



HAL
open science

Caractérisation du flux autophagique de cellules dendritiques humaines au cours de leur maturation : de l'individu sain au patient atteint de la maladie de Crohn

Gaëlle Quiniou

► **To cite this version:**

Gaëlle Quiniou. Caractérisation du flux autophagique de cellules dendritiques humaines au cours de leur maturation : de l'individu sain au patient atteint de la maladie de Crohn. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1046 . tel-03684771

HAL Id: tel-03684771

<https://theses.hal.science/tel-03684771>

Submitted on 1 Jun 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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1046

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie cellulaire et immunologie
Discipline : Science du vivant

Soutenue publiquement le 12/03/2021, par :
Gaëlle QUINIOU

Caractérisation du flux autophagique de cellules dendritiques humaines au cours de leur maturation : de l'individu sain au patient atteint de la maladie de Crohn

Devant le jury composé de :

Dr Espert Lucile	Chargé de Recherche au CNRS	Rapporteuse
Dr Flacher Vincent	Chargé de Recherche au CNRS	Rapporteur
Pr Carole Kretz-Rémy	Professeure, université Lyon 1	Examinatrice
Pr Nicolas Barnich	Professeur, université d'Auvergne	Examineur
Pr Mathias Faure	Professeur, université Lyon 1	Directeur de thèse
Dr Aurore Rozières	Maître de conférences, université Lyon 1	Membre invité

Université Claude Bernard - LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Éducation	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

A mon jury :

Je tiens à remercier le Dr Lucile ESPERT ainsi que le Dr Vincent FLACHER d'avoir accepté de relire et d'évaluer mes travaux de thèse. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à cette relecture et pour vos remarques pertinentes. Je remercie également le Pr Carole KRETZ-REMY et le Pr Nicolas BARNISH d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A mon laboratoire :

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Mathias FAURE pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et permis de réaliser ce travail. Je te remercie pour ton encadrement et tes nombreux conseils ; sache que tu m'as beaucoup appris. Merci de m'avoir fait participer à différents congrès scientifiques et de m'avoir donné l'opportunité d'encadrer divers étudiants.

Je tiens à remercier tous les membres présents et passés de l'équipe A2I. Je remercie le docteur Aurore ROZIERES pour son encadrement durant ces 3 années, ainsi que les docteurs Christophe VIRET, Gilles BOSCHETTI, Stéphane NANCEY, ainsi que Rémi DUCLAUX-LORAS pour toutes nos discussions scientifiques et non- scientifiques, ainsi que vos conseils avisés qui m'ont permis de progresser tout au long de ma thèse.

Merci à Mathieu CLAVIERE qui m'a accueilli lors de mon arrivée fin 2017 au laboratoire ; merci pour tes conseils, ta bonne humeur et ton sens de l'humour un peu décalé.

Un très grand merci à Océane DINET, pour ton soutien, ton aide et ton sourire tout au long de ces années ensemble. Grâce à toi « nous avons atteint, et dépassé, les 25 donneurs demandés par Mathias ». Plus qu'une collègue, et au-delà d'être « mes troisième et quatrième mains », ainsi que « mon second cerveau », tu es devenue une amie.

Merci à Manon VENET, pour ton soutien infailible, ainsi que ta « bonne/mauvaise » humeur. Merci d'avoir pris soin de moi en me « forçant » à rentrer tôt le soir, même si je l'avoue, je ne t'ai pas toujours écouté. Merci de m'avoir supporté/adoré ; j'espère que notre synergie perdurera au-delà du labo.

Un grand merci à Mariette BONNET, pour tes conseils, tes encouragements et ta positivité. Saches que tu étais pour nous « notre deuxième maman » ; la preuve, c'est toi qui fais les meilleurs muffins au chocolat ! On se souviendra de la naissance de nos filles, à deux mois d'intervalle, nous qui n'envisagions pourtant pas d'avoir des enfants dans les années à venir.

Merci à Soizic DUTOIT, pour ton énergie, ton sourire et ta bonne humeur. J'ai apprécié discuter de cancérologie avec toi, un domaine qui nous passionne et nous manque. J'espère qu'un jour nous pourrions randonner ou skier ensemble, toi qui apprécies tant la montagne.

Un grand merci à mon ancienne co-thésarde Janelle GAUTHIER, merci d'avoir partagé ton bureau et ta paillasse avec moi, je sais cela n'a pas toujours été facile. Saches que j'ai adoré t'écrire et te transmettre « la charte du(de la) thésard(e) aîné(e) » ; au passage, j'attends toujours mon tiramisu du mois de janvier.

Aux membres de mon CST :

Je tiens à remercier le Dr Hélène DUTARTRE et le Dr Etienne MOREL pour avoir accepté de faire partie de mon CST. Vos conseils, vos encouragements, ainsi que vos remarques pertinentes m'ont permis d'avancer sereinement tout au long de ces trois années de thèse.

A mes collègues, amis et membres du CIRI :

Un grand merci à Ommar OMARJEE et Antoinette NEYRA, pour votre soutien et votre bonne humeur. Ommar, saches que la pièce culture paraît bien vide sans toi ; je n'ai plus personne pour me voler/effacer mes créneaux de réservation, ou pour partager une poche de sang avec moi. Merci à vous deux d'avoir gardé Nova pendant mes absences, sachez qu'elle apprécie maintenant d'être bercé au son des « koutchikoutchikoutchikoutchi ».

Merci à Annabelle DROUILLARD, pour ton sourire, tes encouragements et ton humour aussi décalé que le mien. Saches que c'était un plaisir de gérer les commandes de la pièce culture avec toi ; « en sommes, c'est des choses qu'on s'souviendro, dit hein ! » (Prends bien ton accent, hein !).

Merci à Marion MOREEWS, pour ton soutien et tes encouragements. Grâce à notre petite collaboration, tu vis aujourd'hui à moins de 15 minutes à pied du labo. Au plaisir de pouvoir rejouer un jour au badminton avec toi !

Merci à Marianne FIGL pour ton soutien dans les mauvais comme dans les bons moments et pour m'avoir donné du courage lorsque j'en avais besoin.

Merci à Anne-Laure MATHIEU, Antoine MARCAIS, Laure PERRIN-COCON, Amandine MARTIN et Emilie BOURDONNAY pour nos discussions scientifiques et non-scientifiques, ainsi que pour vos conseils avisés.

Un grand merci à Elise ROQUE, pour ton accueil si chaleureux et ton sourire qui a illuminé chacune de mes journées. Merci pour tes encouragements, ta disponibilité et ta bonne humeur.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger tout au long de ces trois années passées au sein du CIRI.

A mes amis :

Merci à Kathleen/Katou, pour notre amitié si solide depuis toutes ces années. J'attends avec impatience le jour où nous ferons notre petit voyage à Amsterdam.

Merci à Charlotte/Chacha, pour être toujours présente, à ta manière, depuis notre enfance et malgré la distance.

Merci à Alexandre/bebert et Anne-lise/Lili, pour votre soutien, votre simplicité et votre présence ; nous serons allés au bout de nos thèses respectives ! Bebert, promis tu seras le parrain la prochaine fois !

Je remercie également Léa, Priscillia, Nicolas/Nico, pour vos encouragements et pour être présents lorsque j'en ai besoin. Léa, Nico, merci pour tous nos rires et votre bonne humeur, et ce depuis les bancs de la FAC. Priscillia, merci pour ta franchise qui m'a toujours fait tant rire.

Merci aux amis de mon conjoint qui sont devenus les miens. Merci pour tous ces moments passés ensemble. Un grand merci en particulier à Fanny et Kelvin, pour m'avoir fait découvrir de nombreux jeux de société, une passion que nous partageons tous les 4 avec Andréa.

Merci à mes amis « les kotos », Alexandre, Alix, Yohan, Cédric, Joel, Pierre, Vincent et Gaetan, pour votre présence, nos rires et nos pleurs, pour pouvoir parler d'autre chose que de science et surtout de tout avec vous.

A ma famille et ma belle-famille :

Je remercie très chaleureusement mes parents, Stéphane et Marie-Agnès, pour votre soutien infaillible, vos nombreux conseils et pour avoir cru en moi malgré mes difficultés. C'est en grande partie grâce à vous que j'ai pu commencer et surtout terminer cette thèse. Je remercie également mes frères, Yoann, Xavier et Corentin, pour votre soutien, mais surtout pour savoir, chacun à votre manière, me sortir de mon quotidien à la paillasse. Un grand merci également à mes grands-parents, pour vos encouragements et pour les valeurs que vous m'avez transmises. Papi, pépé, sachez que je suis fière de vous rendre fière de moi. Mamie, je crois que je peux dire que je suis une battante, « un peu têtue », comme toi.

Merci à toute ma belle-famille, en particulier à Corinne, Emilio, Lorenzo, Floriane et Mistigri, pour être présents et me soutenir tout simplement.

Merci à Nova, mon chat, pour ton soutien et ton amour. Merci de m'avoir empêché de travailler parfois tard le soir en te couchant sur mes genoux pour ton câlin du soir, une manière pour toi de me dire d'arrêter ou de faire une pause.

Merci à mes chiens, Galaxie, Mamba et Oslo, pour votre amour et votre bienveillance ; un câlin avec vous, il n'y a rien de mieux pour se vider la tête.

Un grand merci à ma fille, Noémie, pour m'avoir permis de terminer cette thèse avec plus de douceur et de légèreté. Ton sourire chaque matin m'a donné du courage pour terminer ce travail, malgré le manque de sommeil qui m'a parfois pesé.

Pour finir, un très grand merci à mon conjoint Andrea, pour son amour et son soutien inconditionnel. Merci d'avoir toujours été là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Grâce à toi et tes encouragements, je suis allée au bout de cette thèse !

Résumé/Abstract

Caractérisation du flux autophagique de cellules dendritiques humaines au cours de leur maturation : de l'individu sain au patient atteint de la maladie de Crohn

Les cellules dendritiques sont des cellules clés du système immunitaire, passant d'un état immature dans les tissus à un état mature dans les organes lymphoïdes secondaires, notamment, à la suite de la détection de microorganismes infectieux. Parmi les fonctions biologiques régulant ces cellules, l'autophagie joue un rôle essentiel. Ce mécanisme du catabolisme cellulaire séquestre des composants cytosoliques au sein d'autophagosomes néoformés et les dégrade après fusion avec un lysosome. Alors que l'autophagie est généralement étudiée à un instant donné, il convient davantage d'analyser sa dynamique, appelée flux autophagique.

Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé trois paramètres cruciaux du flux autophagique : la vitesse, l'intensité et le temps de transition nécessaire à la formation d'autophagosomes. À partir de cette caractérisation, j'ai pu montrer que le flux présente des caractéristiques distinctes entre les cellules dendritiques immatures et matures. Ce changement s'opère au cours de la maturation de ces cellules et quelle que soit l'origine du signal de maturation. Enfin, nous avons montré que les cellules dendritiques de patients atteints de la maladie de Crohn exprimant le variant autophagique à risque *ATG16L1 T300A*, perdent leur capacité à moduler le flux au cours de leur maturation.

Ainsi, ces résultats décrivent une signature du flux autophagique propre à l'état immature versus mature des cellules dendritiques primaires humaines et ouvrent des perspectives dans la physiopathologie de la maladie de Crohn. L'étude du flux autophagique pourrait, à terme, être un paramètre pronostique de l'évolution et/ou de traitements personnalisés de la maladie.

Characterization of the autophagic flux of human dendritic cells during their maturation: from healthy donor to Crohn patient

Dendritic cells are key immune cells, from immature status in tissue to a mature status in secondary lymphoid organs, particularly after detection of infectious microorganisms. Among all biological functions that regulate those cells, autophagy plays a central role. This is a catabolic cellular mechanism that confine cytosolic components in autophagosome in formation and eliminate them after fusion with a lysosome. While autophagy is commonly study at the time t, it is better to analyze its dynamic, called autophagic flux.

During my thesis, I have characterized three important parameters of the autophagic flux: the velocity, the intensity, and the time of transition that allow the formation of autophagosomes.

From this characterization, we have shown distinct autophagic flux properties between immatures and matures dendritic cells. This modification occurs during the maturation process of those cells and independently of the maturation signal use. Finally, we have demonstrated that dendritic cells from Crohn disease patients that express the autophagic polymorphism *ATG16L1 T300A*, loose their ability to adapt their autophagic flux during their maturation.

Thus, those results describe a specific autophagic flux signature which depend on the maturation status of primary human dendritic cells and open perspectives in the physiopathology of Crohn disease. Autophagic flux study could be, over time, a prognosis parameter of the evolution and/or personal treatment in this disease.

