Couderc, P. Galanaud, et al. 2003. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 101: 729–738.
- Yosef, N., A. K. Shalek, J. T. Gaublotte, H. Jin, Y. Lee, A. Awasthi, C. Wu, K. Karwacz, S. Xiao, M. Jorgolli, et al. 2013. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 496: 461–468.

25. Ayroldi, E., G. Migliorati, S. Bruscoli, C. Marchetti, O. Zollo, L. Cannarile, F. D'Adamo, and C. Riccardi. 2001. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98: 743–753.
26. Mittelstadt, P. R., and J. D. Ashwell. 2001. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J. Biol. Chem.* 276: 29603–29610.
27. Asselin-Labat, M. L., M. David, A. Biola-Vidamment, D. Lecoecue, M. C. Zennaro, J. Bertoglio, and M. Pallardy. 2004. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 104: 215–223.
28. Latré de Laté, P., A. Pépin, H. Assaf-Vandecasteele, C. Espinasse, V. Nicolas, M. L. Asselin-Labat, J. Bertoglio, M. Pallardy, and A. Biola-Vidamment. 2010. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crml1-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285: 5594–5605.
29. Ayroldi, E., O. Zollo, A. Bastianelli, C. Marchetti, M. Agostini, R. Di Virgilio, and C. Riccardi. 2007. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J. Clin. Invest.* 117: 1605–1615.
30. Ayroldi, E., O. Zollo, A. Macchiarulo, B. Di Marco, C. Marchetti, and C. Riccardi. 2002. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7929–7941.
31. Joha, S., A. L. Nugues, D. Hétiuin, C. Berthon, X. Dezitter, V. Dauphin, F. X. Mahon, C. Roche-Lestienne, C. Preudhomme, B. Quesnel, and T. Idziorek. 2012. GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL(+) cells. *Oncogene* 31: 1419–1430.
32. Karaki, S., G. Garcia, C. Tcherakian, F. Capel, T. Tran, M. Pallardy, M. Humbert, D. Emilie, and V. Godot. 2014. Enhanced glucocorticoid-induced leucine zipper in dendritic cells induces allergen-specific regulatory CD4(+) T-cells in respiratory allergies. *Allergy* 69: 624–631.
33. Cohen, N., E. Mouly, H. Hamdi, M. C. Maillot, M. Pallardy, V. Godot, F. Capel, A. Balian, S. Naveau, P. Galanaud, et al. 2006. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* 107: 2037–2044.
34. Hamdi, H., V. Godot, M. C. Maillot, M. V. Prejean, N. Cohen, R. Krzysiek, F. M. Lemoine, W. Zou, and D. Emilie. 2007. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 110: 211–219.
35. Calmette, J., M. Ellouze, T. Tran, S. Karaki, E. Ronin, F. Capel, M. Pallardy, F. Bachelerie, R. Krzysiek, D. Emilie, et al. 2014. Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion in vivo. *J. Immunol.* 193: 5863–5872.
36. Jones, S. A., D. N. Perera, H. Fan, B. E. Russ, J. Harris, and E. F. Morand. 2015. GILZ regulates Th17 responses and restrains IL-17-mediated skin inflammation. *J. Autoimmun.* 61: 73–80.
37. Benkhoucha, M., N. Molnarfi, I. Dunand-Sauthier, D. Merkle, G. Schneider, S. Bruscoli, C. Riccardi, Y. Tabata, H. Funakoshi, T. Nakamura, et al. 2014. Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via glucocorticoid-induced leucine zipper expression in dendritic cells. *J. Immunol.* 193: 2743–2752.
38. Caton, M. L., M. R. Smith-Raska, and B. Reizis. 2007. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J. Exp. Med.* 204: 1653–1664.
39. Ngo, D., E. Beaulieu, R. Gu, A. Leaney, L. Santos, H. Fan, Y. Yang, W. Kao, J. Xu, V. Escriou, et al. 2013. Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of inflammation and arthritis. *Arthritis Rheum.* 65: 1203–1212.
40. Schlecht, G., C. Leclerc, and G. Dadaglio. 2001. Induction of CTL and non-polarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *J. Immunol.* 167: 4215–4221.
41. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693–1702.
42. Karttunen, J., and N. Shastri. 1991. Measurement of ligand-induced activation in single viable T cells using the lacZ reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3972–3976.
43. Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff, and K. L. Rock. 1997. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 158: 2723–2730.
44. Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, and C. Kurts. 2006. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J. Immunol.* 176: 6770–6776.
45. Mouriès, J., G. Moron, G. Schlecht, N. Escriou, G. Dadaglio, and C. Leclerc. 2008. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112: 3713–3722.
46. Mattei, F., G. Schiavoni, P. Borghi, M. Venditti, I. Canini, P. Sestili, I. Pietraforte, H. C. Morse, III, C. Ramoni, F. Belardelli, and L. Gabriele. 2006. ICSBP/IRF-8 differentially regulates antigen uptake during dendritic-cell development and affects antigen presentation to CD4+ T cells. *Blood* 108: 609–617.
47. Burgdorf, S., A. Kautz, V. Böhnert, P. A. Knolle, and C. Kurts. 2007. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316: 612–616.
48. Norbury, C. C. 2006. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117: 443–451.
49. Goodridge, H. S., C. N. Reyes, C. A. Becker, T. R. Katsumoto, J. Ma, A. J. Wolf, N. Bose, A. S. Chan, A. S. Magee, M. E. Danielson, et al. 2011. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature* 472: 471–475.
50. Watts, C., M. A. West, and R. Zaru. 2010. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 124–130.
51. Cheng, Q., H. Fan, D. Ngo, E. Beaulieu, P. Leung, C. Y. Lo, R. Burgess, Y. G. van der Zwan, S. J. White, L. M. Khachigian, et al. 2013. GILZ overexpression inhibits endothelial cell adhesive function through regulation of NF-kappaB and MAPK activity. *J. Immunol.* 191: 424–433.
52. Lebson, L., T. Wang, Q. Jiang, and K. A. Whartenby. 2011. Induction of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene limits the efficacy of dendritic cell vaccines. *Cancer Gene Ther.* 18: 563–570.
53. Burgdorf, S., V. Schuette, V. Semmling, K. Hochheiser, V. Lukacs-Kornek, P. A. Knolle, and C. Kurts. 2010. Steady-state cross-presentation of OVA is mannose receptor-dependent but inhibitable by collagen fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: E48–E49, author reply E50–E51.
54. Shurin, G. V., I. L. Tourkova, G. S. Chatta, G. Schmidt, S. Wei, J. Y. Djeu, and M. R. Shurin. 2005. Small rho GTPases regulate antigen presentation in dendritic cells. *J. Immunol.* 174: 3394–3400.
55. Schlecht, G., J. Mouriès, M. Poitrasson-Rivière, C. Leclerc, and G. Dadaglio. 2006. Purification of splenic dendritic cells induces maturation and capacity to stimulate Th1 response in vivo. *Int. Immunol.* 18: 445–452.
56. Burgdorf, S., and C. Kurts. 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 89–95.
57. Le Roux, D., A. Le Bon, A. Dumas, K. Taleb, M. Sachse, R. Sikora, M. Julithe, A. Benmerah, G. Bismuth, and F. Niedergang. 2012. Antigen stored in dendritic cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells. *Blood* 119: 95–105.
58. Jancic, C., A. Savina, C. Wasmeier, T. Tolmachova, J. El-Benna, P. M. Dang, S. Pascolo, M. A. Gougerot-Pocidallo, G. Raposo, M. C. Seabra, and S. Amigorena. 2007. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat. Cell Biol.* 9: 367–378.

Figure S1

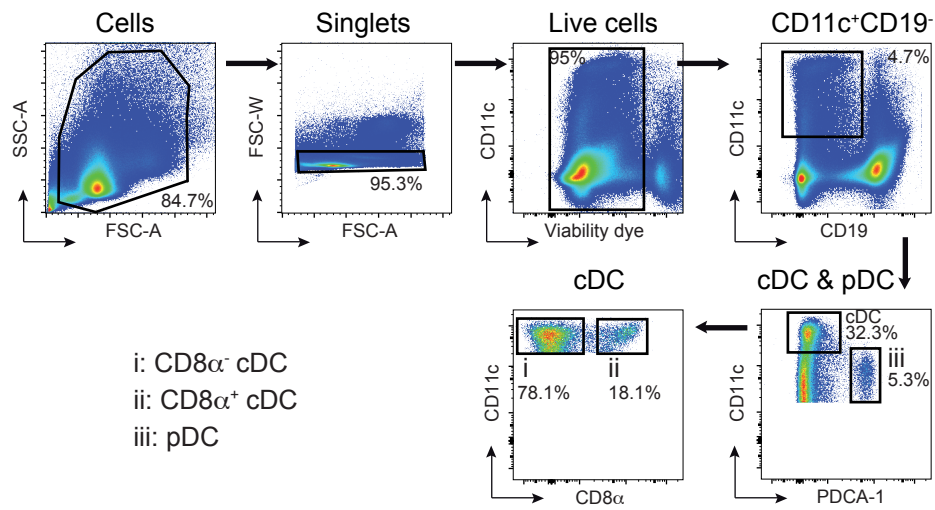


Figure S1. Gating strategy to identify DC subsets in the spleen. Spleens were harvested and digested using collagenase D. Single cell suspensions were stained with antibodies to identify DC subsets. Therefore, doublets, dead cells and CD19⁺ cells were excluded from analysis. The CD11c^{hi} conventional DC (cDC) were divided into CD8 α ⁻ (i) and CD8 α ⁺ (ii) populations. Plasmacytoid DC (pDC, iii) were identified as CD11c^{lo} PDCA-1⁺ cells. The percentages of cells in the gates are indicated in the dot plots.