Mots clés/Keywords

Mots clés : Autophagie, cellule dendritique, maturation, flux autophagique

Keywords: Autophagy, dendritic cell, maturation, autophagic flux

Intitulé et adresse du laboratoire

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

Equipe : Autophagie Infection Immunité

PI : Pr Mathias FAURE

INSERM U1111 - CNRS UMR5308 - Université Claude Bernard Lyon 1 - ENS de Lyon

21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07 - France

Liste des abréviations

A

AIEC : Adherent and Invasive Escherichia Coli
AMBRA : Activating Molecule in Beclin 1 Regulated Autophagy protein
ATG : AuTophagy-related
ATG16L1 : Autophagy-related 16 Like 1

B

BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen
BIR : Baculovirus Inhibitor Repeat
BTLA : B and T Lymphocyte Attenuator

C

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain
CCL : CC-chemokine Ligand
CCR : CC-chemokine Receptor
CD : Cluster of Differentiation ou Cluster de Différenciation
cDC : conventional DC
CBD: c-di-GMP-binding domain
CDP : Common Dendritic cell Progenitor
CDR : Calcium-Dependent carbohydrate Recognition domain
CLIP : Class II-associated I chain Peptide
CLR : C-Lectin Receptor
cGAMP : cyclic GMP-AMP
cGAS: cyclic GMP-AMP synthase
CMA : Chaperone-Mediated Autophagy
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COPII : COat Protein complexe II
COR : C-terminal Of Roc
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CSF : Colony-Stimulating Factor
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4

D

DALS : Dendritic cell Aggregosome-Like Structure
DDC : Dermal Dendritic Cell
DAMP : Damaged Associated Molecular Pattern
DED : Dead Effector Domain
DSS : Dextran Sulfate Sodium
DUB : DeUBiquitinated enzyme

E

EAT : Early Autophagy Targeting

EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule

EPG : Ectopic P Granule protein

ERAAP : ER Aminopeptidase associated with Antigen Processing

ERAP : ER-associated AminoPeptidase

ERGIC : Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport

F

Fc : Fragment Crystallizable region ou Fragment Constant

FIP200 : FAK family kinase-Interacting Protein of 200kDa

FIVE : Fab1-YOTP-Vac1-EEA1

FUNDC1 : FUN14 Domain Containing 1

FYCO1 : FYVE and COiled-coil domain containing 1

G

GABARAP : GABA type A Receptor-Associated Protein

GALT : Gut-Associated Lymphoïd Tissu

GM-CSF : Granulocyte-Macrophages Colony-Stimulating Factor

GWAS : Genome-Wide Association Studie

H

HOPS : HOmotypic fusion and Protein Sorting

I

i/mDC : immature/matureDendritic Cell

i/nLTreg : induit/natureILT régulateur

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

ICOS : Inducible T-cell COstimulator

IDEC : Inflammatory Dendritic Epidermal Cell

IEC : Intestinal Epithelial Cell

IKK : IκB Kinase

IL : Interleukine

ILC : Innate Lymphoid cell

IPS-1: IFN- β -Promoter Stimulator 1

IRAK : Interleukine Receptor Associated Kinase

IRAP : endosomal InsulinResponsive AminoPeptidase

IRF : Interferon Regulated Factor

IRGM : Immunity-related guanosine triphosphatase family M

ITAM : Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosinebased Inhibition Motif

J

JUNK : c-JUN N-terminal Kinase

L

LAMP : Lysosome Associated Membrane Protein

LAP : LC3-Associated Phagocytosis

LC : Langerhans Cell

LIR : LC3 Interacting Region

LPS : lipopolysaccharide

LRR : Leucine Rich Repeat

LRRK-2 : Leucine Rich Repeat Kinase 2

LT : Lymphocytes T

LT_{fh} : LT follicular helper

L_{Th} : LT helper

M

M1/2 : Macrophage de type 1/2

MAM : Mitochondria-Associated Membrane

MAPLC3 : Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKK (ou MAP2K) : MAPK Kinase

MAPKKK (ou MAP3K) : MAPKK Kinase

MC : Maladie de Crohn

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

miR : microARN

MoDC : Monocyte-derived Dendritic cell

MoLC : Monocytes-derived Langerhans Cell

MPP : Matrix Processing Peptidases

MR : Mannose Receptor

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

MyD88 : Myeloid Differentiation primary response protein 88

N

NBR1 : Neighbor of BRCA1 gene 1

NDP52 : Nuclear Dot Protein 52 kDa

NEMO : NFκB Essential MOdulator ou IKKγ

NFE2L2 (ou NRF2) : Nuclear Factor Erythroid derived 2 Like 2

NF-κB : Nuclear Factor-κB

NIK : NF-κB-Inducing Kinase

NK : Natural Killer

NOCA : Nuclear receptor CoActivator

NOD : Nucleotide-binding and Oligomerization Domain

NOX2 : NADPH oxidase 2

NLR : Nod-Like Receptor

O

OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

OPTN : Optineurin

P

PAMP : Pathogens Associated Molecular Pattern

PARL : Presenilin-Associated Rhomboïd Like

PD-L : Programmed cell Death-Ligand

pDC : plasmacytoid DC

PE : Phosphatidyl-Ethanolamine

PI : PhosphatidylInositol

PI(3)P : PhosphatidylInositol 3-Phosphate

PI3K de classe III : PhosphatidylInositol 3-Kinase de classe III

PINK1 : PTEN-induced putative Kinase 1

PLEKHM1 : PLEcKstrin Homology and RUN domain containing M1

PRR : Pattern Recognition Receptor

PYD : Pyrin Domain

R

RE : Réticulum Endoplasmique

RIP : Receptor Interacting Protein

RIPL : Rab-Interacting lysosomal protein

RLR : RIG-1-Like Receptor

ROC : Ras Of Complexe protein

S

SHP-2 : Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-1/2

SLRs : Séquestosome-Like Receptors

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor

SNP : Single-Nucleotide Polymorphism

STING: stimulator of interferon gene

T

TAB : TAK-1 Binding protein

TAK : TGF β -associated kinase

TAP : Transporter associated with Antigen Processing

TAX1BP1 : Tax1 Binding Protein 1

TBC1D15 : TBC1 Domain family member 15

TBK1 : Tank Binding Kinase 1

TCR : T-Cell Receptor

TGF : Transforming Growth Factor

TIR : Toll IL-1 Receptor

TIRAP : TIR domain containing Adaptor Protein

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFRSM5 : TNF Receptor Superfamily Member 5

TRADD : TNFR-Associated DD protein

TRAF : TNFR-Associated Factor

TRAM : TRIF Related Adapter Molecule

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

TSLP: Thymic Stromal LymphoPoietin

U

UBD : Ubiquitine Binding Domain

USP : Ubiquitin-Specific Proteases

ULK : Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1

V

VPS : Vacuolar Protein Sorting

W

WAS : Wiskott-Aldrich Syndrome protein

WIPI : WD-repeat domain phosphoinositide-Interacting Protein

Sommaire

A.	Introduction bibliographique.....	21
I.	L'autophagie.....	21
1.	Définition et découverte.....	21
2.	Ensemble des processus autophagiques.....	21
a)	La micro-autophagie.....	21
b)	L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes.....	22
c)	La macro-autophagie.....	22
3.	Mécanisme moléculaire de l'autophagie.....	23
a)	L'initiation.....	24
(1)	Le complexe ULK.....	24
(2)	Le complexe PI3K de classe III.....	25
(3)	Rôle des vésicules ATG9 et COPII.....	26
(4)	L'origine du phagophore.....	28
b)	L'élongation du phagophore.....	29
(1)	Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1.....	30
(2)	Le système de conjugaison LC3.....	30
c)	La maturation de l'autophagosome.....	32
(1)	Les protéines RabGTPases.....	32
(2)	Les protéines SNAREs.....	33
(3)	Les protéines d'attachements membranaires.....	33
(4)	Le rôle du cytosquelette.....	34
d)	Régulation de l'autophagie.....	36
4.	L'autophagie sélective.....	39
a)	Les récepteurs autophagiques.....	39
(1)	Reconnaissance des substrats dépendante de l'ubiquitine.....	40
(2)	Reconnaissance des substrats indépendante de l'ubiquitine.....	41
b)	Exemple d'autophagie sélective : la mitophagie.....	42
(1)	Rôle de la mitophagie pendant la différenciation des érythrocytes.....	43
(2)	Rôle de la mitophagie induite en condition d'hypoxie.....	43
(3)	Rôle de la mitophagie induite par des dommages hypoxiques-indépendants..	43
5.	Modulation du processus autophagique.....	45
a)	Notion de flux autophagique.....	45
b)	Agents pharmacologiques utilisés.....	46
II.	Cellules dendritiques humaines et autophagie.....	48

1.	Découvertes et caractéristiques cellulaires.....	48
2.	Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée.....	49
	a) Détection des signaux de dangers	49
	(1) Les Toll-like récepteurs (TLRs)	50
	(2) Les récepteurs lectines de type C (CLRs)	51
	(3) Les récepteurs Nod (NLRs)	52
	(4) Les récepteurs RIG (RLRs).....	54
	(5) Les récepteurs à ADN.....	54
	(6) Récepteurs de l'immunité innée et autophagie.....	55
	b) Capture des antigènes.....	57
	(1) L'endocytose médiée par les récepteurs	57
	(2) La phagocytose.....	58
	(3) La macropinocytose.....	59
	(4) Coopération entre détection des signaux de danger et capture des antigènes..	60
3.	Maturation des cellules dendritiques.....	60
	a) Activation du processus de maturation.....	61
	(1) Les signaux d'activation de la maturation	61
	(a) Stimulation TLR-dépendante.....	61
	(b) Stimulation via les récepteurs du TNF.....	63
	(2) Les voies de signalisation induites	64
	(a) La voie NF-Kb.....	64
	(b) La voie des MAPKs	65
	b) Acquisition des capacités de migration.....	68
	(1) Acquisition de la mobilité.....	68
	(2) Régulation de la mobilité par autophagie.....	68
	c) Acquisition des capacités de présentation d'antigène	69
	(1) Expression des protéines impliquées dans la présentation des antigènes	69
	(2) Régulation de l'expression des protéines impliquées dans la présentation des antigènes par autophagie	70
	d) Sécrétion de médiateurs chimiques immunitaires	71
	(1) Production de cytokines	71
	(2) Sécrétion de cytokines et autophagie	72
4.	Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative	73
	a) Présentation des antigènes.....	74
	(1) Les molécules du CMH	74
	(a) Les molécules du CMH-I.....	75

(b)	Les molécules du CMH-II	75
(2)	Présentation des antigènes par le CMH-I.....	76
(a)	Présentation classique des antigènes intracellulaires.....	76
(b)	Présentation croisée des antigènes extracellulaires	76
(3)	Présentation des antigènes par le CMH-II	79
(a)	Présentation classique des antigènes extracellulaires	79
(b)	Présentation des antigènes intracellulaires	79
(4)	Rôle de l'autophagie dans la présentation antigénique.....	79
(a)	Rôle de l'autophagie dans la présentation des antigènes par le CMH-I	80
(b)	Rôle de l'autophagie dans la présentation des antigènes par le CMH-II.....	80
b)	Activation et polarisation des lymphocytes T	81
(1)	Les molécules de costimulation	82
(a)	La famille des B7	82
(b)	La famille des récepteurs du TNF	83
(2)	Différenciation et polarisation des lymphocytes T	83
(a)	Génération de lymphocytes T auxiliaires et régulateurs.....	83
(i)	Les lymphocytes T auxiliaires.....	84
(ii)	Les lymphocytes T régulateurs	85
(b)	Génération de lymphocytes T cytotoxiques.....	86
(3)	Régulation de l'activation et de la polarisation des LT par autophagie dans les DCs	87
5.	Les sous-types des cellules dendritiques humaines.....	89
a)	Les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs).....	90
(1)	Les cDC1	90
(2)	Les cDC2	91
b)	Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)	92
c)	Les cellules de langerhans (LCs).....	92
d)	Les cellules dendritiques inflammatoires	93
(1)	Les DCs inflammatoires « classiques ».....	93
(2)	Les cellules dendritiques-dérivées de monocytes (MoDCs)	94
e)	Exemple de diversité de cellules dendritiques dans un tissu de revêtement : DCs intestinales	95
III.	Maladie de Crohn et polymorphismes autophagiques	98
1.	Définition et épidémiologie	98
2.	Physiopathologie de la maladie de Crohn.....	99
a)	Biologie intestinale	99

(1)	La muqueuse intestinale	99
(a)	Les cellules épithéliales	100
(b)	Les cellules immunitaires.....	100
(i)	Mise en place d'une réponse immunitaire tolérogène	101
(ii)	Mise en place d'une réponse immunitaire immunogène	102
(2)	Microbiote intestinal	103
b)	Altérations de la muqueuse intestinale et mise en place de la réponse inflammatoire	105
(1)	Altérations de la barrière intestinale.....	105
(2)	La dysbiose.....	106
c)	Mise en place d'une réponse inflammatoire chronique	107
(1)	Dérégulation de la réponse immunitaire innée	107
(a)	Défaillance des systèmes de détection des microorganismes.....	107
(b)	Initiation et amplification de la réponse inflammatoire par les cellules de l'immunité innée.....	108
(2)	Dérégulation de la réponse immunitaire adaptative	109
(a)	Mise en place de la réponse T cytotoxique : initiation de la formation des lésions intestinales.....	110
(b)	Mise en place de la réponse T auxiliaire : mise en place de la chronicité de la maladie.....	110
3.	Impact des polymorphismes autophagiques dans la maladie de Crohn.....	113
a)	NOD-2.....	114
(1)	Impact sur le microbiote intestinal.....	114
(2)	Impact sur la réponse immunitaire	115
b)	ATGL16L1.....	117
(1)	Impact sur les cellules de l'épithélium intestinal	117
(2)	Impact sur le microbiote intestinal.....	118
(3)	Impact sur la réponse immunitaire	119
(a)	Amplification de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire.....	119
(b)	Impact sur l'orientation et l'activation de la réponse immunitaire adaptative ..	120
c)	IRGM.....	122
d)	ULK1	124
e)	LRRK2.....	125
B.	Problématique et objectifs de thèse	128
C.	Résultats.....	130
I.	Article scientifique.....	130