Figure S2

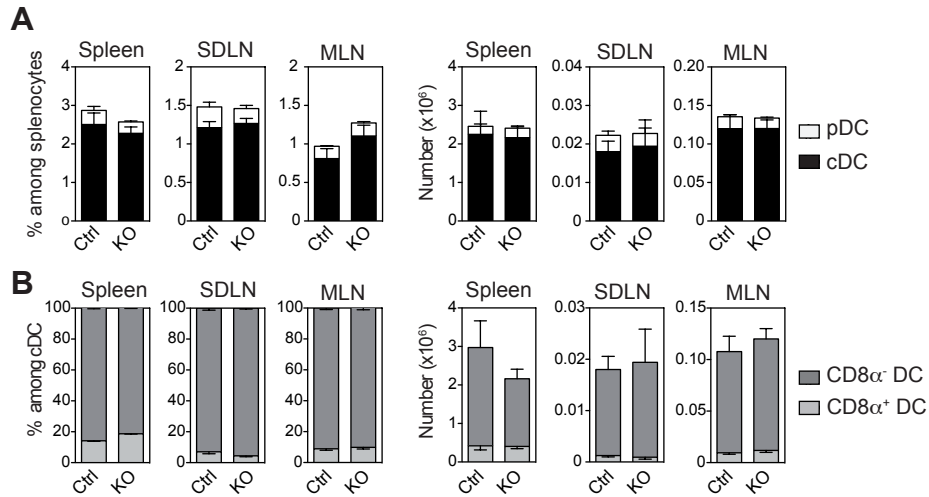


Figure S2. The frequencies and numbers of DC are not altered in CD11c-GILZ^{KO} mice. **A**, cDC and pDC were detected by flow cytometry in secondary lymphoid organs from CD11c-GILZ^{KO} and littermate control mice. Their frequencies and numbers are shown. **B**, CD8 α ⁻ and CD8 α ⁺ cDC frequencies and numbers. Results correspond to means \pm SEM and are from one representative experiment including 3 mice per group. MDLN: Mesenteric-Draining Lymph Nodes. SDLN: Skin-Draining Lymph Nodes.

Figure S3

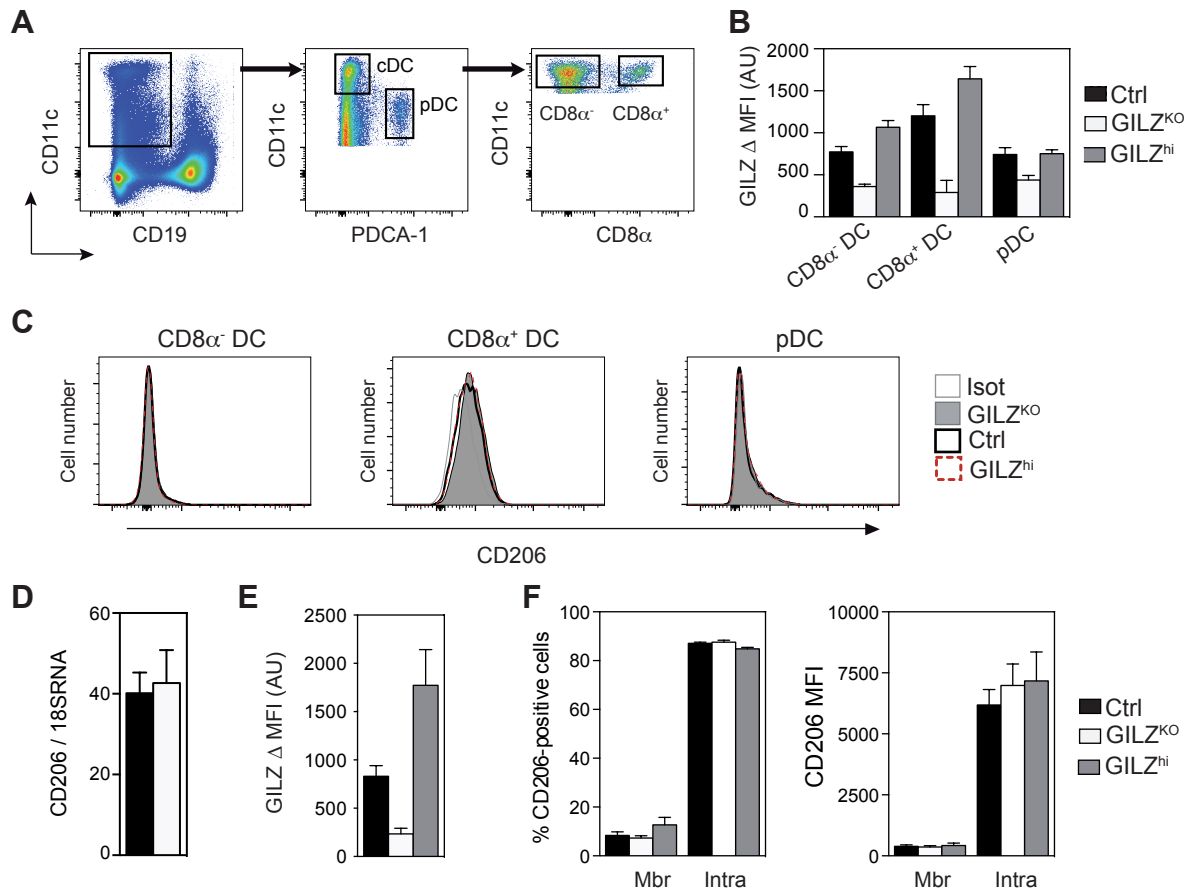


Figure S3. CD206 expression in GILZ^{KO}, GILZ^{hi} and control DC.

A, Splenic DC were harvested and stained for flow cytometry. DC subsets were identified upon CD11c, PDCA-1 and CD8 α expression as shown in the top dot plots. **B**, GILZ expression was measured in splenic DC subsets from GILZ^{KO}, GILZ^{hi} and control mice. Cumulative data from three independent experiments with 2 to 3 mice per genotype in each experiment. **C**, CD206 expression was assessed by flow cytometry in these DC subsets. Data are representative of three independent experiments. **D**, CD206 expression by GILZ^{KO} and control BM-DC was determined by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and normalized over 18S RNA. **E**, GILZ expression by GILZ^{KO}, GILZ^{hi} and control BM-DC was assessed by flow cytometry. **F**, CD206 expression by GILZ^{KO}, GILZ^{hi} and control BM-DC was assessed by flow cytometry. The frequencies of DC with a cell surface (Mbr) and intracellular (Intra) expression of CD206 and the MFI are shown (left and right panels respectively). Results in **E** and **F** correspond to means \pm SEM of the cumulative results obtained in two representative experiments including two BM-DC cultures per group.

Figure S4

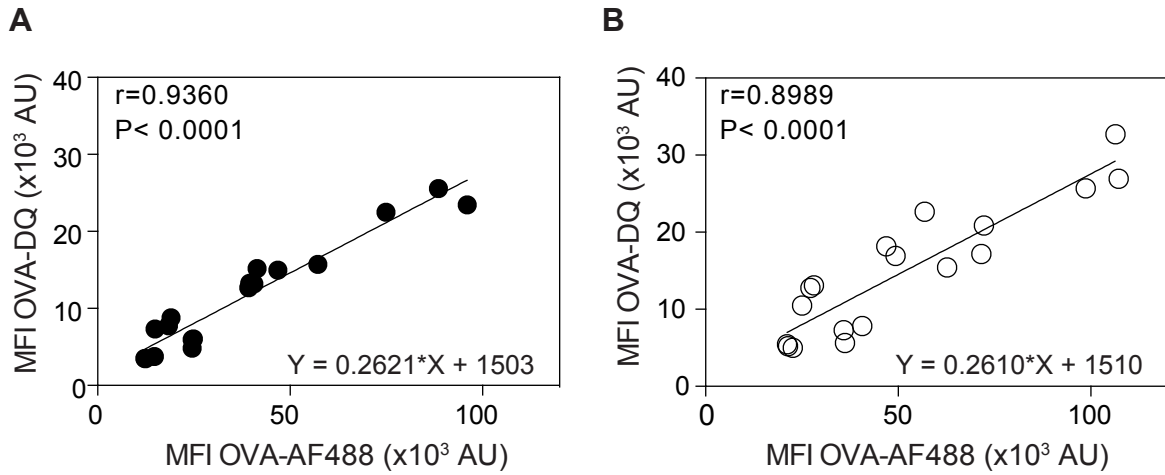


Figure S4. Correlation between OVA capture and OVA degradation. Control (**A**) and GILZ^{KO} (**B**) BM-DC were incubated with 10 or 50 µg/mL OVA-AF488 or OVA-DQ for 1h30, 5h or 18h and OVA capture or degradation were analyzed by flow cytometry. The correlation coefficient r between OVA capture and degradation was calculated with the Spearman test and is indicated with the associated P value (top left). The equation generated by linear regression is shown in each histogram ($r^2=0,9280$ for Ctrl; $r^2=0,8714$ for KO). Each symbol corresponds to one BM-DC culture for one time point and one concentration.



Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper: Fine-Tuning of Dendritic Cells Function

*Mathias Vétillard and Géraldine Schlecht-Louf**

UMR996-Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Faculté de médecine, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Clamart, France

Dendritic cells (DCs) are key antigen-presenting cells that control the induction of both tolerance and immunity. Understanding the molecular mechanisms regulating DCs commitment toward a regulatory- or effector-inducing profile is critical for better designing prophylactic and therapeutic approaches. Initially identified in dexamethasone-treated thymocytes, the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) protein has emerged as a critical factor mediating most, but not all, glucocorticoids effects in both non-immune and immune cells. This intracellular protein exerts pleiotropic effects through interactions with transcription factors and signaling proteins, thus modulating signal transduction and gene expression. GILZ has been reported to control the proliferation, survival, and differentiation of lymphocytes, while its expression confers anti-inflammatory phenotype to monocytes and macrophages. In the past twelve years, a growing set of data has also established that GILZ expression in DCs is a molecular switch controlling their T-cell-priming capacity. Here, after a brief presentation of GILZ isoforms and functions, we summarize current knowledge regarding GILZ expression and regulation in DCs, in both health and disease. We further present the functional consequences of GILZ expression on DCs capacity to prime effector or regulatory T-cell responses and highlight recent findings pointing to a broader role of GILZ in the fine tuning of antigen capture, processing, and presentation by DCs. Finally, we discuss future prospects regarding the possible roles for GILZ in the control of DCs function in the steady state and in the context of infections and chronic pathologies.

Keywords: dendritic cells, tolerance, TSC22D3, glucocorticoid-induced leucine zipper, antigen presentation, regulatory T cells

INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells (APCs), with recognized ability to orchestrate tolerance and immunity. In parallel to antigen processing, they integrate antigen- and microenvironment-associated stimuli and translate them into membrane and cytokine signals for appropriate T-cell priming and polarization or T-cell tolerization (1). Thus, DCs are key regulators of immune homeostasis and gaining knowledge in the mechanisms controlling their polarization toward tolerogenic or immunogenic APCs is of critical importance for both prophylactic and therapeutic approaches in allergy, autoimmunity, inflammatory diseases, infections, and cancers.

OPEN ACCESS

Edited by:

Pierre Guermonprez,
King's College London,
United Kingdom

Reviewed by:

Susan Kovats,
Oklahoma Medical Research
Foundation, United States
Elodie Segura,
Institut Curie, France

*Correspondence:

Géraldine Schlecht-Louf
geraldine.schlecht-louf@u-psud.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Antigen Presenting Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 February 2018

Accepted: 16 May 2018

Published: 04 June 2018

Citation:

Vétillard M and Schlecht-Louf G
(2018) Glucocorticoid-Induced
Leucine Zipper: Fine-Tuning of
Dendritic Cells Function.
Front. Immunol. 9:1232.
doi: 10.3389/fimmu.2018.01232

Transcriptomic, phenotypic, and functional analyses have identified three steady-state DC subsets in human and mouse (2, 3). Conventional DCs (cDCs) excel in antigen presentation and encompass two subpopulations, namely cDC1 and cDC2, the former being functionally specialized in cross-presentation and type 1 T-helper (Th1) responses induction and the latter promoting Th2 and Th17 T-cell responses (4). The third subset corresponds to plasmacytoid DCs (pDCs) that are specialized in antiviral immunity (5). While each DC subset displays specialized immune-activating functions, all of them have also been shown to promote tolerance and favor regulatory T cells (Treg) differentiation, expansion, and/or activation in certain contexts. This points to mechanisms controlling DCs' functional switch between tolerogenic and immunogenic APCs (6–8). In addition to these three well-defined DC subsets, inflammatory DCs can arise from monocytes in the course of inflammation, which contribute to innate immune responses and T-cell priming (9).

Among factors reported to skew DCs maturation toward a tolerogenic profile (10), glucocorticoids (GCs), rapamycin, interleukin (IL)-10, transforming growth factor- β (TGF- β), and vitamin D3 (vitD3) have been shown to promote the expression of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) protein (11). GILZ was initially described in murine thymocytes treated with synthetic GCs (Dexamethasone, Dex) (12), but this intracellular protein is expressed in most tissues, including immune cells (12–19). GILZ has since been demonstrated to mediate GCs' effects in human DCs (20, 21) and has more generally emerged as a regulator of DCs tolerogenic function in both mouse and human (20–27). More recently, we have unraveled that GILZ expression by DCs controls their efficiency at antigen capture and cross-presentation (27), suggesting that the extent of GILZ action in DCs may be broader than initially expected.

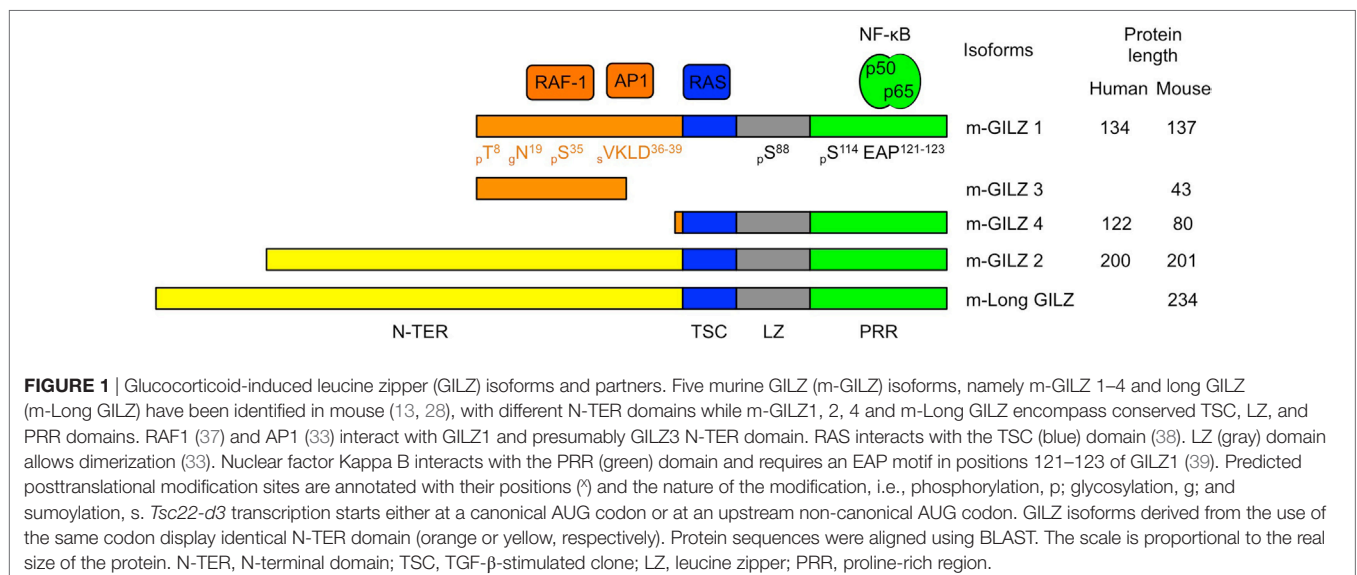
Herein, we provide a comprehensive review of recent insights into GILZ expression and functions in DCs and emphasize its implication as a regulator of DCs function, which modulates

key processes ranging from antigen capture and presentation to functional maturation and T-cell priming.

GILZ'S GENERAL PROPERTIES

Glucocorticoid-induced leucine zipper is encoded by the TGF- β -stimulated clone (TSC) 22 domain family protein 3 (*Tsc22d3*) gene located on the X-chromosome and is constitutively expressed in most tissues (12, 16, 28). GILZ is among the earliest and highest GC-induced genes. In addition to GC response elements, GILZ promoter harbors binding sites for several transcription factors, including Forkhead-Box O3, C-AMP Response Element-Binding protein, and Serum Responsive Factor. Two E-boxes, one GATA Box as well as putative-binding sites for signal transducer and activator of transcription 6, nuclear factor of activated T-cells and Octamer are also reported (29–32). Five GILZ isoforms exist in mouse, generated upon use of alternative initiation and splicing sites (13, 28). They differ in their N-terminal parts but four of them share conserved TSC and Leucine Zipper (LZ) domains and a C-terminal proline-rich region (PRR) (Figure 1). The term GILZ usually refers to the 137 amino acid (aa)-long GILZ1/*Tsc22d3*-2 protein in mouse and to the 134 aa-long isoform in human. As only this canonical isoform has been studied in DCs so far (20, 23, 24, 26, 27), we will adopt this nomenclature. Nevertheless, the other GILZ isoforms could be of functional relevance in DCs, as they may modulate GILZ1 function upon dimerization (33), competition, or ensure autonomous function owing to their unique N-terminal domain. GILZ has a short half-life [2–3 h (34–36)] and is quickly degraded upon ubiquitin-proteasome degradation (34). Several sites for posttranslational modification have been predicted in GILZ sequence (Figure 1), but only polyubiquitination by K48 ubiquitins has been confirmed so far (34).

In mouse lymphocytes, GILZ controls a wide range of processes including their activation, proliferation, survival, and differentiation (12, 40–43). GILZ also confers anti-inflammatory



phenotype to innate immune cells, including human monocytes (25, 44, 45), mouse and human macrophages (35, 36, 46–48), human mastocytes (49), and mouse and human neutrophils (50, 51). Studies mostly done in T cells have reported that GILZ can exert its pleiotropic effects through direct interactions with transcription factors and signaling proteins, according to its cytoplasmic and nuclear distribution (12). GILZ directly binds to NF- κ B-p65 (39, 46, 52), AP-1 (33), C/EBP (53), PU.1 (51) and prevents the nuclear translocation of FoxO3 (54). GILZ also interacts with Ras, Raf-1, and mTORC2, thereby inhibiting the MEK/ERK-1/2 and mTORC2/AKT pathways respectively (37, 38, 55). Finally, GILZ can also associate with nuclear DNA (19, 51, 56, 57) and modulate transcription upon competition with positive Th17-polarization regulators (56, 57) or relief of PU.1-mediated repression (51).

GILZ EXPRESSION IN DCs

Glucocorticoid-induced leucine zipper expression by steady-state human and murine DCs was initially reported by our group, using quantitative RT-PCR, Western Blot, and flow cytometry (21, 23, 27). In mouse, we further documented heterogeneity in GILZ levels among splenic DC subsets, the cDC1 population displaying higher levels than the cDC2 and pDC subsets (27). As in monocytes (25, 44, 45), GILZ mRNA is quickly downregulated upon human blood DCs culture *ex vivo* (21), pointing to the requirement for an active mechanism to maintain GILZ expression in these cells. This tonic signal is most likely provided, at least in part, by endogenous GCs as *in vivo* glucocorticoid receptor (GR) blockade reduces GILZ expression in murine splenocytes (58). Accordingly, GILZ mRNA levels follow robust circadian rhythm in adipose tissue and muscle (59–61), and increase, upon restraint stress, in spleen and macrophages (62). However, daytime and stress-induced variations of GILZ levels in DCs have not been explored so far. As in other cell types, exogenous GCs promote GILZ expression in DCs, both *in vitro* and *in vivo* (11, 20, 21, 25, 58, 63). Thus, GILZ expression, which is quite low in mouse bone marrow-derived DCs (BMDCs) (23, 26, 27) and absent in human monocytes-derived DCs (Mo-DCs) (20, 45) is dose-dependently upregulated upon Dex treatment (11, 20, 45). GILZ transcription in Mo-DCs is modulated by DC-SCRIPT, a co-repressor of GR (64, 65) (**Figure 2**). Remarkably, DC-SCRIPT mRNA is selectively and highly expressed in cDCs in the steady state, but not in other immune cells [The Immunological Genome Project (66)], suggesting a cDC-specific limitation of GILZ induction by GCs. While the contribution of DC-SCRIPT to GILZ level control in DC-subsets and its modulation upon cell-activation remain to be explored *in vivo*, the selective limitation of GR-induced GILZ expression in cDCs could potentiate the impact of other GILZ-inducing factors in these cells. Indeed, several molecules present in tissues at the steady state, such as vitD3 (11) and hepatocyte growth factor (HGF) (22), or produced in immunosuppressive microenvironments, as IL-10 and TGF- β , promote GILZ expression in DCs (20, 22, 25), supporting the hypothesis that GILZ is primarily induced in anti-inflammatory contexts (**Figure 2**). However, GILZ is also overexpressed in clinical grade Mo-DCs

exposed to a maturation cocktail containing TNF- α , IL-1 β , IL-6, and PGE2 (24), suggesting that pro-inflammatory factors can upregulate GILZ levels in certain conditions.