II.	Résultats complémentaires non-publiés	162
1.	Analyse du flux autophagique dans des cellules dendritiques primaires	162
2.	Analyse de la fonctionnalité de l'autophagie dans les cellules dendritiques humaines en fonction de leur état de maturation : étude de la mitophagie	165
3.	Evaluation de la régulation du flux autophagique dans des cellules dendritiques humaines en fonction de leur état de maturation	170
D.	Discussion et perspectives	174
1.	Identification de la signature du flux autophagique dans des cellules dendritiques primaires.....	174
2.	Adaptation du flux autophagique au cours de la maturation des cellules dendritiques humaines	177
3.	Impact sur la fonctionnalité de l'autophagie	178
4.	Régulation de l'adaptation du flux autophagique dans les DCs primaires au cours de leur maturation.....	179
5.	Impact de l'adaptation du flux autophagique dans les DCs primaires matures.....	182
6.	Importance de la qualité du flux autophagique dans les DCs primaires en contexte pathologique	184
E.	Annexes	186
F.	Communications orales et posters	212
G.	Références bibliographiques.....	216

Table des illustrations

Figure 1 : Les trois formes d'autophagie	23
Figure 2 : Initiation de l'autophagie.....	27
Figure 3 : Les systèmes de conjugaison	29
Figure 4 : Elongation du phagophore.....	31
Figure 5 : Maturation de l'autophagosome.....	35
Figure 6 : Régulation de l'étape d'initiation.....	37
Figure 7 : Régulation de l'étape d'élongation	38
Figure 8 : Régulation de l'étape de maturation.....	39
Figure 9 : Structure globale des SLRs.....	41
Figure 10 : Reconnaissance d'un substrat par les récepteurs autophagiques.....	42
Figure 11 : Autophagie sélective des mitochondries : la mitophagie	45
Figure 12 : Systèmes de détection des signaux de dangers	53
Figure 13 : Systèmes de capture et de trafic des antigènes.....	59
Figure 14 : Voie des interférons impliquée dans la maturation des cellules dendritiques.....	62
Figure 15 : Voie NF- κ B impliquée dans la maturation des cellules dendritiques	65
Figure 16 : Voie des MAPKs impliquée dans la maturation des cellules dendritiques.....	67
Figure 17 : Evolution d'une cellule dendritique au cours du processus de maturation	70
Figure 18 : Modulation du processus de maturation par autophagie.....	73
Figure 19 : Apprêtement des antigènes pour la présentation antigénique	78
Figure 20 : Activation et polarisation des lymphocytes T CD4+	86
Figure 21 : Modulation de la biologie et des fonctions de la cellule dendritique par autophagie.....	89
Figure 22 : Diversité des cellules dendritiques humaines	96
Figure 23 : Facteurs de risques associés à la maladie de Crohn (MC)	98
Figure 24 : Immunobiologie intestinale d'un patient sain.....	104
Figure 25 : Immunobiologie intestinale d'un patient atteint de la maladie de Crohn	111
Figure 26 : Impact des polymorphismes de NOD-2.....	116
Figure 27 : Impact du polymorphisme T300A de ATG16L1.....	121
Figure 28 : Impact du polymorphisme C313T de IRGM	123
Figure 29 : Impact des polymorphismes ULK1 et LRRK2.....	126
Figure 30 : Identification de la signature autophagique de cellules dendritiques immatures primaires	163
Figure 31 : Evolution de la quantité p62 dans des cellules dendritiques humaines en fonction de leur statut de maturation.....	165
Figure 32 : Dépolarisation des membranes des mitochondries dans des cellules dendritiques humaines	167
Figure 33 : Activation du processus de mitophagie dans des cellules dendritiques humaines	169
Figure 34 : Estimation de la quantité de lysosomes dans des cellules dendritiques humaines associées à leur statut de maturation	171
Figure 35 : Analyse des voies de signalisation qui régule l'activation de l'autophagie dans des cellules dendritiques humaines associées à leur statut de maturation.....	172

A. Introduction bibliographique

I. L'autophagie

1. Définition et découverte

L'autophagie (du grec « auto » soi-même et « phagien » manger : se manger soi-même) est un processus cellulaire d'autodigestion permettant la dégradation et le recyclage d'éléments cytoplasmiques grâce aux lysosomes. Ce processus, très conservé chez les eucaryotes, se met en place en réponse à différents types de stress afin de protéger la cellule, permettant ainsi de maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire. En fonction des mécanismes moléculaires impliqués, l'autophagie peut être sélective, c'est-à-dire éliminer les éléments nocifs ou inutiles pour la cellule de façon ciblée (tels que des pathogènes intracellulaires ou des mitochondries endommagées), ou non-sélective, c'est-à-dire éliminer de manière aléatoire les composants cellulaires (tels que des mitochondries endommagées). Au regard de ces fonctions, l'autophagie est aussi impliquée dans de nombreux processus développementaux et associée à la mort cellulaire. Un dysfonctionnement de l'autophagie peut engendrer et/ou faire évoluer de nombreuses pathologies comme les maladies neurodégénératives, les maladies inflammatoires ou les cancers.

Ce processus a été découvert dans les années 1960 grâce aux travaux de Christian de Duve (**Duve et al. 1955**). En utilisant des techniques de microscopie à partir d'échantillons de mammifères (portion cellulaire de foie de rat), ce dernier a mis en évidence l'existence de regroupements d'enzymes hydrolytiques qu'il nomma « lysosomes ». Il a été montré, plus tard, que certains de ces lysosomes peuvent séquestrer des organelles comme le réticulum endoplasmique, ou les mitochondries (**Novikoff et al. 1956 ; Clark 1957**). Le terme « autophagie » est établi ensuite, faisant référence au processus de séquestration intracellulaire impliquant des vésicules à doubles membranes, appelées autophagosomes, fusionnant avec des lysosomes.

2. Ensemble des processus autophagiques

Le processus autophagique repose sur la capture d'éléments cytoplasmiques divers, puis leur dégradation via le lysosome. Il existe trois formes d'autophagie qui sont caractérisées par un mode de capture des cargos différent ; ainsi on distingue la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (**Figure 1**).

a) La micro-autophagie

La micro-autophagie correspond à l'invagination d'éléments cytosoliques directement dans le compartiment endo/lysosomal afin d'y être digérés. Celle-ci est majoritairement décrite comme non-sélective (**Li et al. 2012**), mais il peut s'avérer qu'elle soit aussi sélective ; c'est le cas

de la micro-pexophagie qui correspond à une élimination sélective des péroxysomes (Sakai et al. 1998). La régulation de ce processus chez la levure passe par le complexe mTORC1 (pour mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) (Dubouloz et al. 2005). Cette forme d'autophagie reste à ce jour peu décrite chez les mammifères, de même que les mécanismes moléculaires qui la dirige.

b) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes

L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (ou CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) implique une sélection spécifique de protéines ou d'agrégats protéiques à éliminer. Au niveau du cytosol, les éléments à dégrader sont directement transloqués vers le lysosome grâce au motif d'acides aminés KFERQ (pour lysine(K) - phénylalanine(F) - acide glutamique(E) - arginine(R) - glutamine(Q)) (Chiang et Dice 1988), porté par les protéines ciblées. Ce motif est reconnu par la protéine chaperonne Hsc70 au sein d'un complexe de protéines chaperonnes interagissant avec le transporteur lysosomal LAMP-2A (pour Lysosome Associated Membrane Protein-2A), permettant la dégradation directe via le lysosome (Chiang et al. 1989 ; Cuervo et Dice 1996 ; 2000). Ce processus est régulé par la disponibilité en nutriments ou par certains stress cellulaires. Les mécanismes moléculaires qui dirigent cette voie sont mal connus à ce jour. Cependant, des études récentes permettent de mieux comprendre la régulation de cette voie. En effet, Pajares *et coll.* ont montré que l'expression de LAMP-2A est contrôlée positivement par le facteur de transcription NRF2 (ou NFE2L2 pour Nuclear Factor Erythroid derived 2 Like 2). Ainsi en condition de stress, NRF2 est activé afin d'induire la voie de la CMA (Pajares et al. 2018). De plus, l'activité de LAMP-2A est contrôlée par la voie des MAPKs (p38) induite par le stress du réticulum, qui phosphoryle le transporteur pour l'activer (Li et al. 2017).

c) La macro-autophagie

La macro-autophagie, communément appelée autophagie, est la première forme d'autophagie découverte mais aussi la plus décrite à ce jour. Elle est caractérisée par la formation d'une double membrane isolée, appelée phagophore. Ce dernier entoure une portion du cytoplasme à dégrader, puis s'allonge pour finalement se refermer et former une vésicule à double membrane, appelée autophagosome. L'autophagosome va ensuite fusionner avec un lysosome afin d'éliminer son contenu. Ce mécanisme se déroule en trois étapes, nommées l'initiation, l'élongation et la maturation. Il est finement régulé, notamment par le complexe mTORC1. Je détaillerai par la suite l'ensemble de ce mécanisme dans la partie 3 ci-après.

Pour la suite du manuscrit, j'utiliserai le terme autophagie pour faire référence à la macro-autophagie, la seule forme d'autophagie étudiée dans mes travaux de thèse.

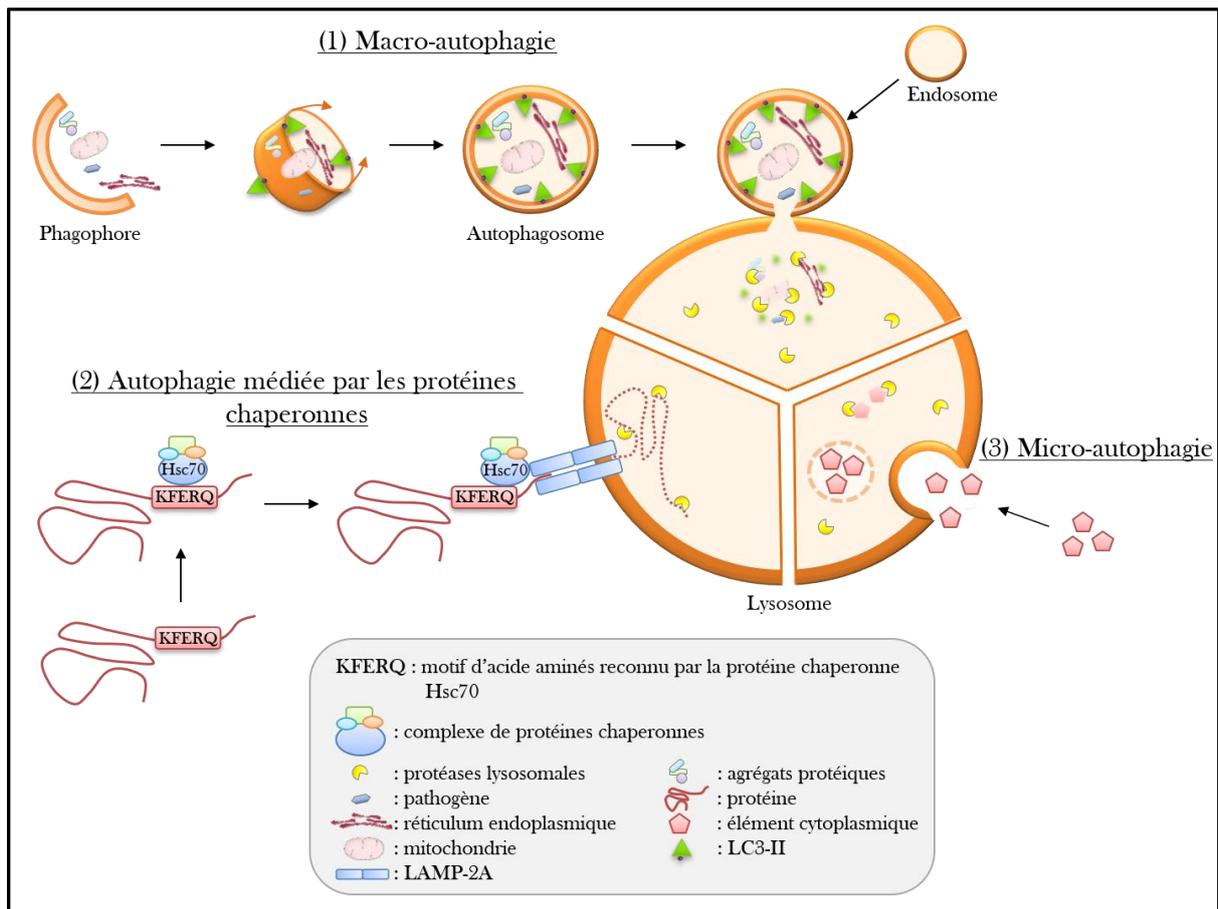


Figure 1 : Les trois formes d'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique intracellulaire qui se déroule dans les cellules eucaryotes et qui utilise la voie du lysosome pour dégrader les éléments cytoplasmiques capturés. Il existe trois formes d'autophagie, qui sont les suivantes : (1) la macro-autophagie, (2) l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (ou CMA) et la micro-autophagie.

(1) La macro-autophagie, ou communément appelée l'autophagie, se caractérise par la formation d'une vésicule à double membrane, nommée autophagosome, qui vient capturer les éléments à dégrader. (2) La CMA se caractérise par la sélection de cargos porteurs d'un motif d'acides aminés **KFERQ** par des protéines chaperonnes, telle que *Hsc70*. Enfin, (3) la micro-autophagie se caractérise par l'invagination directe de la membrane du lysosome permettant ainsi de capturer puis dégrader des éléments cytosoliques.