So far, few microbial products were tested for their ability to control GILZ expression in DCs. Mouse DCs exposure to lipopolysaccharides downregulates GILZ at the transcript and protein levels, *in vitro* and *in vivo* (26, 27) (**Figure 2**). Conversely, fungal proteases from *Aspergillus oryzae* promote GILZ overexpression in human Mo-DCs, independently from the GR (68). Alteration of GILZ expression by microbial products has been reported in other cell types. In human epithelial cells, *Yersinia enterocolitica* YopT and *Clostridium difficile* Toxin B induce GILZ expression through USF-1 and -2 binding to *TSC22D3* promoter (31). In microglia, *Tsc22d3* was among the most downregulated genes from antibiotic-treated mice, suggesting a possible contribution of tonic signals from microbiota to GILZ levels control (69). Regarding viruses, Chikungunya and Respiratory Syncytial Virus infections downregulate GILZ expression in primary murine astrocytes (70) and in human epithelial cells (71), respectively. Conversely, Infectious Bursal Disease Virus protein VP4 suppresses GILZ degradation (34), thereby preventing type 1 IFN production in human fibroblast and keratinocyte cell lines (72). Whether GILZ modulation in the course of infections also occurs in DCs and the possible consequences and importance of such regulation remain to be addressed.

Altered GILZ expression in DCs has also been reported in the course of chronic pathologies. Blood DCs from respiratory allergic patients harbor reduced GILZ levels as compared to non-allergic healthy volunteers (21). Besides, GILZ overexpression has been found in tumor-associated DCs from A20 B-cell lymphoma-engrafted mice (26). While GILZ levels in tumor-infiltrating DCs have not been studied in humans so far, the hypothesis that GILZ could be induced in such pathologies is supported by the high GILZ expression detected in infiltrating macrophages in Burkitt's lymphoma (46). Regarding the mechanisms that could contribute to such GILZ induction, Wang et al. found that hypoxia upregulated GILZ expression in macrophages and rats spleens (62). In addition, Lebson et al. reported GILZ induction in BMDCs exposed to A20- and B16-tumor cells conditioned medium, pointing to a role for soluble factors in this increased expression (26). These factors may include known GILZ inducers as reported in epithelial cell-conditioned medium-treated BMDCs (67). Additional studies have pointed to GILZ levels modulation in cells other than DCs during chronic inflammation. Thus, GILZ expression is reduced in skin lesions from atopic dermatitis (73) and psoriasis patients (63), as well as in macrophages from Crohn's disease granuloma (46). Conversely, GILZ is overexpressed in the synovia of patients with active rheumatoid arthritis (RA) (58). Whether GILZ acts as an endogenous inhibitor of inflammation, as suggested by exacerbated imiquimod-induced psoriatic-like lesions in GILZ knock-out mice (63) and increased inflammation upon GILZ knock-down in synovial tissues in a murine model of RA (58), or whether it primarily mediates exogenous GCs effects (43) remains debated. The contribution of GILZ induction to GCs therapeutic effects is supported by several studies, two of them having assessed it in DCs. First, restoration of GILZ

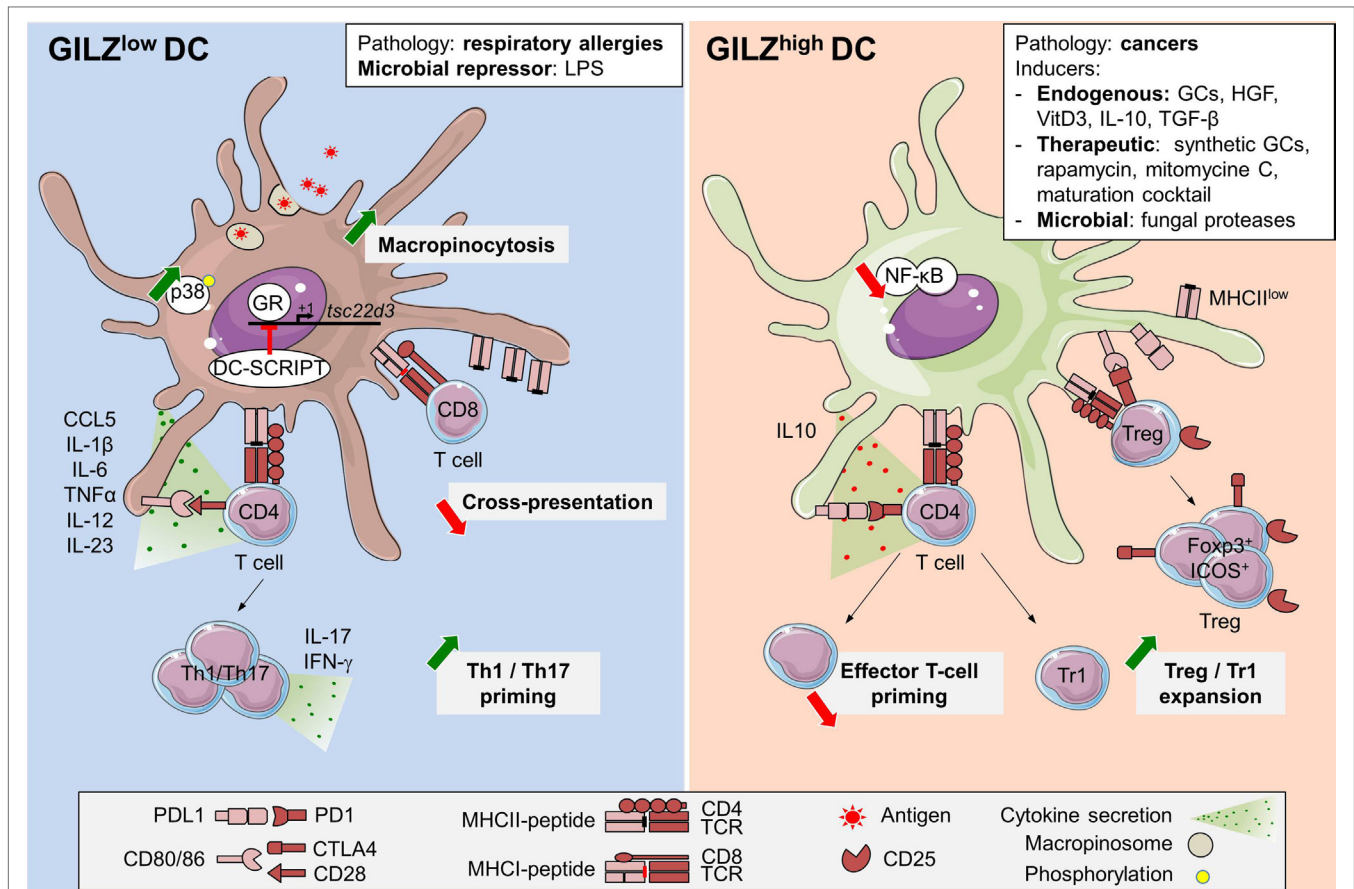


FIGURE 2 | Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) regulation and functions in dendritic cells (DCs). GILZ expression in DCs can be induced by steady-state factors (11, 21, 22), immunosuppressive cytokines like TGF-β or interleukin (IL)-10 (20, 25), DC-maturation cocktail containing TNF-α, IL-1β, IL-6, and PGE2 (24), cell-derived factors (26, 45, 67), immunosuppressive drugs as synthetic GCs, rapamycin, and mitomycin C (11), fungal proteases (68), and cancer microenvironment (26). So far, the only exogenous GILZ repressor reported in DCs is LPS (26, 27). In addition, GILZ levels are reduced in blood DCs from respiratory allergic patients (21). DC-SRIPT acts as an endogenous GR-repressor, thus limiting GILZ induction upon GCs exposure (64, 65). High GILZ levels promote PD-L1 expression and IL-10 production while limiting IL-12 and IL-23 secretion. Thus, GILZ^{hi} DCs are poor inducers of Th1 and Th17 T cells but efficient Treg and Tr1 activators (20, 23, 25). GILZ inhibits NF-κB functions upon interaction with p65 subunit (39, 46, 52). GILZ repression promotes macropinocytosis, likely upon increased p38-MAPK phosphorylation (27). GILZ deletion reduces antigen cross-presentation (27). GCs, glucocorticoids; TGF-β, transforming growth factor-β; IL-10, interleukin-10; HGF, hepatocyte growth factor; LPS, lipopolysaccharide; ICOS, inducible co-stimulator; Foxp3, Forkhead box p3; NF-κB, nuclear factor kappa B; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein; Tr1, Type 1 regulatory T cells; Treg, regulatory T cells; p38-MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; GR, glucocorticoid receptor; cDC, conventional dendritic cell; *tsc22d3*, TGF-β-stimulated clone (TSC) 22 domain family protein 3.

expression in DCs to normal levels was required for the increase of IL-10⁺CD4⁺ T cells, known to mediate oral GC-therapy beneficial effects in respiratory allergic patients (21). Second, in lupus patients, GILZ/prednisolone ratios in pDCs and myeloid DCs exhibited a negative correlation with disease activity (74). In addition to GCs, several therapeutic agents have been reported to induce GILZ in DCs, although the importance of this expression for their effects has not been explored. Thus, GILZ was identified among the most induced genes in Mo-DCs treated by Mitomycin C (75) and the Ca²⁺-targeting drug rapamycin (11) (**Figure 2**). Altogether, these data identify GILZ as a common intracellular marker upregulated upon treatment with several immunosuppressive therapeutic molecules. However, its importance in the drug's effect on DCs function has been proven only for GCs so far.

FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF GILZ EXPRESSION IN DCs

Seminal work from our laboratory established that GILZ was required for Dex-, IL-10- and TGF-β-induced downregulation of CD80, CD86, and CD83 costimulatory molecules and the increase of immunoglobulin-like transcript 3, programmed death ligand 1 (PD-L1), and IL-10 in human DCs. These results were obtained in Mo-DCs and CD34⁺ cells-derived DCs, using both lentiviral transduction to overexpress GILZ and RNA-interference on Dex-treated cells to demonstrate GILZ requirement in the tolerogenic polarization of DCs (20, 25). Other groups established that GILZ was necessary for Dex-induced CD86 downregulation in BMDCs (26), PD-L1 induction, and IL-12 inhibition in clinical grade human DCs matured with a standard

cocktail (24) and IL-10 secretion by splenic DCs isolated from HGF-treated mice in the course of experimental autoimmune encephalitis (22). GILZ overexpression was then further associated with regulatory phenotype in both human and mouse DCs (11, 23, 68). Of note, in certain studies, the GILZ^{hi}PD-L1^{hi} DCs retained high expression of costimulatory molecules (22, 24). Using mice constitutively overexpressing GILZ in DCs (CD11c-GILZ^{hi}) and in line with the report of Cohen et al. (25), we could establish that the sole increase of GILZ levels did not alter DCs steady-state phenotype nor cytokine secretion, suggesting that the consequences of GILZ overexpression may depend on the context of GILZ induction. However, upon cognate interaction with T cells *in vivo*, GILZ^{hi} DCs produced higher amounts of IL-10 than control DCs and presented reduced MHC class II molecules levels (23), confirming their regulatory commitment. Additional insights into the importance of GILZ expression for DCs function came from total (63) and conditional (27) GILZ^{KO} mouse models. While these studies pointed to minor impact of GILZ deletion on DCs phenotype (27, 63), the cytokine response to TLR4 and TLR7 stimulations was markedly increased in GILZ^{KO} BMDCs, with higher IL-1 α and β , IL-6, and IL-23 secretion (63), in line with GILZ inhibition promoting IL-12, TNF- α , and CCL5 production by Mo-DCs (20, 24, 45). In conclusion, GILZ expression in DCs promotes immature phenotype and IL-10 production while limiting secretion of Th1- and Th17-inducing cytokines (Figure 2), thereby favoring DCs polarization toward a tolerogenic profile (20–27).

The consequences of GILZ levels in DCs on their capacity to activate T-cell responses were first investigated in recall responses toward vaccine and cytomegalovirus antigens (20, 24). In these studies, Dex-induced GILZ^{hi} human Mo-DCs promoted poor autologous CD4⁺ T-cell proliferation and IFN- γ production, and this was reversed upon GILZ silencing. Along this line, clinical grade activated Mo-DCs were later shown to activate more efficiently CD8⁺ T-cell secondary responses when GILZ was knocked-down (24). Similar results were obtained for primary T-cell responses *in vivo*, the adoptive transfer of GILZ^{hi} DCs inducing poor effector T-cell (Teff) activation and IFN- γ secretion (23) while that of GILZ^{KO} (22) or GILZ-silenced (26) DCs led to enhanced CD4⁺ T cell proliferation, activation, as well as IFN- γ and IL-17 production (Figure 2). Remarkably, the poor Teff activation by GILZ^{hi} DCs was associated with the expansion of antigen-specific IL-10⁺CD4⁺ T cells in both human and mouse (20–23), which was abolished by GILZ silencing or genetic deletion in DCs (20–22). These IL-10⁺CD4⁺ T cells included Foxp3⁻ cells, a phenotype consistent with Tr1 cells (20, 21), and Foxp3⁺ Treg (20–23), and inhibited Mo-DCs-induced autologous CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation through an IL-10-dependent antigen-specific mechanism (20, 21). We further established *in vivo* that Treg expansion by GILZ^{hi} DCs was abrogated upon depletion of pre-existing Treg (20, 23), supporting the conclusion that GILZ^{hi} DCs could expand thymus-derived Treg (tTreg) more efficiently than control DCs. Such an expansion might explain the spontaneous accumulation of Treg in CD11c-GILZ^{hi} mice, with an increased frequency of inducible co-stimulator (ICOS)^{hi} Treg. Importantly, in the absence of transferred tTreg, GILZ^{hi} DCs still poorly induced conventional

T cells activation, thus suggesting that GILZ^{hi} DCs were intrinsically inefficient in Teff priming, a characteristic of tolerogenic DCs (10). Altogether, the results from these studies identify GILZ expression levels in DCs as a critical switch controlling their ability to prime Teff versus Treg, mediating Dex- and HGF-induced effects on DCs phenotype, cytokine secretion, and T-cell priming capacities and required for their beneficial effects in respiratory allergic patients (21) and experimental autoimmune encephalitis (22).

Finally, GILZ expression in murine DCs has also been shown to control their antigen capture capacity. The initial report was made by Lebson et al., who observed that GILZ silencing led to increased ovalbumine (OVA) capture in BMDCs (26). Consistently, analysis of antigen uptake by DCs from CD11c-GILZ^{KO} mice revealed an increase in Dextran-FITC internalization by the splenic cDC1 subset *in vivo*. Using GILZ^{KO} and GILZ^{hi} BMDCs, we showed that GILZ selectively regulated Dextran, OVA, and Lucifer Yellow macropinocytosis, but not the phagocytosis of particulate zymosan. This control operated in immature and recently activated BMDCs, through a mechanism that may at least partly depend on the control of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation (27). The fact that GILZ limits antigen internalization while Dex-treated DCs display enhanced antigen capture (76, 77) points to opposite effects of GILZ and GCs on certain DCs functions. Unexpectedly, the higher OVA macropinocytosis in GILZ^{KO} DCs did not result in increased peptide presentation to a CD4⁺ T-cell hybridoma and was even associated to reduced cross-presentation to a CD8⁺ T-cell hybridoma, despite efficient antigen degradation (27). These results suggested that the fine-tuning of antigen capture by GILZ in DCs might serve to regulate the quality rather than quantity of antigen available for presentation to T cells. It might also regulate antigen internalization for later transfer to B cells (78). Alternatively, GILZ might control additional steps in the antigen degradation and/or cross-presenting machinery of DCs. Further studies will be needed to address the physiological relevance of GILZ-mediated macropinocytosis modulation in DC subsets in adequate models *in vivo*. The link established between the macropinocytic process and the regulation of DC migration (79–81) suggests that GILZ expression might also control DCs trafficking *in vivo*, a question deserving dedicated analysis.

CONCLUSION

Glucocorticoid-induced leucine zipper has initially been identified in DCs as a key mediator of GCs' effects, piloting DCs commitment toward a tolerogenic profile. Indeed, GILZ promotes immature phenotype and IL-10 production in DCs while limiting secretion of IL-12 and IL-23, thus favoring regulatory responses. In addition, GILZ also regulates DCs access to antigen by modulating macropinocytosis, thus pointing to its regulatory role at many steps of DCs function. Recent studies have revealed that GILZ expression in DCs is constitutive and can be modulated by their ontogeny and microenvironment, with cell-specific regulatory systems. Thus, GILZ may control DCs access to antigen and the issue of their interactions with T cells in the steady state

as well as in certain pathologies. Furthermore, considering the wide effects reported for GILZ in other cell types, GILZ might impact DC biology in an even broader scale with possible effects on proliferation, cell survival, and migration. Deciphering the regulation of GILZ expression in DCs as well as its role in DC subsets function *in vivo* will deserve additional studies, which will provide insights into the fine mechanisms controlling DCs and might open new avenues for therapeutic approaches.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MV and GS-L jointly wrote the review and prepared the figures.

REFERENCES

- Pulendran B. The varieties of immunological experience: of pathogens, stress, and dendritic cells. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:563–606. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075049
- Guilliams M, Dutertre CA, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al. Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity* (2016) 45(3):669–84. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.015
- See P, Dutertre CA, Chen J, Gunther P, McGovern N, Irac SE, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* (2017) 356:6342. doi:10.1126/science.aag3009
- Vu Manh TP, Bertho N, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M. Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions. *Front Immunol* (2015) 6:260. doi:10.3389/fimmu.2015.00260
- Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(8):471–85. doi:10.1038/nri3865
- Lutz MB. Induction of CD4(+) regulatory and polarized effector/helper T cells by dendritic cells. *Immune Netw* (2016) 16(1):13–25. doi:10.4110/in.2016.16.1.13
- Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K. Tolerance through education: how tolerogenic dendritic cells shape immunity. *Front Immunol* (2017) 8:1764. doi:10.3389/fimmu.2017.01764
- Iberg CA, Jones A, Hawiger D. Dendritic cells as inducers of peripheral tolerance. *Trends Immunol* (2017) 38(11):793–804. doi:10.1016/j.it.2017.07.007
- Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* (2013) 34(9):440–5. doi:10.1016/j.it.2013.06.001
- Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol* (2014) 5:7. doi:10.3389/fimmu.2014.00007
- Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129(4):1020–30. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.014
- D'Adamo F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* (1997) 7(6):803–12. doi:10.1016/S1074-7613(00)80398-2
- Bruscoli S, Donato V, Velardi E, Di Sante M, Migliorati G, Donato R, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem* (2010) 285(14):10385–96. doi:10.1074/jbc.M109.070136
- Bruscoli S, Velardi E, Di Sante M, Bereshchenko O, Venanzi A, Coppo M, et al. Long glucocorticoid-induced leucine zipper (L-GILZ) protein interacts with ras protein pathway and contributes to spermatogenesis control. *J Biol Chem* (2012) 287(2):1242–51. doi:10.1074/jbc.M111.316372
- Cannarile L, Zollo O, D'Adamo F, Ayroldi E, Marchetti C, Tabilio A, et al. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ* (2001) 8(2):201–3. doi:10.1038/sj.cdd.4400798

ACKNOWLEDGMENTS

This work benefited from data assembled by the Immgen Consortium. We thank Rim Makni-Bejar for correcting grammatical and syntax errors.