3. Mécanisme moléculaire de l'autophagie

Comme je l'ai énoncé précédemment, l'autophagie se découpe en trois grandes étapes :

- (1) l'étape d'initiation amorce le processus autophagique et aboutit à la formation du phagophore, une double membrane isolée, en coupe et autonome.
- (2) l'étape d'élongation permet la capture du substrat, ainsi que l'expansion du phagophore jusqu'à sa fermeture, formant un autophagosome, une vésicule à double membrane.
- (3) l'étape de maturation engendre la fusion entre l'autophagosome et un lysosome pour dégrader et recycler son contenu.

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent les différentes étapes de l'autophagie sont régis par les gènes ATGs, qui ont été découverts chez la levure par les travaux de Tsukada et

Ohsumi. Grâce à différents mutants déficients pour l'autophagie, il a découvert l'existence du gène APG1 (plus tard renommé ATG1 pour AuTophagGy-related), qui sera le 1^{er} gène autophagique mis en évidence (Tsukada et Ohsumi. 1993). Aujourd'hui plus de 40 gènes ATGs ont été découverts chez la levure, avec pour certains une homologie chez les mammifères.

Dans la suite du manuscrit, seuls les protéines et mécanismes identifiés chez les mammifères seront décrits.

a) L'initiation

L'étape d'initiation de l'autophagie s'amorcent par divers signaux qui transitent à proximité de membranes du réticulum endoplasmique (ou RE) (Axe et al. 2008). En réponse aux signaux activateurs, le recrutement et l'activation de deux complexes protéiques vont permettre la formation de l'omégasome, une structure riche en phosphatidylinositol 3-phosphate (ou PI(3)P) située au niveau du RE (Axe et al. 2008). C'est d'abord le complexe ULK (pour Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1) qui est activé, pour permettre l'activation du second complexe, le complexe PI3K de classe III (pour PhosphatidyInositol 3-Kinase de classe III) (Backer. 2016 ; Papinski et Kraft. 2016). Par la suite, c'est au niveau de l'omégasome que d'autres protéines sont recrutées pour former une membrane d'isolation, appelée phagophore. La formation du phagophore nécessite un apport membranaire multiple, ainsi que la participation de vésicules spécialisées, appelées vésicules ATG9 et COPII (Figure 2).

(1) Le complexe ULK

Le complexe ULK, souvent appelé « complexe ULK1 », est composé de la protéine kinase ULK1, la sous-unité non-catalytique FIP200 (pour FAK family kinase-interacting protein of 200kDa), ATG13 et ATG101 (Lin et Hurley. 2016). La protéine ULK1 est une sérine/thréonine kinase qui fait partie d'une famille de protéines de plusieurs isoformes (4 isoformes chez l'homme, ULK 1 à 4), et dont l'activation est nécessaire à l'activité du complexe ULK. Cette activation passe par 2 étapes essentielles : le recrutement de ULK1 au niveau de la structure pré-phagophore et la stimulation de son domaine kinase.

Le recrutement d'ULK1 au niveau du site d'initiation du phagophore est essentiel à son activation. Pour cela elle possède un domaine EAT (pour Early Autophagy Targeting) en partie C-terminal qui lui permet d'interagir avec ATG13 au niveau du site d'initiation du phagophore (Ganley et al. 2009 ; Jung et al. 2009). De façon intéressante, c'est aussi ATG13 qui fait le lien entre ULK1 et FIP200 au sein du complexe ULK. La stabilité du complexe passe, quant à elle, par l'interaction entre la protéine ATG101 et ATG13 (Qi et al. 2015 ; Suzuki et al. 2015).

Il existe différentes voies qui conduisent à l'activation du domaine kinase d'ULK1. Tout d'abord, l'assemblage des sous-unités FIP200 et ATG13 avec la kinase ULK1 semble primordiale à son activité et sa stabilité (Hara et al. 2008 ; Hosokawa et al. 2009 ; Ganley et al. 2009). En effet, c'est au sein de ce complexe qu'ULK1 est capable de s'autophosphoryler au niveau de sa boucle catalytique, sur la thréonine 180 (ou Thr180) (Bach et al. 2011), permettant son activation. De plus, ce co-assemblage au sein du complexe ULK favorise le rapprochement allostérique de plusieurs kinases, favorisant leur autophosphorylation. Par ailleurs, en condition de carence énergétique, la protéine AMPK est alors activée et peut directement phosphoryler ULK1 au niveau de nombreux sites, ce qui entraîne l'activation de cette dernière (Kim et al. 2011).

Une fois activée et stabilisée, la protéine ULK1 va pouvoir phosphoryler les différentes sous-unités du complexe ULK, favorisant ainsi l'activation complète du complexe. D'autres cibles de la kinase sont décrites à ce jour, comme certaines protéines de la machinerie autophagique dont le complexe PI3K de classe III, ou interagissent avec des protéines autophagiques, dont FUNDC1 dans le cadre de la mitophagie. L'interaction entre le complexe ULK1 avec le second complexe PI3K de classe III est importante pour permettre son activation. En effet la kinase ULK1 phosphoryle et active différents membres de ce complexe comme les protéines Beclin1 (Russell et al. 2013) et ATG14 (Wold et al. 2016), ou bien des régulateurs de celui-ci comme la protéine AMBRA1 (Di Bartolomeo et al. 2010).

(2) Le complexe PI3K de classe III

De façon complémentaire au complexe ULK, le complexe PI3K de classe III joue, lui aussi, un rôle essentiel dans l'initiation du processus autophagique. En effet, ce complexe permet de générer du PI(3)P, après phosphorylation du groupement lipidique du phosphatidylinositol (ou PI) situé au niveau du RE, dans un domaine qui deviendra alors le futur site d'initiation du phagophore, appelé omégasome (Backer. 2016). Le PI(3)P est un élément clé de la formation du phagophore, permettant le recrutement de nombreuses protéines comme certaines ATGs, ou encore du régulateur WIPI-2 (cette partie sera détaillée ci-après).

Le complexe PI3K de classe III est composé de deux sous-complexes, PI3KC3-C1 et PI3KC3-C2. Ces derniers possèdent tous deux la sous-unité catalytique VPS34 (pour human Vacuolar Protein Sorting 34), la protéine Beclin1 qui joue un rôle de centre régulateur, ainsi que la protéine accessoire VPS15 (aussi appelée p150) qui est importante pour leur formation et leur stabilité (Petiot et al. 2000). Ces deux sous-complexes sont tous deux importants lors de l'initiation de l'autophagie et jouent des rôles complémentaires distincts. Le sous-complexe I (ou PI3KC3-C1) joue un rôle plus direct au niveau de la formation et de l'élongation du phagophore, grâce à sa

sous-unité propre ATG14L. Le sous-complexe II (ou PI3KC3-C2), quant à lui, joue un rôle complémentaire dans la maturation des autophagosomes, grâce à sa sous-unité propre UVRAG (Itakura et al. 2008) (cet élément sera détaillé dans la partie I.3.c. La maturation de l'autophagosome).

Tout comme le complexe ULK, le complexe PI3K de classe III doit d'abord être recruté au site d'initiation du phagophore pour y être activé. Initialement, VPS34 est fixé au niveau du cytosquelette et interagit avec Beclin1. À la suite de l'activation du premier complexe ULK et de la phosphorylation de AMBRA1 (pour Activating Molecule in Beclin 1 Regulated Autophagy protein 1), ce dernier va se fixer à Beclin1 afin de détacher VPS34 et de le transloquer au niveau de l'omégasome (Di Bartolomeo et al. 2010). L'assemblage de VPS34-Beclin1 avec ATG14L et surtout VPS15 stabilise le complexe entier afin d'activer la sous-unité catalytique (Zhong et al. 2009). D'autres protéines participent à l'activation de VPS34, comme le facteur NRBF2 (pour Nuclear Receptor Binding Factor 2), qui peut se fixer au PI3KC3-C1 via le domaine N-terminal d'ATG14L et de Beclin1, favorisant la dimérisation du sous-complexe et stimulant son activité kinase (Cao et al. 2014 ; Lu et al. 2014). De manière intéressante, le niveau d'ubiquitylation de Beclin1 lui permet d'être maintenue au complexe PI3K ou d'être dégradée, régulant ainsi l'activité du complexe (Liu et al. 2016).

Une fois formé le PI(3)P joue un rôle essentiel dans la suite du processus autophagique. Il permet notamment le recrutement des protéines WIPIs (pour WD-repeat domain phosphoinositide-Interacting Proteins) qui régulent la formation du phagophore et de l'autophagosome. Il existe 4 protéines WIPIs chez les mammifères (WIPI-1, 2, 3 et 4) qui sont capables d'interagir avec PI(3)P (Baskaran et al. 2012). Les protéines WIPI-1 et 2 sont les premières à être recrutées à la membrane de l'omégasome, permettant ensuite le recrutement de protéines ATGs, dont le conjugué ATG16L1-ATG5-ATG12, afin de réguler la lipidation de LC3 et son enchâssement dans la membrane. Ainsi WIPI-1 et WIPI-2 participe à la formation du phagophore (Polson et al. 2010 ; Gaugel et al. 2012 ; Dooley et al. 2014). D'autre part, les protéines WIPI-3 et 4 vont jouer le rôle de protéines d'échafaudage (autrement dit « scaffold proteins ») afin de réguler la formation de l'autophagosome (Bakula et al. 2017). En effet, WIPI-4 va interagir avec ATG2 pour former un complexe avec AMPK et ULK1, puis se localiser au niveau de l'autophagosome naissant. Il sera ensuite rejoint par WIPI-3 qui va interagir avec le complexe TSC, régulant l'activité de mTOR.

(3) Rôle des vésicules ATG9 et COPII

Les vésicules ATG9 et COPII ont un rôle important lors de l'initiation de l'autophagie.

Les vésicules ATG9 sont générées à partir du réseau transgolgien (Reggiori et al. 2004 ; Young et al. 2006), ayant comme composante principale la protéine autophagique transmembranaire ATG9. Ces vésicules semblent très importantes pour les étapes précoces de formation du phagophore en conditions de carence en nutriments (Young et al. 2006 ; Matoba et al. 2020). De façon intéressante, ces vésicules se localisent à proximité de l'omégasome et délivrent de nombreux composants nécessaires à la formation du phagophore sans connexion apparente avec la double membrane (Orsi et al. 2012). Par ailleurs, la protéine ATG9 peut être recrutée au niveau de la membrane de l'omégasome pour former un complexe avec les protéines ATG2 et ATG18. ATG2 va interagir avec le RE afin de transférer des lipides vers la membrane de l'omégasome (Velikkakath et al. 2012). C'est ensuite ATG9 qui va enchâsser ces lipides dans la membrane et permettre l'expansion de la membrane d'isolation qui formera le phagophore (Matoba et al. 2020).

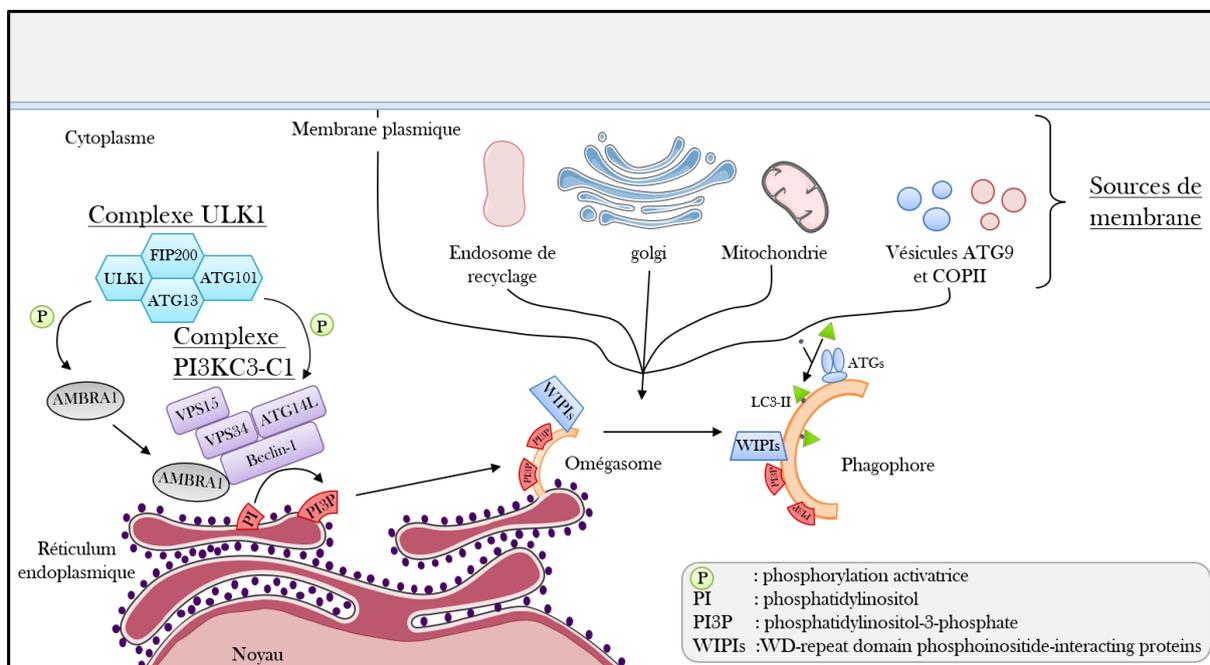


Figure 2 : Initiation de l'autophagie

L'initiation de l'autophagie prend place au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), où se regroupe deux complexes protéiques : le complexe ULK1 et le complexe PI3KC3-C1. Divers signaux activateurs entraînent la formation du complexe ULK1 vers la membrane du RE, puis l'assemblage et l'activation du complexe PI3KC3-C1. Ce dernier est responsable de la synthèse de PI(3)P, au niveau de la membrane du RE, formant alors une zone appelée l'omégasome, qui sera le site d'initiation de la formation de la vésicule autophagique. L'isolation d'une portion de cette membrane conduit à la formation du phagophore, caractérisé par une double membrane. Le phagophore est alimenté par diverses éléments intracellulaires (telles que les endosomes, les mitochondries ou encore les vésicules ATG9 et COPII spécialisées) et régulé par de nombreuses protéines autophagiques (telles que les protéines WIPIs, ATGs ou encore LC3).