FUNDING

This work was supported by the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. MV is supported by a doctoral fellowship from the Doctoral School “Innovation Thérapeutique du fondamental à l’appliqué” (ED 569).

- Cari L, Ricci E, Gentili M, Petrillo MG, Ayroldi E, Ronchetti S, et al. A focused real time PCR strategy to determine GILZ expression in mouse tissues. *Results Immunol* (2015) 5:37–42. doi:10.1016/j.rinim.2015.10.003
- Eddleston J, Herschbach J, Wagelie-Steffen AL, Christiansen SC, Zuraw BL. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* (2007) 119(1):115–22. doi:10.1016/j.jaci.2006.12.532
- Robert O, Boujedidi H, Bigorgne A, Ferrere G, Voican CS, Vettorazzi S, et al. Decreased expression of the glucocorticoid receptor-GILZ pathway in Kupffer cells promotes liver inflammation in obese mice. *J Hepatol* (2016) 64(4):916–24. doi:10.1016/j.jhep.2015.11.023
- Shi X, Shi W, Li Q, Song B, Wan M, Bai S, et al. A glucocorticoid-induced leucine zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep* (2003) 4(4):374–80. doi:10.1038/sj.embor.embor805
- Hamdi H, Godot V, Maillot MC, Prejean MV, Cohen N, Krzysiek R, et al. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* (2007) 110(1):211–9. doi:10.1182/blood-2006-10-052506
- Karaki S, Garcia G, Tcherakian C, Capel F, Tran T, Pallardy M, et al. Enhanced glucocorticoid-induced leucine zipper in dendritic cells induces allergen-specific regulatory CD4(+) T-cells in respiratory allergies. *Allergy* (2014) 69(5):624–31. doi:10.1111/all.12379
- Benkhoucha M, Molnarfi N, Dunand-Sauthier I, Merkler D, Schneiter G, Bruscoli S, et al. Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via glucocorticoid-induced leucine zipper expression in dendritic cells. *J Immunol* (2014) 193(6):2743–52. doi:10.4049/jimmunol.1302338
- Calmette J, Ellouze M, Tran T, Karaki S, Ronin E, Capel F, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion *in vivo*. *J Immunol* (2014) 193(12):5863–72. doi:10.4049/jimmunol.1400758
- Cathelin D, Met O, Svane IM. Silencing of the glucocorticoid-induced leucine zipper improves the immunogenicity of clinical-grade dendritic cells. *Cytotherapy* (2013) 15(6):740–9. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.005
- Cohen N, Mouly E, Hamdi H, Maillot MC, Pallardy M, Godot V, et al. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* (2006) 107(5):2037–44. doi:10.1182/blood-2005-07-2760
- Lebson L, Wang T, Jiang Q, Whartenby KA. Induction of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene limits the efficacy of dendritic cell vaccines. *Cancer Gene Ther* (2011) 18(8):563–70. doi:10.1038/cgt.2011.23 Epub 2011/05/07.
- Calmette J, Bertrand M, Vétillard M, Ellouze M, Flint S, Nicolas V, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper protein controls macropinocytosis in dendritic cells. *J Immunol* (2016) 197(11):4247–56. doi:10.4049/jimmunol.1600561
- Soundararajan R, Wang J, Melters D, Pearce D. Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms. *J Biol Chem* (2007) 282(50):36303–13. doi:10.1074/jbc.M707287200
- Asselin-Labat ML, Biola-Vidamment A, Kerbrat S, Lombes M, Bertoglio J, Pallardy M. FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Mol Endocrinol* (2005) 19(7):1752–64. doi:10.1210/me.2004-0206

30. Asselin-Labat ML, David M, Biola-Vidamment A, Lecoecueche D, Zennaro MC, Bertoglio J, et al. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* (2004) 104(1):215–23. doi:10.1182/blood-2003-12-4295
31. Koberle M, Goppel D, Grandt T, Gaentzsch P, Manncke B, Berchtold S, et al. *Yersinia enterocolitica* YopT and *Clostridium difficile* toxin B induce expression of GILZ in epithelial cells. *PLoS One* (2012) 7(7):e40730. doi:10.1371/journal.pone.0040730
32. Ng HP, Jennings S, Wang J, Molina PE, Nelson S, Wang G. Non-canonical glucocorticoid receptor transactivation of gilz by alcohol suppresses cell inflammatory response. *Front Immunol* (2017) 8:661. doi:10.3389/fimmu.2017.00661
33. Mittelstadt PR, Ashwell JD. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* (2001) 276(31):29603–10. doi:10.1074/jbc.M101522200
34. He Z, Chen X, Fu M, Tang J, Li X, Cao H, et al. Infectious bursal disease virus protein VP4 suppresses type I interferon expression via inhibiting K48-linked ubiquitylation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *Immunobiology* (2017) 223(4–5):374–82. doi:10.1016/j.imbio.2017.10.048
35. Hoppstadter J, Diesel B, Eifler LK, Schmid T, Brune B, Kierner AK. Glucocorticoid-induced leucine zipper is downregulated in human alveolar macrophages upon toll-like receptor activation. *Eur J Immunol* (2012) 42(5):1282–93. doi:10.1002/eji.201142081
36. Hoppstadter J, Kierner AK. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in immuno suppression: master regulator or bystander? *Oncotarget* (2015) 6(36):38446–57. doi:10.18632/oncotarget.6197
37. Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol* (2002) 22(22):7929–41. doi:10.1128/MCB.22.22.7929-7941.2002
38. Ayroldi E, Zollo O, Bastianelli A, Marchetti C, Agostini M, Di Virgilio R, et al. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest* (2007) 117(6):1605–15. doi:10.1172/JCI30724
39. Di Marco B, Massetti M, Bruscoli S, Macchiarulo A, Di Virgilio R, Velardi E, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* (2007) 35(2):517–28. doi:10.1093/nar/gkl1080
40. Bereshchenko O, Coppo M, Bruscoli S, Biagioli M, Cimino M, Frammartino T, et al. GILZ promotes production of peripherally induced Treg cells and mediates the crosstalk between glucocorticoids and TGF-beta signaling. *Cell Rep* (2014) 7(2):464–75. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.004
41. Cannarile L, Cuzzocrea S, Santucci L, Agostini M, Mazzon E, Esposito E, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis. *Gastroenterology* (2009) 136(2):530–41. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.024
42. Cannarile L, Fallarino F, Agostini M, Cuzzocrea S, Mazzon E, Vacca C, et al. Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines. *Blood* (2006) 107(3):1039–47. doi:10.1182/blood-2005-05-2183
43. Ngo D, Beaulieu E, Gu R, Leaney A, Santos L, Fan H, et al. Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of inflammation and arthritis. *Arthritis Rheum* (2013) 65(5):1203–12. doi:10.1002/art.37858
44. Ehrchen J, Steinmuller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, et al. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood* (2007) 109(3):1265–74. doi:10.1182/blood-2006-02-001115
45. Futterleib JS, Feng H, Tigelaar RE, Choi J, Edelson RL. Activation of GILZ gene by photoactivated 8-methoxypsoralen: potential role of immunoregulatory dendritic cells in extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apher Sci* (2014) 50(3):379–87. doi:10.1016/j.transci.2013.10.003
46. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* (2003) 101(2):729–38. doi:10.1182/blood-2002-02-0538
47. Pinheiro I, Dejager L, Petta I, Vandevyver S, Puimege L, Mahieu T, et al. LPS resistance of SPRET/Ei mice is mediated by Gilz, encoded by the Tsc22d3 gene on the X chromosome. *EMBO Mol Med* (2013) 5(3):456–70. doi:10.1002/emmm.201201683 Epub 2013/03/16,
48. Yang YH, Aeberli D, Dacumos A, Xue JR, Morand EF. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J Immunol* (2009) 183(2):1435–45. doi:10.4049/jimmunol.0804000
49. Godot V, Garcia G, Capel F, Arock M, Durand-Gasselini I, Asselin-Labat ML, et al. Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells. *Allergy* (2006) 61(7):886–90. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01065.x
50. Espinasse MA, Hajage D, Montravers P, Piednoir P, Dufour G, Tubach F, et al. Neutrophil expression of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) anti-inflammatory protein is associated with acute respiratory distress syndrome severity. *Ann Intensive Care* (2016) 6(1):105. doi:10.1186/s13613-016-0210-0
51. Ricci E, Ronchetti S, Pericolini E, Gabrielli E, Cari L, Gentili M, et al. Role of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene in dexamethasone-induced inhibition of mouse neutrophil migration via control of annexin A1 expression. *FASEB J* (2017) 31(7):3054–65. doi:10.1096/fj.201601315R
52. Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, et al. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* (2001) 98(3):743–53. doi:10.1182/blood.V98.3.743
53. Pan G, Cao J, Yang N, Ding K, Fan C, Xiong WC, et al. Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in bone acquisition. *J Biol Chem* (2014) 289(28):19373–82. doi:10.1074/jbc.M113.535237
54. Latre de Late P, Pepin A, Assaf-Vandecasteele H, Espinasse C, Nicolas V, Asselin-Labat ML, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner. *J Biol Chem* (2009) 285(8):5594–605. doi:10.1074/jbc.M109.068346
55. Joha S, Nugues AL, Hetuin D, Berthon C, Dezitter X, Dauphin V, et al. GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL(+) cells. *Oncogene* (2012) 31(11):1419–30. doi:10.1038/ncr.2011.328
56. Luz-Crawford P, Espinosa-Carrasco G, Ipseiz N, Contreras R, Tejedor G, Medina DA, et al. Gilz-activin A as a novel signaling axis orchestrating mesenchymal stem cell and Th17 cell interplay. *Therapeutics* (2018) 8(3):846–59. doi:10.7150/thno.21793
57. Yosef N, Shalek AK, Gaubblomme JT, Jin H, Lee Y, Awasthi A, et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* (2013) 496(7446):461–8. doi:10.1038/nature11981
58. Beaulieu E, Ngo D, Santos L, Yang YH, Smith M, Jorgensen C, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper is an endogenous antiinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis Rheum* (2010) 62(9):2651–61. doi:10.1002/art.27566
59. Ayyar VS, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ. Mechanistic multi-tissue modeling of glucocorticoid-induced leucine zipper regulation: integrating circadian gene expression with receptor-mediated corticosteroid pharmacodynamics. *J Pharmacol Exp Ther* (2017) 363(1):45–57. doi:10.1124/jpet.117.242990
60. Gimble JM, Ptityn AA, Goh BC, Hebert T, Yu G, Wu X, et al. Delta sleep-inducing peptide and glucocorticoid-induced leucine zipper: potential links between circadian mechanisms and obesity? *Obes Rev* (2009) 10(Suppl 2):46–51. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00661.x
61. Miller BH, McDearmon EL, Panda S, Hayes KR, Zhang J, Andrews JL, et al. Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(9):3342–7. doi:10.1073/pnas.0611724104
62. Wang Y, Ma YY, Song XL, Cai HY, Chen JC, Song LN, et al. Upregulations of glucocorticoid-induced leucine zipper by hypoxia and glucocorticoid inhibit proinflammatory cytokines under hypoxic conditions in macrophages. *J Immunol* (2012) 188(1):222–9. doi:10.4049/jimmunol.1002958
63. Jones SA, Perera DN, Fan H, Russ BE, Harris J, Morand EF. GILZ regulates Th17 responses and restrains IL-17-mediated skin inflammation. *J Autoimmun* (2015) 61:73–80. doi:10.1016/j.jaut.2015.05.010
64. Hontelez S, Karthaus N, Looman MW, Ansems M, Adema GJ. DC-SCRIPT regulates glucocorticoid receptor function and expression of its target GILZ in dendritic cells. *J Immunol* (2013) 190(7):3172–9. doi:10.4049/jimmunol.1201776
65. Sondergaard JN, Poghosyan S, Hontelez S, Louche P, Looman MW, Ansems M, et al. DC-SCRIPT regulates IL-10 production in human dendritic cells by modulating NF-kappaBp65 activation. *J Immunol* (2015) 195(4):1498–505. doi:10.4049/jimmunol.1402924

66. Heng TS, Painter MW. Immunological genome project C. The immunological genome project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* (2008) 9(10):1091–4. doi:10.1038/ni1008-1091
67. Weitnauer M, Schmidt L, Ng Kuet Leong N, Muenchau S, Lasitschka F, Eckstein V, et al. Bronchial epithelial cells induce alternatively activated dendritic cells dependent on glucocorticoid receptor signaling. *J Immunol* (2014) 193(3):1475–84. doi:10.4049/jimmunol.1400446
68. Zimmer A, Luce S, Gaignier F, Nony E, Naveau M, Biola-Vidamment A, et al. Identification of a new phenotype of tolerogenic human dendritic cells induced by fungal proteases from *Aspergillus oryzae*. *J Immunol* (2011) 186(7):3966–76. doi:10.4049/jimmunol.1003184
69. Thion MS, Low D, Silvin A, Chen J, Grisel P, Schulte-Schrepping J, et al. Microbiome influences prenatal and adult microglia in a sex-specific manner. *Cell* (2017) 172(3):500–516.e16. doi:10.1016/j.cell.2017.11.042
70. Das T, Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, Maquart M, Gasque P. Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. *J Gen Virol* (2015) 96(Pt 2):294–310. doi:10.1099/vir.0.071175-0
71. Webster Marketon JI, Corry J, Teng MN. The respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural proteins mediate RSV suppression of glucocorticoid receptor transactivation. *Virology* (2014) 449:62–9. doi:10.1016/j.virol.2013.11.014
72. Li Z, Wang Y, Li X, Li X, Cao H, Zheng SJ. Critical roles of glucocorticoid-induced leucine zipper in infectious bursal disease virus (IBDV)-induced suppression of type I Interferon expression and enhancement of IBDV growth in host cells via interaction with VP4. *J Virol* (2013) 87(2):1221–31. doi:10.1128/JVI.02421-12
73. Baek JO, Lee JR, Roh JY, Jung Y. Oral tolerance modulates the skin transcriptome in mice with induced atopic dermatitis. *Allergy* (2017) 73(4):962–6. doi:10.1111/all.13367
74. Jones SA, Toh AE, Odobasic D, Oudin MA, Cheng Q, Lee JP, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) inhibits B cell activation in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(4):739–47. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207744
75. Terness P, Oelert T, Ehser S, Chuang JJ, Lahdou I, Kleist C, et al. Mitomycin C-treated dendritic cells inactivate autoreactive T cells: toward the development of a tolerogenic vaccine in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(47):18442–7. doi:10.1073/pnas.0807185105
76. Maggi J, Schinnerling K, Pesce B, Hilken CM, Catalan D, Aguillon JC. Dexamethasone and monophosphoryl lipid A-modulated dendritic cells promote antigen-specific tolerogenic properties on naive and memory CD4(+) T cells. *Front Immunol* (2016) 7:359. doi:10.3389/fimmu.2016.00359
77. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Leone BE, Caputo A, Di Carlo V. Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells. *Int Immunol* (1999) 11(9):1519–26. doi:10.1093/intimm/11.9.1519
78. Le Roux D, Le Bon A, Dumas A, Taleb K, Sachse M, Sikora R, et al. Antigen stored in dendritic cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells. *Blood* (2012) 119(1):95–105. doi:10.1182/blood-2011-02-336123
79. Chabaud M, Heuze ML, Bretou M, Vargas P, Maiuri P, Solanes P, et al. Cell migration and antigen capture are antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells. *Nat Commun* (2015) 6:7526. doi:10.1038/ncomms8526
80. Vargas P, Maiuri P, Bretou M, Saez PJ, Pierobon P, Maurin M, et al. Innate control of actin nucleation determines two distinct migration behaviours in dendritic cells. *Nat Cell Biol* (2016) 18(1):43–53. doi:10.1038/ncb3284
81. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* (2004) 305(5687):1153–7. doi:10.1126/science.1099153

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Vétilard and Schlecht-Louf. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

VI. RESUMES

Français

Comprendre par quels mécanismes les cellules dendritiques (DC) régulent l'immunité est essentiel. Les DC résident dans les tissus périphériques et notamment la peau. Au sein de leur tissu de résidence, les DC immatures alternent des phases de migration non orientée avec des phases de capture des antigènes (AG). Dans ce contexte, la migration est en compétition pour les stocks d'actine avec les processus de capture des AG, comme la macropinocytose. Une fois activées en réponse à des signaux de danger, la macropinocytose est inhibée et les DC deviennent capables de migrer rapidement et de manière orientée, dépendante de chimiokines (*e.g.* CXCL12/CCL21), vers les organes lymphoïdes (OL). Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé la contribution la protéine Glucocorticoid Induced Leucine Zipper (GILZ) et du récepteur de chimiokine CXCR4 au contrôle de la migration des DC, les mécanismes associés et les conséquences physiopathologiques d'une dérégulation de l'expression ou de la fonction de ces facteurs. J'ai utilisé deux modèles murins : 1- Un modèle de délétion de la protéine Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) dans les DC (GILZ^{ko}). Les travaux de mon équipe avaient précédemment démontré que le niveau d'expression de GILZ dans les DC contrôle leur macropinocytose. 2- Un modèle murin de gain de fonction du chimiorécepteur à CXCL12 : CXCR4. Ainsi, j'ai cherché à savoir si les DC GILZ^{ko} et les DC CXCR4 gain de fonction (CXCR4^{+ /1013}) présentaient une altération de leur capacité de migration *in vivo*. Dans des expériences de FITC painting j'ai démontré que les DC GILZ^{ko} et CXCR4^{+ /1013} migrent moins efficacement que les DC contrôles (CTRL) aux OL. Cette observation est associée à un défaut constitutif du nombre de DC migrantes dans les OL des souris CXCR4^{+ /1013} mais pas ceux des souris GILZ^{ko}. Pour mieux caractériser l'impact de la délétion de GILZ, j'ai étudié d'une part la vitesse de migration et d'autre part la capacité à répondre aux gradients de chimiokines des DC GILZ^{ko}. J'ai démontré que les DC GILZ^{ko} immatures migrent moins vite que leurs contrôles, en corrélation directe avec une macropinocytose accrue. De plus, les DC GILZ^{ko} répondent moins bien aux chimiokines CXCL12 (DC immatures) et CCL21 (DC activées) que les DC CTRL. L'entrée calcique cytosolique dans les DC étant un processus central pour la chimiotaxie et la motricité des cellules, j'ai ensuite étudié le rôle de GILZ dans le contrôle de l'influx calcique cytosolique de ces cellules. J'ai montré, pour la première fois dans les DC, que la délétion de GILZ réduit les concentration et influx calciques cytosoliques, selon un mécanisme pharmacologiquement reproductible dans les DC CTRL par l'inhibition d'une kinase induite par les glucocorticoïdes. Finalement, l'analyse des conséquences de la réduction de la migration des DC vers les OL dans nos modèles a révélé une aggravation de l'inflammation cutanée dans des modèles d'hypersensibilité retardée ou d'inflammation chronique. En conclusion, mes travaux apportent de nouvelles connaissances sur un processus clé dans la mise en place de la tolérance et des réponses immunitaires. Ils démontrent d'une part l'importance de la désensibilisation de CXCR4 dans les DC cutanée pour leur permettre de quitter la peau et d'autre part l'implication de GILZ dans la régulation de la vitesse et de l'orientation de la migration des DC, selon un mécanisme qui pourrait dépendre du contrôle des flux calciques. Ainsi, la diminution de l'expression de GILZ dans les DC, notamment aux cours d'inflammation, pourrait inhiber leur fonction dépendante du calcium. L'expression accrue de GILZ dans les DC est connue pour favoriser l'accumulation de lymphocytes T régulateurs au détriment des effecteurs. Mes travaux tendent à montrer que faire diminuer l'expression de GILZ dans les DC pourrait ne pas suffire à les rendre efficaces pour activer les lymphocytes T *in vivo*.