Les vésicules COPII (pour COat Protein complexe II) sont des vésicules composées d'un complexe protéique appelé COPII. Elles sont assemblées au niveau du compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique-golgien (ou ERGIC pour Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment) et libérées dans le cytosol par bourgeonnement (**Faini et al. 2013**). Elles jouent un rôle clé dans l'expansion précoce du phagophore. En effet, une fois dans le cytosol, elles vont se localiser au niveau de l'omégasome et servent de plateforme pour la lipidation de LC3, qui sera ensuite délivré dans la membrane de l'omégasome afin de former le phagophore (**Ge et al. 2014**).

(4) L'origine du phagophore

Le phagophore est caractérisé par une structure à double membrane en coupe, autonome, qui va subir de nombreuses modifications avant de s'expandre et se refermer pour former une vésicule appelée autophagosome. L'origine de cette membrane fait l'objet d'intenses débats parmi les scientifiques qui s'intéressent à l'autophagie. Le réticulum endoplasmique apparait comme la source principale de membrane pour la biogenèse du phagophore, puisqu'il semble établi qu'elle commence au niveau d'un domaine spécifique du RE, nommé l'omégasome (**Axe et al. 2008 ; Roberts et Ktistakis. 2013**). Comme décrit dans les paragraphes précédent, ce domaine est une zone spécialisée, riche en PI(3)P, permettant notamment le recrutement de la machinerie autophagique. En effet, la formation du phagophore lui-même fait suite à la mise en place de l'omégasome. Malgré son importance dans les étapes précoces, le RE est cependant insuffisant à fournir tous les éléments nécessaires à la formation du phagophore. De ce fait, il existe de nombreuses zones de contacts entre le RE et les mitochondries, appelées MAM (pour Mitochondria-Associated Membrane), permettant un apport lipidique important pour le phagophore (**Hailey et al. 2010 ; Hamasaki et al. 2013**). De plus, il a été montré que la membrane plasmique peut être, elle aussi, considérée comme source de membrane, lors de la formation précoce du phagophore (**Ravikumar et al. 2010**). En effet, la protéine ATG16L1 va interagir avec la clathrine, située au niveau de la membrane plasmique, pour induire de l'endocytose dépendante de clathrine et générer des vésicules appelées précurseurs autophagiques. Ces précurseurs pourront alors s'assembler afin de participer à la formation du phagophore. De manière intéressante, l'appareil de golgi (**Young et al. 2006**), les endosomes de recyclage (**Puri et al. 2013**), mais aussi le compartiment ERGIC (**Ge et al. 2013**) sont tous, plus ou moins, impliqués dans l'apport membranaire nécessaire au processus de biogenèse du phagophore. Il semble donc qu'il y ait une origine multiple conduisant à la formation du phagophore.

b) L'élongation du phagophore

Une fois l'initiation de l'autophagie amorcée et le phagophore formé, ce dernier s'expand tout en séquestrant une portion du cytoplasme à dégrader. Par la suite, il va finir par se refermer en une vésicule à double membrane appelée autophagosome (Figure 4). C'est l'étape d'élongation. Cette étape fait intervenir deux systèmes dits « de conjugaison » : le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 et le système de conjugaison LC3 (Figure 3). Ces deux systèmes permettent à terme la liaison covalente de la protéine LC3 (pour Light Chain 3) avec une molécule de phosphatidyl-éthanolamine (ou PE) au niveau de la membrane du phagophore ; on parle aussi de lipidation de LC3. Le mécanisme de ces deux systèmes de conjugaison est semblable au système menant à l'ubiquitination de substrats, et sont alors appelés systèmes de conjugaison de type ubiquitine (ou ubiquitine-like en anglais). Ainsi, des protéines autophagiques vont jouer un rôle semblable aux E1, E2 et E3 ubiquitine ligases, et sont alors appelées E1-like, E2-like et E3-like.

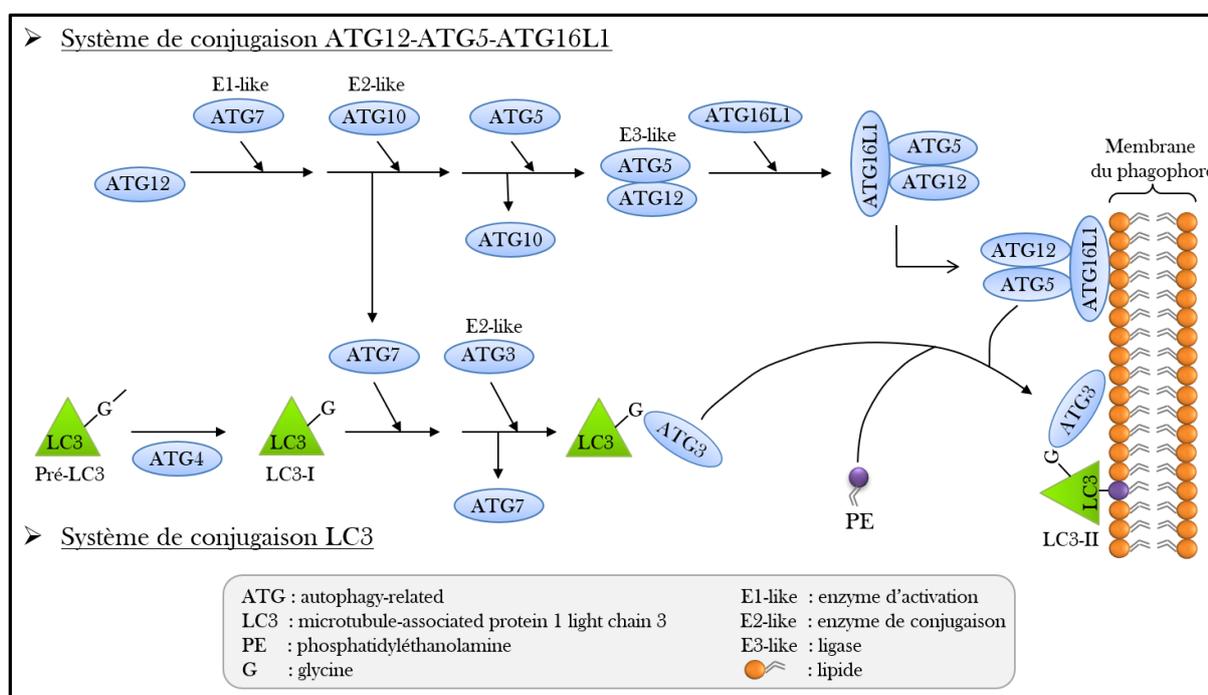


Figure 3 : Les systèmes de conjugaison

Il existe deux systèmes de conjugaison de type « ubiquitine-like », composés de diverses protéines ATGs, et aboutissant à la liaison covalente de LC3-I à un phosphatidyléthanolamine. Certaines de ces ATGs vont jouer le rôle d'enzymes de type E1/E2/E3-like, aboutissant à la formation de deux conjugués ATG12-ATG5 et LC3-I-PE (ou LC3-II). C'est d'abord le conjugué ATG12-ATG5 qui est formé, puis stabilisé à la membrane du phagophore par la protéine ATG16L1. Une fois stabilisé, c'est lui qui permet la formation du second conjugué LC3-II, essentiel à l'élongation du phagophore.

(1) Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1

La mise en place du système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 (**Mizushima et al. 1998 ; 2003**) commence par l'activation de la molécule « ubiquitin-like » ATG12 grâce à la protéine ATG7 (ou E1-like) qui joue le rôle d'enzyme d'activation (**Tanida et al. 2001**). Par la suite, ATG12 est transférée à ATG10 (ou E2-like), une enzyme de conjugaison (**Nemoto et al. 2003**), pour y être associée, via une liaison covalente, à ATG5 au niveau de la lysine 130 (ou Lys130) (**Mizushima et al. 1998**). La conjugaison entre ATG12 et ATG5 est essentielle pour l'élongation du phagophore, jouant le rôle de ligase (ou E3-like) pour le système de conjugaison LC3 (**Kabeya et al. 2000**). Pour finir, le conjugué ATG12-ATG5 s'associe de façon non-covalente à ATG16L1 au niveau de la membrane du phagophore. De manière intéressante, lors de l'étape d'initiation, le complexe PI3KC3 va permettre le recrutement de la protéine effectrice WIPI2 au niveau de l'omégasome, via l'interaction de WIPI2 avec le PI(3)P. C'est alors WIPI2 qui va recruter au préalable ATG16L1 pour permettre le recrutement du conjugué ATG12-ATG5 au niveau du phagophore (**Dooley et al. 2014**). La mise en place du système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 délimitera le site de localisation et de lipidation de la protéine LC3.

(2) Le système de conjugaison LC3

Chez les mammifères, il existe plusieurs protéines homologues définissant la famille des protéines ATG8-like (où ATG8 est le seul représentant chez la levure) réparties en 2 sous-familles ; la sous-famille des MAP1LC3 ou LC3 (pour Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3) comprenant LC3A, LC3B, LC3B2 et LC3C, et la sous-famille des GABARAP (pour GABA type A Receptor-Associated Protein) comprenant GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 (**Kabeya et al. 2000 ; 2004 ; Shpilka et al. 2011**). Il s'avère que le rôle de chaque sous-famille diffère : les protéines LC3 sont impliquées dans l'élongation du phagophore, alors que les protéines GABRAP seraient impliquées dans la fermeture de l'autophagosome lors de l'étape de maturation (**Weidberg et al. 2010**).

La protéine LC3, qui est la protéine ATG8-like la plus caractérisée à ce jour, existe sous 2 formes : une forme cytosolique, LC3-I, et une forme membranaire, LC3-II, localisée à la membrane du phagophore et de l'autophagosome. Il est intéressant de noter que c'est pour cette raison que LC3-II est communément utilisée comme marqueur des autophagosomes. De plus, le passage de LC3-I vers LC3-II peut être facilement suivi grâce à la technique du western-blot, une technique qui sera beaucoup utilisée dans ces travaux de thèse.

En parallèle de la mise en place du premier système de conjugaison, le « pré-LC3 » est clivé au niveau d'un résidu glycine en C-terminal par ATG4 pour former LC3-I, dans le cytosol (**Tanida et al. 2004**). Ce même LC3-I sera ensuite activé par la protéine ATG7 (ou E1-like), puis

transféré à ATG3 (ou E2-like) pour être conjugué au PE et enchâssé dans la membrane du phagophore grâce au conjugué ATG12-ATG5 (ou E3-like), formant ainsi le LC3-II (Kabeya et al. 2000 ; Tanida et al. 2002).