English

Understanding the mechanisms by which dendritic cells (DC) regulate immunity is essential. DC reside in peripheral tissues, including the skin. Within their tissue of residence, immature DC alternate non-oriented migration phases with antigen capture (AG) phases. In this context, migration is in competition for actin stocks with AG capture processes, such as macropinocytosis. Once activated in response to danger signals, macropinocytosis is inhibited and DC become able to migrate rapidly and in a chemokine-dependent way (e.g. toward CXCL12/CCL21) to lymphoid organs (LO). During my thesis, I characterized the contribution of the Glucocorticoid Induced Leucine Zipper (GILZ) protein and the chemokine receptor CXCR4 to the control of DC migration, the mechanisms associated with this control and the pathophysiological consequences of a deregulation of the expression or function of these factors. I have used two mouse models: 1- A model of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Protein (GILZ) deletion in DC (GILZ^{ko}). The previous work of my team has shown that the level of GILZ expression in DC controls their macropinocytosis. 2- A murine model of gain of function for the chemokine receptor of CXCL12: CXCR4. Therefore, I wondered if the GILZ^{ko} DC and the CXCR4 gain of function DC (CXCR4^{+/-1013}) showed an alteration in their *in vivo* migration capacity. In FITC painting experiments, I demonstrated that GILZ^{ko} DC and CXCR4^{+/-1013} DC migrate less efficiently than Control DC (CTRL) to the LO. This observation is associated with a constitutive defect in the number of migrating DC in LO in CXCR4^{+/-1013} mice, but not in GILZ^{ko} mice. To better characterize the impact of GILZ deletion, I studied the migration speed and the ability of GILZ^{ko} DC to respond to chemokine gradients *in vitro*. I demonstrated that immature GILZ^{ko} DC migrate slower than their controls, in direct correlation with increased macropinocytosis. In addition, GILZ^{ko} DC respond less well to CXCL12 (immature DC) and CCL21 (activated DC) chemokines than CTRL DC. As cytosolic calcium entry into DC is a central process in the regulation of chemotaxis and cell motricity, I investigated the role of GILZ in controlling the cytosolic calcium entry into these cells. I have shown, for the first time in DC, that GILZ deletion reduces cytosolic calcium concentration and influx. This phenotype is reproducible in CTRL DC by pharmacological inhibition of a glucocorticoid-induced kinase. Finally, the analysis of the consequences of reduced migration from skin DC to LO in our models revealed a worsening of skin inflammation in models of delayed hypersensitivity or chronic inflammation. In conclusion, my work provides new insights on a key process in the establishment of tolerance and immune responses. It demonstrates on the one hand the importance of desensitization of CXCR4 in cutaneous DC to allow them to leave the skin, and on the other hand the involvement of GILZ in regulating the speed and direction of DC migration, according to a mechanism that might depend on the control of calcium responses. Thus, the decrease in GILZ expression in DC, particularly during inflammation, might inhibit their calcium-dependent function. The increased expression of GILZ in DC is known to promote the accumulation of regulatory T cells at the expense of effector T cells. My work suggests that decreasing GILZ expression in DC may not be sufficient to make them efficient in activating T cells *in vivo*.

Titre : Régulation de la migration des cellules dendritiques : étude des mécanismes dépendant du récepteur de chimiokine CXCR4 et de la protéine Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper.

Mots clés : cellules dendritiques ; migration ; CXCR4 ; GILZ ; calcium

Résumé : Comprendre par quels mécanismes les cellules dendritiques (DC) régulent l'immunité est essentiel. Les DC résident dans les tissus périphériques et notamment la peau. Au sein de leur tissu de résidence, les DC immatures alternent des phases de migration non orientée avec des phases de capture des antigènes (AG). Dans ce contexte, la migration est en compétition pour les stocks d'actine avec les processus de capture des AG, comme la macropinocytose. Une fois activées en réponse à des signaux de danger, la macropinocytose est inhibée et les DC deviennent capables de migrer rapidement et de manière orientée, dépendante de chimiokines (e.g. CXCL12/CCL21), vers les organes lymphoïdes (OL). Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé la contribution la protéine Glucocorticoid Induced Leucine Zipper (GILZ) et du récepteur de chimiokine CXCR4 au contrôle de la migration des DC, les mécanismes associés et les conséquences physiopathologiques d'une dérégulation de l'expression ou de la fonction de ces facteurs. J'ai utilisé deux modèles murins : 1- Un modèle de délétion de la protéine Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) dans les DC (GILZ^{ko}). Les travaux de mon équipe avaient précédemment démontré que le niveau d'expression de GILZ dans les DC contrôle leur macropinocytose. 2- Un modèle murin de gain de fonction du chimiorécepteur à CXCL12 : CXCR4. Ainsi, j'ai cherché à savoir si les DC GILZ^{ko} et les DC CXCR4 gain de fonction (CXCR4⁺¹⁰¹³) présentaient une altération de leur capacité de migration *in vivo*. Dans des expériences de FITC painting j'ai démontré que les DC GILZ^{ko} et CXCR4⁺¹⁰¹³ migrent moins efficacement que les DC contrôles (CTRL) aux OL. Cette observation est associée à un défaut constitutif du nombre de DC migrantes dans les OL des souris CXCR4⁺¹⁰¹³ mais pas ceux des souris GILZ^{ko}. Pour mieux caractériser l'impact de la délétion de GILZ, j'ai étudié d'une part la vitesse de migration et d'autre part la capacité à répondre aux gradients de chimiokines des DC GILZ^{ko}. J'ai démontré que les DC GILZ^{ko} immatures migrent moins vite que leurs contrôles, en corrélation directe avec une macropinocytose accrue. De plus, les DC GILZ^{ko} répondent moins bien aux chimiokines CXCL12 (DC immatures) et CCL21 (DC activées) que les DC CTRL. L'entrée calcique cytosolique dans les DC étant un processus central pour la chimiotaxie et la motricité des cellules, j'ai ensuite étudié le rôle de GILZ dans le contrôle de l'influx calcique cytosolique de ces cellules. J'ai montré, pour la première fois dans les DC, que la délétion de GILZ réduit les concentration et influx calciques cytosoliques, selon un mécanisme pharmacologiquement reproductible dans les DC CTRL par l'inhibition d'une kinase induite par les glucocorticoïdes. Finalement, l'analyse des conséquences de la réduction de la migration des DC vers les OL dans nos modèles a révélé une aggravation de l'inflammation cutanée dans des modèles d'hypersensibilité retardée ou d'inflammation chronique. En conclusion, mes travaux apportent de nouvelles connaissances sur un processus clé dans la mise en place de la tolérance et des réponses immunitaires. Ils démontrent d'une part l'importance de la désensibilisation de CXCR4 dans les DC cutanée pour leur permettre de quitter la peau et d'autre part l'implication de GILZ dans la régulation de la vitesse et de l'orientation de la migration des DC, selon un mécanisme qui pourrait dépendre du contrôle des flux calciques. Ainsi, la diminution de l'expression de GILZ dans les DC, notamment aux cours d'inflammation, pourrait inhiber leur fonction dépendante du calcium. L'expression accrue de GILZ dans les DC est connue pour favoriser l'accumulation de lymphocytes T régulateurs au détriment des effecteurs. Mes travaux tendent à montrer que faire diminuer l'expression de GILZ dans les DC pourrait ne pas suffire à les rendre efficaces pour activer les lymphocytes T *in vivo*.

Title : Regulation of dendritic cell migration: study on the CXCR4 chemokine receptor and the Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein dependent mechanisms

Keywords : Dendritic cells ; Migration ; CXCR4 ; GILZ ; Calcium

Abstract : Understanding the mechanisms by which dendritic cells (DC) regulate immunity is essential. DC reside in peripheral tissues, including the skin. Within their tissue of residence, immature DC alternate non-oriented migration phases with antigen capture (AG) phases. In this context, migration is in competition for actin stocks with AG capture processes, such as macropinocytosis. Once activated in response to danger signals, macropinocytosis is inhibited and DC become able to migrate rapidly and in a chemokine-dependent way (e.g. toward CXCL12/CCL21) to lymphoid organs (LO). During my thesis, I characterized the contribution of the Glucocorticoid Induced Leucine Zipper (GILZ) protein and the chemokine receptor CXCR4 to the control of DC migration, the mechanisms associated with this control and the pathophysiological consequences of a deregulation of the expression or function of these factors. I have used two mouse models: 1- A model of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Protein (GILZ) deletion in DC (GILZ^{ko}). The previous work of my team has shown that the level of GILZ expression in DC controls their macropinocytosis. 2- A murine model of gain of function for the chemokine receptor of CXCL12: CXCR4. Therefore, I wondered if the GILZ^{ko} DC and the CXCR4 gain of function DC (CXCR4⁺¹⁰¹³) showed an alteration in their *in vivo* migration capacity. In FITC painting experiments, I demonstrated that GILZ^{ko} DC and CXCR4⁺¹⁰¹³ DC migrate less efficiently than Control DC (CTRL) to the LO. This observation is associated with a constitutive defect in the number of migrating DC in LO in CXCR4⁺¹⁰¹³ mice, but not in GILZ^{ko} mice. To better characterize the impact of GILZ deletion, I studied the migration speed and the ability of GILZ^{ko} DC to respond to chemokine gradients *in vitro*. I demonstrated that immature GILZ^{ko} DC migrate slower than their controls, in direct correlation with increased macropinocytosis. In addition, GILZ^{ko} DC respond less well to CXCL12 (immature DC) and CCL21 (activated DC) chemokines than CTRL DC. As cytosolic calcium entry into DC is a central process in the regulation of chemotaxis and cell motricity, I investigated the role of GILZ in controlling the cytosolic calcium entry into these cells. I have shown, for the first time in DC, that GILZ deletion reduces cytosolic calcium concentration and influx. This phenotype is reproducible in CTRL DC by pharmacological inhibition of a glucocorticoid-induced kinase. Finally, the analysis of the consequences of reduced migration from skin DC to LO in our models revealed a worsening of skin inflammation in models of delayed hypersensitivity or chronic inflammation. In conclusion, my work provides new insights on a key process in the establishment of tolerance and immune responses. It demonstrates on the one hand the importance of desensitization of CXCR4 in cutaneous DC to allow them to leave the skin, and on the other hand the involvement of GILZ in regulating the speed and direction of DC migration, according to a mechanism that might depend on the control of calcium responses. Thus, the decrease in GILZ expression in DC, particularly during inflammation, might inhibit their calcium-dependent function. The increased expression of GILZ in DC is known to promote the accumulation of regulatory T cells at the expense of effector T cells. My work suggests that decreasing GILZ expression in DC may not be sufficient to make them efficient in activating T cells *in vivo*.