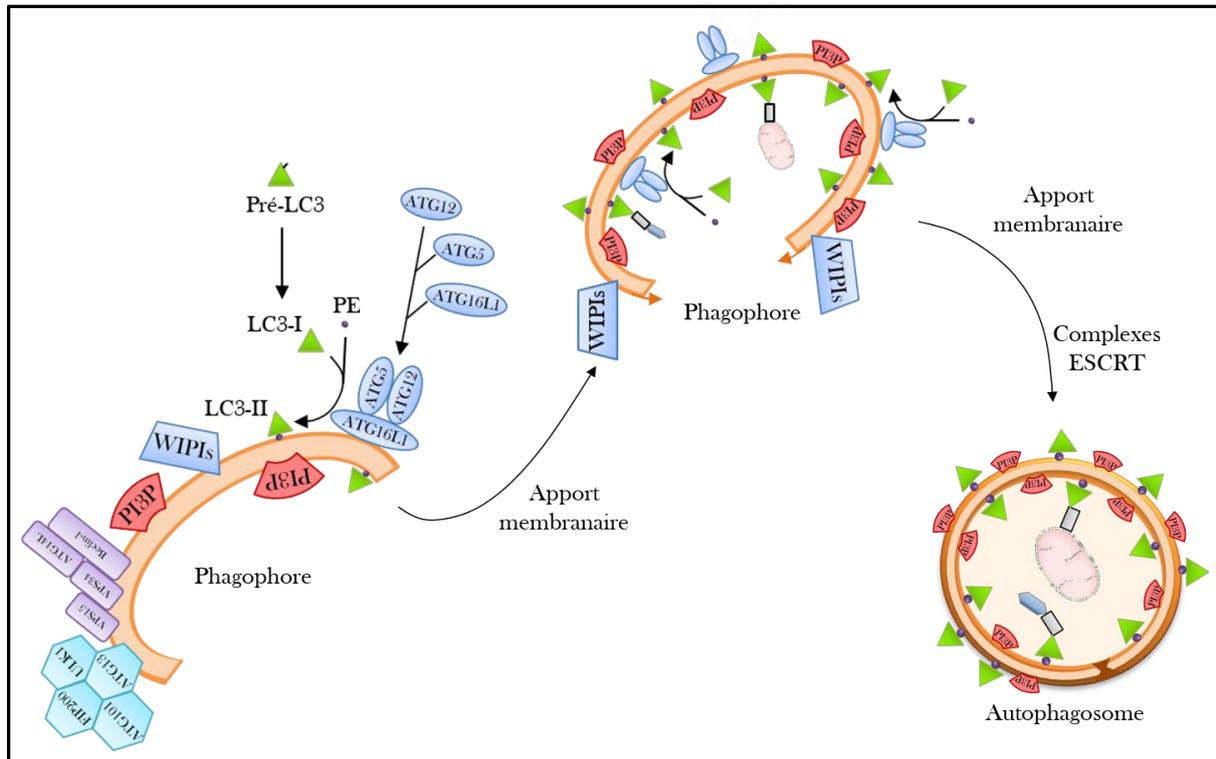


Figure 4 : Elongation du phagophore

L'élongation démarre après la formation du phagophore, une double membrane isolée et autonome, où s'agrègent les protéines WIPI-1 et 2. Ces protéines recrutent les deux systèmes de conjugaison à proximité de la membrane du phagophore. Ces deux systèmes engendrent la formation du LC3-II, qui est ensuite enchâssé dans la membrane du phagophore, pour permettre l'élongation de ce dernier. C'est grâce à un apport membranaire continue que le phagophore s'étend jusqu'à se refermer. La fermeture de celui-ci est régulé par trois complexes ESCRT (ESCRT-I, II et III) qui permettent la scission des membranes du phagophore et la formation d'une vésicule fermée, l'autophagosome.

Un apport membranaire continu permet l'élongation du phagophore au niveau de ses extrémités jusqu'à sa fermeture, formant ainsi un autophagosome (Figure 4). Le mécanisme exact de la fermeture du phagophore n'était pas connu jusqu'à présent et c'est l'hypothèse de la scission membranaire qui était mise en avant (Knorr et al. 2015). Cependant, les travaux récents de Schöneber *et coll.* ont permis de décrypter un peu plus ce mécanisme. Ces travaux montrent que la fermeture de l'autophagosome est engendrée par plusieurs complexes ESCRT (pour Endosomal Sorting Complexes Required for Transport). Le complexe ESCRT-I se met tout d'abord en place de part et d'autre de chaque membrane afin de recruter le complexe ESCRT-II. Ces complexes vont recruter et stabiliser un troisième complexe, ESCRT-III, qui formera une spirale entre les deux membranes afin de les rapprocher et de permettre leur scission. Pour finir

c'est la VPS4 qui permet de désassembler et recycler le complexe ESCRT-III (Schöneberg et al. 2018).

Afin de former des autophagosomes complets, une partie du LC3-II situé au niveau de la face externe du phagophore est dissociée de la membrane par la cystéine protéinase ATG4 (Yu et al. 2012).

c) La maturation de l'autophagosome

L'étape de maturation correspond à la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, aboutissant à la dégradation et le recyclage de son contenu (Figure 5). Cette étape est modulée par trois familles de protéines régulatrices de la fusion : les protéines RabGTPases, les protéines SNAREs (pour Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors) et les protéines d'attachement membranaire. L'acheminement des vésicules les unes vers les autres est, quant à lui, régulé par divers moteurs moléculaires.

Il est intéressant de noter que lors de cette étape, les protéines lysosomales LAMP1/2 peuvent elles aussi intervenir pour réguler la fusion (Tanaka et al. 2000b ; Eskelinen et al. 2002 ; 2004). Il arrive parfois que l'autophagosome fusionne au préalable avec des endosomes, créant alors un amphisome. En effet, lors de l'endocytose de certaines bactéries, ces dernières vont être séquestrées dans des vésicules d'endocytoses. Ces endosomes sont parfois altérés par les bactéries internalisées et sont donc ciblées par autophagie grâce à la galectine 8 qui fixe ces organites et recrute alors le récepteur autophagique NDP52. Les endosomes sont ensuite acheminés vers l'autophagosome grâce à NDP52, qui promeut leur fusion et la maturation de l'autophagosome (Verlhac et al. 2015). La formation de l'amphisome est régulée par les complexes ESCRT qui permettent la fusion entre l'endosome et l'autophagosome (Rusten et Stenmark. 2009).

(1) Les protéines RabGTPases

Les RabGTPases sont des petites GTPases de la famille des protéines Rab (pour Ras-related protein in brain). Elles sont impliquées dans la régulation du trafic membranaire chez les eucaryotes, favorisant le transport de vésicules vers une membrane cible, puis leur fusion (Stenmark. 2009). Certaines d'entre elles ont été décrites comme étant des protéines régulatrices de l'autophagie, par exemple, la protéine Rab7.

Rab7 se localise au niveau de la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes (Feng et al. 1995). Elle est importante pour la maturation des autophagosomes, en particulier au niveau des étapes de fusion entre autophagosome et lysosome (Gutierrez et al. 2004 ; Jäger et al. 2004). Cette activité de Rab7 est régulée par interaction avec de nombreux partenaires. Liang *et coll.* ont notamment démontré que la protéine UVRAG (du sous-complexe PI3KC3-C2) se localise au niveau des endosomes en liant le complexe HOPS afin de stimuler Rab7, et promouvoir la fusion

autophagosome-lysosome (**Itakura et al. 2008 ; Liang et al. 2008**). De manière intéressante, afin de réguler négativement l'activité du complexe PI3K de classe III, Rubicon interagit simultanément avec Rab7 et Beclin1, bloquant ainsi le trafic endosomal et la maturation autophagique (**Tabata et al. 2010**). Par ailleurs, il a été démontré que le facteur PLEKHM1 (pour PLEKstrin Homology and RUN domain containing M1) jouait un rôle important en tant qu'adaptateur lors de l'étape de fusion. En effet, il interagit avec le complexe HOPS et Rab7 au niveau des endo/lysosomes, mais aussi la protéine LC3 au niveau de l'autophagosome (**McEwan et al. 2015**). Enfin, Rab7 peut former un complexe avec la protéine FYCO1 (pour FYVE and coiled-coil domain containing 1) qui est elle-même liée à la protéine LC3, mais aussi au PI(3)P via le domaine FIVE (pour Fab1-YOTP-Vac1-EEA1) à la membrane des autophagosomes. La formation de ce complexe permettrait à FYCO1 d'induire le transport de l'autophagosome vers les lysosomes, via le réseau de microtubules et en se liant à la kinésine (**Pankiv et al. 2010**).

(2) Les protéines SNAREs

Les protéines SNAREs sont des protéines trans-membranaires, divisées en 2 groupes de protéines, les Q-SNAREs et les R-SNAREs. Les Q-SNAREs portent un résidu glutamine (ou Q) et sont localisées au niveau du compartiment receveur. Les R-SNAREs portent un résidu arginine (ou R) et sont localisées au niveau du compartiment donneur. Différentes protéines SNAREs peuvent se regrouper pour former un complexe « trans-SNARE » permettant le rapprochement et la fusion des deux compartiments vésiculaires. Certaines SNAREs régulent la fusion entre autophagosomes et lysosomes, comme les protéines VAMP3 et VAMP7, deux R-SNAREs localisées au niveau des endosomes tardifs et lysosomes (**Fader et al. 2009**). En condition de carence en nutriments, la Q-SNARE STX17 (ou syntaxin 17) est recrutée au niveau des autophagosomes pour promouvoir la fusion autophagosome-lysosome en coopération avec la Q-SNARE SNAP29 et la R-SNARE VAMP8, située au niveau des lysosomes (**Itakura et al. 2012 ; Diao et al. 2015 ; Viret et Faure. 2019**).

(3) Les protéines d'attachements membranaires

Les protéines d'attachements sont toutes aussi essentielles lors de l'étape de maturation en facilitant l'amorçage et la fusion des membranes.

Le complexe HOPS (pour HOMotypic fusion and Protein Sorting) est l'un des facteurs d'attachements le plus important et le plus décrit lors de la maturation autophagique, grâce à ses nombreuses interactions avec tous les partenaires essentiels à la fusion. En effet, l'amorçage entre endo/lysosomes et autophagosomes peut être facilité grâce à l'interaction entre HOPS et Rab7 ; comme vu précédemment, Rab7 va recruter la protéine adaptatrice PLEKHM1 qui va interagir avec HOPS et LC3 (**McEwan et al. 2015**). De plus, le complexe HOPS stimule la formation et

la stabilisation des complexes « trans-SNARE », induisant notamment, le recrutement de STX17 au niveau des autophagosomes (Jiang et al. 2014). Pour finir, HOPS recrute les partenaires VPS33A et VPS16 requis pour la fusion (Wartosch et al. 2015). Une fois tous ces partenaires recrutés autour du complexe HOPS, puis activés, les membranes des endo/lysosomes et des autophagosomes peuvent fusionner.

EPG5 (pour Ectopic P Granule protein 5) est un autre facteur d'attachement qui fonctionne comme intermédiaire entre Rab7 et VAMP8 au niveau du compartiment endo/lysosomal et STX17-SNAP29 au niveau du compartiment autophagique, facilitant la stabilisation et l'assemblage du complexe « trans-SNARE » pour la fusion membranaire (Wang et al. 2016).

D'autres facteurs d'attachements peuvent jouer un rôle important lors de l'étape de maturation, comme la protéine ATG14L qui permet la formation du complexe STX17-SNAP29-VAMP8 (Diao et al. 2015).

(4) Le rôle du cytosquelette

Le cytosquelette permet d'acheminer diverses vésicules vers l'autophagosome en formation (d'abord vers l'omégasome, puis le phagophore et enfin l'autophagosome) tout au long du processus autophagique (Kast et Dominguez. 2017). Ainsi on distingue deux réseaux de cytosquelette les filaments d'actines et les microtubules, constitués de tubuline. Le cytosquelette est particulièrement important lors de l'étape de maturation des autophagosomes.

Le réseau d'actine permet un apport vésiculaire constant vers l'autophagosome en formation (Kast et Dominguez. 2017). C'est le moteur moléculaire myosine VI qui dirige ces transports (Tumbarello et al. 2012). Une fois l'autophagosome formé, ce sont les microtubules, composés de polymères de tubuline qui prennent en charge son déplacement (Köchl et al. 2006). Ils régulent le transport des autophagosomes vers les endosomes tardifs via le moteur moléculaire dynéine (associé à la dynactine), afin de former l'amphisome (Ravikumar et al. 2005). Par la suite, régulé par la kinésine, l'amphisome est déplacé vers le lysosome pour former l'autolysosome (Pankiv et al. 2010). De nouveau le réseau d'actine joue un rôle important, car c'est lui qui apporte les lysosomes au contact des amphisomes, régulé par la myosine I (Brandstaetter et al. 2014). Il existe des protéines adaptatrices qui permettent de relier les vésicules aux moteurs moléculaires, telles que FYCO1 ou encore RIPL.

FYCO1 est une protéine impliquée dans la régulation des mouvements des autophagosomes. Cette protéine adaptatrice est reliée aux autophagosomes via LC3-II et PI3P, faisant lien avec le moteur moléculaire kinésine, situé au niveau des microtubules (Pankiv et al. 2010).

Une autre protéine adaptatrice, RIPL (pour Rab-interacting lysosomal protein) fait le lien entre la dynéine, Rab7 et un senseur de cholestérol ORP1L (Jordens et al. 2001 ; Wijdeven et al. 2016).

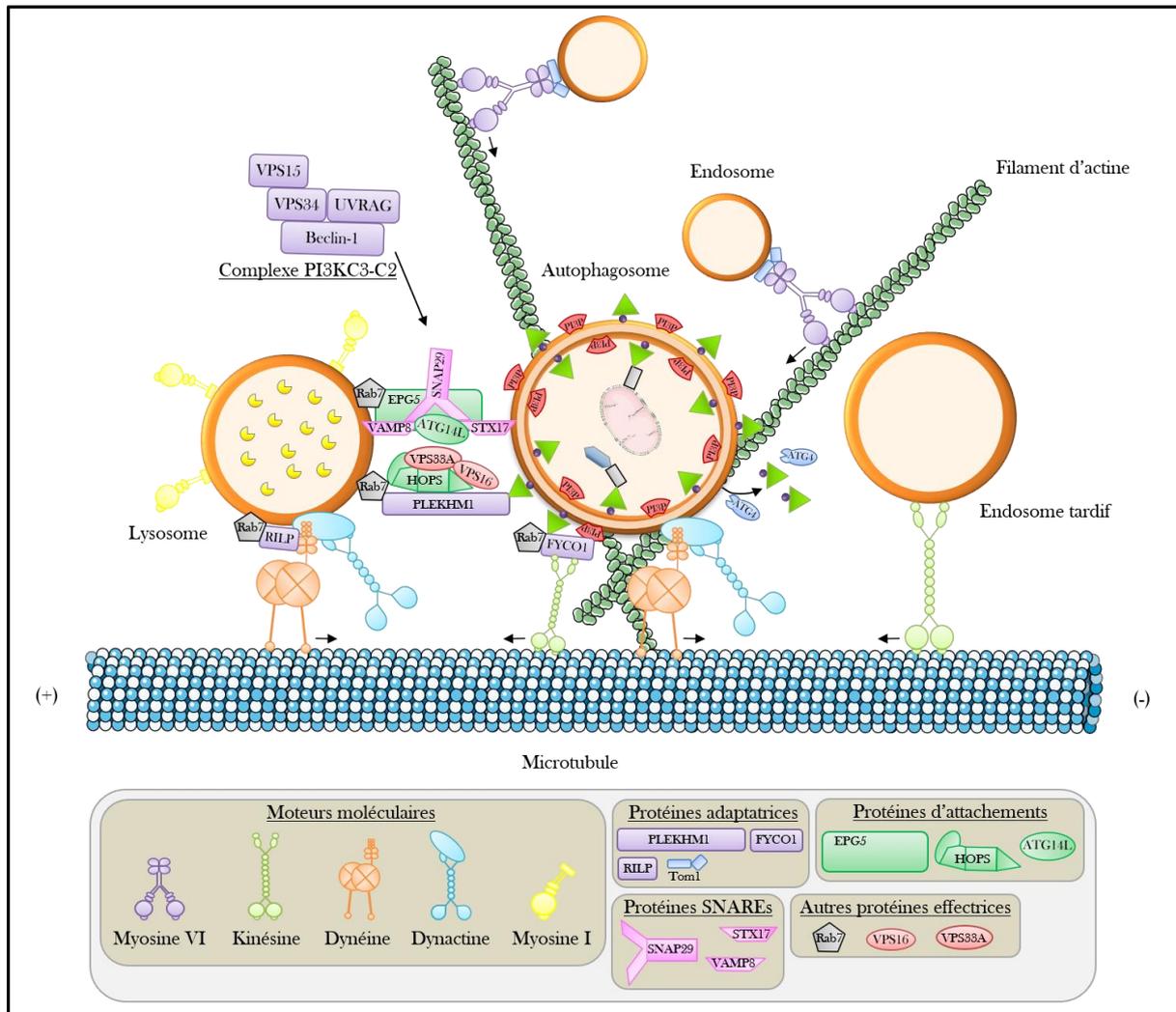


Figure 5 : Maturation de l'autophagosome

Lors de l'étape de maturation, l'autophagosome fusionne avec un lysosome afin de dégrader son contenu. Pour cela diverses protéines régulatrices interviennent pour promouvoir la fusion entre ces deux vésicules, à savoir des protéines RabGTPases (comme Rab7), des protéines SNAREs et des protéines d'attachements, dont les interactions sont contrôlées par des protéines adaptatrices. Le complexe PI3KC3-C2 intervient lui aussi pour recruter le complexe HOPS, essentiel à la fusion entre le lysosome et l'autophagosome. De nombreux moteurs moléculaires permettent d'acheminer les vésicules les unes vers les autres en se déplaçant le long du cytosquelette (filaments d'actine et microtubules).

Une fois la fusion autophagosome/lysosome terminée, l'acidification des lysosomes augmente progressivement grâce à des hydrolases H⁺ATPases, activant les enzymes lysosomales appelées cathepsines, qui vont dégrader le contenu de l'autolysosome. Une partie des nutriments est recyclée vers le cytosol grâce à un système de reflux.

d) Régulation de l'autophagie

L'autophagie est contrôlée par une multitude de signaux activateurs et inhibiteurs (niveau énergétique, ou encore facteurs de croissance) qui convergent en majorité vers la protéine mTOR, une sérine/thréonine kinase, que l'on retrouve au sein de deux complexes, mTORC1 et mTORC2. C'est le complexe mTORC1 qui est principalement impliqué dans la régulation de l'autophagie. Ce complexe agit au niveau de diverses étapes du processus autophagique en phosphorylant ses cibles (**Figure 6**). Cependant, il est intéressant de noter que l'autophagie peut aussi être régulée de manière indépendante de la voie mTOR (**Yin et al. 2016**).

Tout d'abord, de nombreuses études décrivent le rôle de mTORC1 comme un inhibiteur de l'initiation autophagique. En condition riche en nutriments, ce complexe phosphoryle la protéine ULK1 et ATG13, inactivant l'activité kinase de ULK1 et bloquant l'induction de l'autophagie (**Shang et Wang. 2011 ; Puente et al. 2016**). Par opposition, en condition de carence énergétique, l'activité de mTORC1 est inhibée, notamment par la sérine/thréonine kinase AMPK, ce qui le dissocie de ULK1. Cette dissociation permet ensuite à AMPK d'activer ULK1 par phosphorylation favorisant l'initiation de l'autophagie. AMPK est aussi capable d'inhiber indirectement le complexe mTORC1 par phosphorylation et inhibition de la protéine régulatrice du complexe, Raptor (**Lee et al. 2010**). D'autre part, mTORC1 peut réguler l'association entre ULK1 et AMPK en prévenant leur interaction par phosphorylation de ULK1 au niveau de son site d'interaction avec la kinase (**Kim et al. 2011**). Pour finir, mTORC1 régule indirectement ULK1, via la phosphorylation du régulateur AMBRA1, bloquant ainsi l'ubiquitinylation d'ULK1 par TRAF6. Par conséquent, la dimérisation et l'activation d'ULK1 sont inhibées (**Nazio et al. 2013**).

De façon complémentaire, mTORC1 est aussi capable de réguler le complexe PI3K. Pour ce faire, l'activité kinase de VPS34 est inhibée par phosphorylation de la protéine ATG14L au niveau de PI3KC3-C1 par mTORC1 (**Yuan et al. 2013**). La phosphorylation du régulateur AMBRA1, quant à elle, provoque une séquestration du complexe PI3K au niveau du cytosquelette, bloquant son recrutement à l'omégasome et inhibant l'initiation autophagique (**Di Bartolomeo et al. 2010**). En amont de la voie mTOR, la voie PI3K/AKT joue un rôle d'activateur du complexe mTORC1. En effet sous l'action de la PI3K, le PI(3)P active la kinase AKT qui inhibe, par phosphorylation, le complexe TSC1/TSC2. Cela entraîne une accumulation de Rheb, sous forme Rheb-GTP, stimulant l'activité kinase de mTORC1 et inhibant par conséquent l'autophagie. Enfin, l'affinité du facteur NRBF2 pour VPS34 est augmentée à la suite de sa phosphorylation par mTORC1, inhibant son activité kinase au niveau de PI3KC3-C1, bloquant l'initiation de l'autophagie (**Ma et al. 2017**).

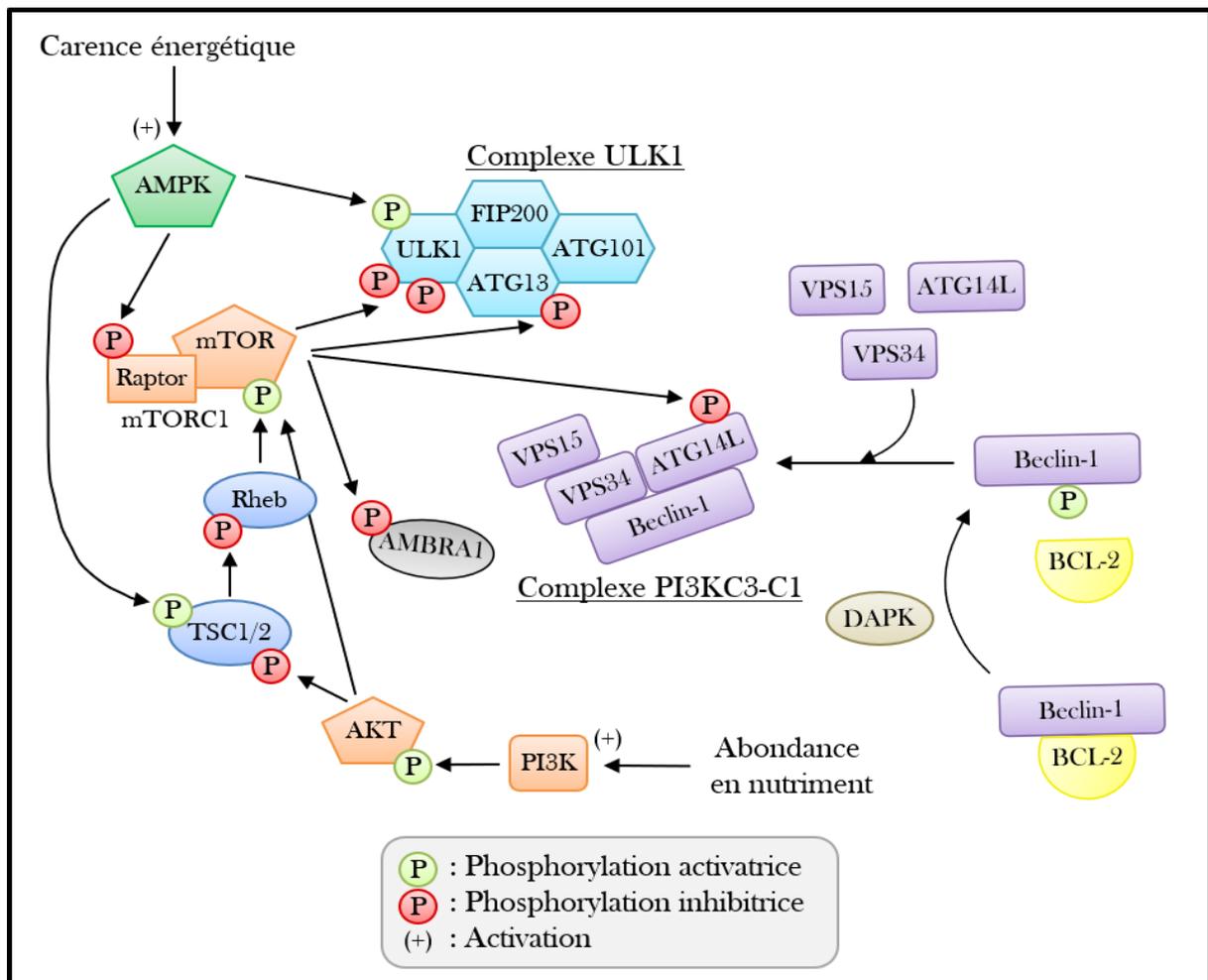


Figure 6 : Régulation de l'étape d'initiation

L'assemblage et l'activation des deux complexes d'initiation sont finement régulés afin de contrôler l'étape d'initiation du processus autophagique. Ainsi, la voie PI3K/AKT/mTORC1 régule négativement ces deux complexes en phosphorylant notamment les protéines ULK1, AMBRA1, ou encore ATG14L. De manière opposée, la kinase AMPK régule positivement le complexe ULK et négativement le complexe mTORC1. Indépendamment de ces deux voies, la protéine régulatrice BCL-2 peut séquestrer Beclin-1, inhibant son association au sein du complexe PI3KC3-C1. C'est la kinase DAPK qui bloque l'inhibition de Beclin-1, en phosphorylant son site d'interaction avec BCL-2.

Il existe d'autres signaux, comme les facteurs apoptotiques, qui jouent un rôle dans le contrôle de l'autophagie, et fonctionnent indépendamment de mTOR. C'est le cas pour le facteur anti-apoptotique BCL-2 (ou BCL-XL) qui interagit avec BECN1 au niveau de son domaine BH3. Cette interaction perturbe l'association du complexe PI3K, inhibant son activité kinase dirigée par VPS34 et bloquant la formation du phagophore (Patingre et al. 2005). Cette inhibition peut être empêchée grâce à la kinase DAPK. Celle-ci phosphoryle BECN1 au niveau du domaine BH3, bloquant l'interaction avec BCL-2 et permettant l'assemblage du complexe PI3K. VPS34 peut ainsi interagir avec BECN1 et activer son domaine kinase (Zalckvar et al. 2009b).

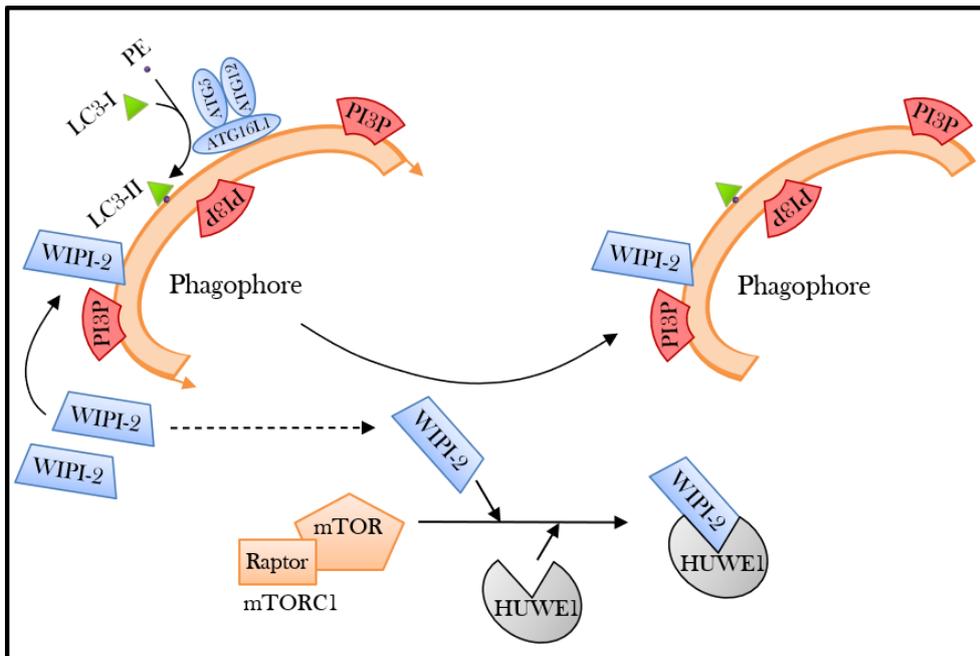


Figure 7 : Régulation de l'étape d'élongation

L'expansion du phagophore est régulée par la ligase HUWE1 qui contrôle la quantité de WIPI-2 disponible dans le cytoplasme. La séquestration de WIPI-2 par HUWE1 est, quant à elle, régulée par le complexe mTORC1.

D'autres études rapportent l'implication de mTORC1 dans la régulation de l'expansion du phagophore (Figure 7). Il est impliqué notamment dans l'interaction entre WIPI-2 et l'E3 ubiquitine ligase HUWE1, entraînant sa dégradation. Ainsi la quantité de WIPI-2 est diminuée, ce qui affecte l'étape de lipidation de LC3 et donc l'élongation du phagophore (Wan et al. 2018).

Pour finir sur la régulation du processus autophagique par mTOR, en condition riche en nutriments, il a été démontré que mTORC1 peut phosphoryler UVRAG afin que celui-ci interagisse avec RUBICON, bloquant le recrutement du complexe HOPS au niveau des autophagosomes et abrogeant l'étape de maturation (Kim et al. 2015) (Figure 8).

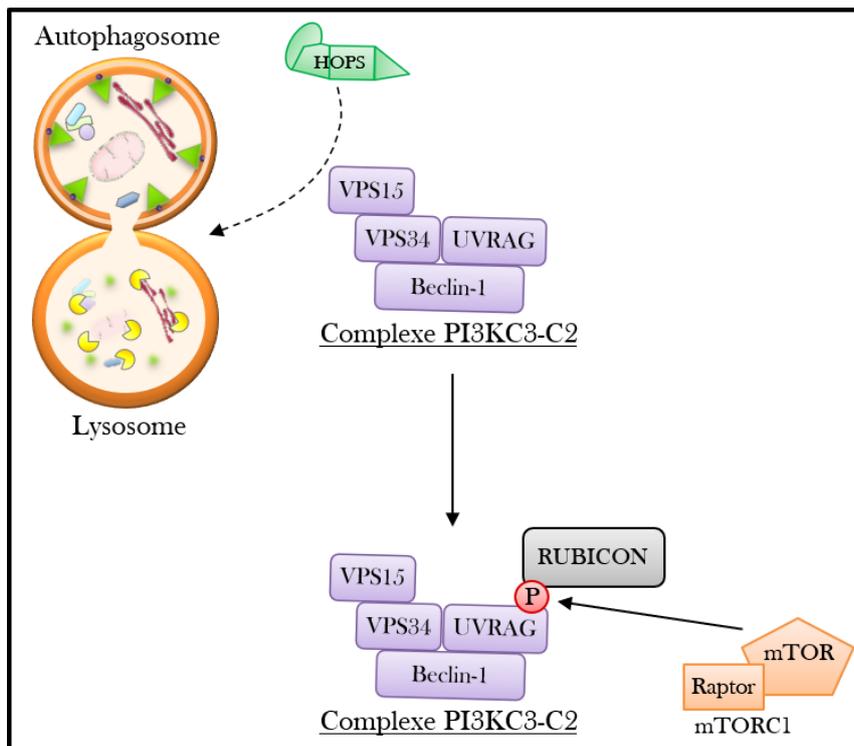


Figure 8 : Régulation de l'étape de maturation

La maturation de l'autophagosome dépend de la régulation de protéines d'attachements dont le complexe HOPS par le sous-complexe PI3KC3-C2. Le recrutement de HOPS peut être inhibé par le complexe mTORC1 via la phosphorylation de UVRAG.

4. L'autophagie sélective

L'autophagie sélective contribue à la régulation de l'homéostasie intracellulaire, participant à la dégradation ciblée de matériels cytosoliques, comme les agrégats protéiques, les organelles endommagées, mais aussi les pathogènes. Ce processus passe par une reconnaissance spécifique des éléments à dégrader, ou cargos, permettant leur élimination efficace via l'autophagie. La voie d'autophagie sélective ainsi induite porte le nom du substrat à dégrader : l'agréphagie (dégradation d'agrégats protéiques), la ferritinophagie (dégradation de ferritine), la xénophagie (dégradation de pathogènes), ou encore la mitophagie (dégradation de mitochondries). La prise en charge des cargos se fait grâce à des récepteurs spécifiques, appelés récepteurs autophagiques. Ils sont ensuite séquestrés dans l'autophagosome puis dégradés par les enzymes lysosomales.

a) Les récepteurs autophagiques

Les récepteurs autophagiques sont centraux dans le processus d'autophagie sélective, faisant le lien entre le substrat et la machinerie autophagique située au niveau du phagophore. Ils sont séparés en deux catégories ; les récepteurs qui interagissent indirectement avec le cargo et ceux qui interagissent directement avec le cargo sous la dépendance de la molécule d'ubiquitine (Khaminets et al. 2015). D'autre part, la majorité des récepteurs se lient directement avec la

membrane autophagique via la protéine LC3/GABARAP, grâce au domaine LIR (pour LC3 Interacting Region) porté par le récepteur. Ce domaine est un consensus de séquence $\Theta XX\Gamma$, où Θ est un résidu aromatique W/F/Y (pour Tryptophane (ou W)/Phénylalanine (ou F)/Tyrosine (ou Y)), Γ un résidu hydrophobe L/I/V (pour Leucine (ou L)/Isoleucine (ou I)/Valine (ou V)), et X peut être, quant à lui, tout autre résidu (**Birgisdottir et al. 2013**).

(1) Reconnaissance des substrats dépendante de l'ubiquitine

Les récepteurs autophagiques capables de reconnaître leur substrat via la molécule d'ubiquitine sont nommés SLRs (pour Séquestosome-Like Receptors), nom qui provient du premier récepteur décrit SQSTM1/p62 ou séquestosome (**Pankiv et al. 2007**). Il existe de nombreux SLRs qui sont les suivants : NBR1 (pour Neighbor of BRCA1 gene 1), OPTN (pour Optineurin), TAX1BP1 (pour Tax1 Binding Protein 1), CALCOCO2/NDP52 (pour Nuclear Dot Protein 52 kDa) (**Figure 10**). Les SLRs ont tous un domaine de liaison à l'ubiquitine (domaine UBA pour Ubiquitine-Associated domain), ainsi qu'un ou plusieurs domaines LIR (**Figure 9**). De manière intéressante, il existe un chevauchement dans la spécificité de reconnaissance des cargos ubiquitinylés entre les SLRs. Lors de l'agrégation, les agrégats protéiques peuvent aussi bien être pris en charge par p62, NBR1 ou bien OPTN (**Pankiv et al. 2007 ; Kirkin et al. 2009 ; Shen et al. 2015**). De plus, certains récepteurs coopèrent afin de délivrer le substrat à l'autophagosome, c'est le cas de la mitophagie avec OPTN, NDP52 et TAX1BP1 (**Heo et al. 2015 ; Lazarou et al. 2015**).

Pour finir, il est important de noter qu'il existe de nombreuses chaînes d'ubiquitines qui diffèrent selon la lysine ubiquitinylée. Il est bien reconnu que les chaînes associées à la lysine48 (ou K48) sont associées à une dégradation vers le protéasome de leur substrat, alors que celles liées à la K63 sont associées à l'autophagie (**Yau et Rape. 2016 ; Tan et al. 2008**). L'ubiquitinylation est régulée par des protéines spécifiques ; les ubiquitines ligases (ou E3 ligases) lient l'ubiquitine à la cible, alors que les DUBs (pour Deubiquitinated enzymes) sont des protéases qui enlèvent l'ubiquitine de la cible. Il existe une multitude de ligases et de DUBs qui régulent l'ensemble des processus autophagiques (**Wang et Chen. 2016**). En effet, lors de la mitophagie, certaines DUBs régulent négativement ce processus, bloquant la dégradation des mitochondries. Pour cela, ce sont les USP15/30 et 35 (pour Ubiquitin-Specific Proteases) qui vont réduire l'ubiquitination des protéines mitochondriales, telles que MFN2, bloquant leur ciblage par les récepteurs autophagiques (**Bingol et al. 2014 ; Cornelissen et al. 2014 ; Wang et al. 2015**). Par ailleurs, c'est l'USP8, une E3-ubiquitine ligase, qui régule l'ubiquitination de Parkin, afin de l'activer et favoriser la mitophagie (**Durcan et al. 2014**).

Tout cela souligne la complexité de la régulation de l'autophagie sélective qui ne passe pas seulement par la reconnaissance du substrat ou l'activation des récepteurs adéquats, mais aussi par des modifications post-traductionnelles des cargos et des récepteurs eux-mêmes (Wild et al. 2011 ; Heo et al. 2015).

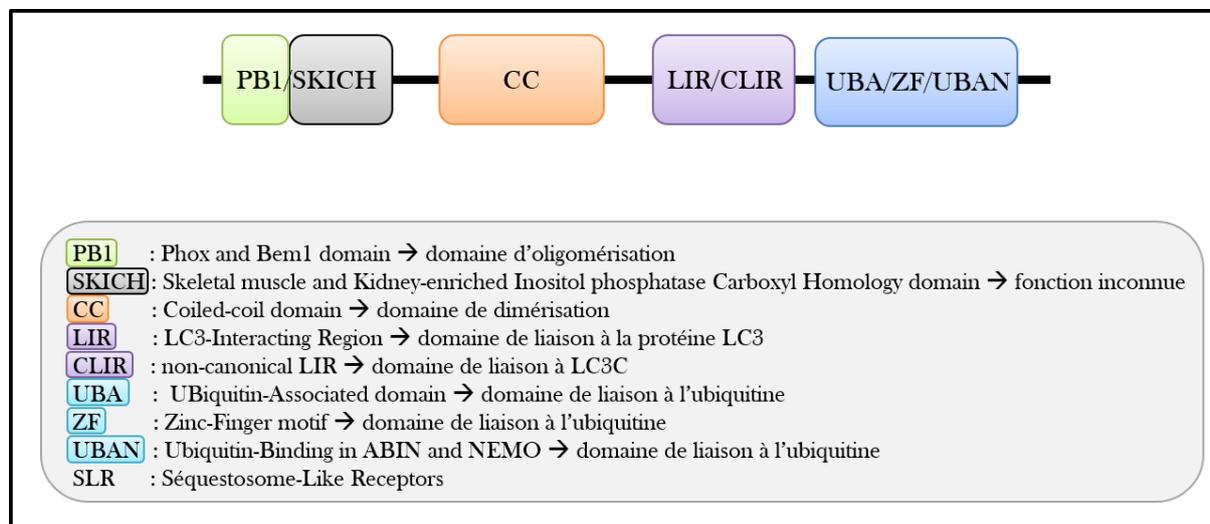


Figure 9 : Structure globale des SLRs

Les SLRs sont tous composés d'un ou plusieurs domaine(s) de liaison à l'ubiquitine (domaine bleu) leur permettant de cibler les cargos ubiquitylés, ainsi qu'un ou plusieurs domaine(s) de liaison à LC3 (domaine violet), afin d'interagir avec le phagophore via la protéine LC3-II. Ces récepteurs possèdent un ou plusieurs domaine(s) d'interactions protéines-protéines (domaine orange associé ou non avec un domaine vert). Pour finir, les récepteurs NDP52 et T6BP1 possèdent un domaine SKICH dont la fonction est inconnue.

(2) Reconnaissance des substrats indépendante de l'ubiquitine

Les études concernant l'autophagie sélective indépendante de l'ubiquitine sont en augmentation ces dernières années. A titre d'exemple, la ferritinophagie et l'autophagie du réticulum endoplasmique seront abordées dans les paragraphes suivants.

Chez les mammifères, la régulation de l'homéostasie du fer dans la cellule passe par un processus d'autophagie sélective, appelée ferritinophagie. En condition d'excès, le fer est séquestré par la ferritine en un gros complexe afin d'y être stocké. Lors de carence en fer, ce complexe est pris en charge spécifiquement par le récepteur NOCA4 (pour Nuclear receptor CoActivator 4) au niveau de la chaîne légère de la ferritine (Mancias et al. 2014), pour être conduit vers une dégradation lysosomale passant par l'autophagie (Mancias et al. 2014 ; Dowdle et al. 2014). Cependant, l'interaction entre NOCA4 et l'autophagosome reste mal connue aujourd'hui. En effet, il semblerait que ce récepteur interagisse avec LC3-II via un motif alternatif du domaine LIR dit « non-canonique ». En condition stationnaire, la quantité de NOCA4 est contrôlée via deux processus : l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome via la ligase HERC2 (Mancias et al. 2014; Dowdle et al. 2014).

La régulation de l'homéostasie du réticulum endoplasmique passe par l'autophagie sélective, processus appelé ici ER-phagie et dont FAM134B en est spécifiquement le récepteur (Khaminets et al. 2015). En condition de stress du RE, la kinase CAMK2B va phosphoryler le domaine homologue réticulon du récepteur afin qu'il s'oligomérise et s'active afin d'induire une fragmentation du RE (Jiang et al. 2020) et une dégradation autophagie-dépendante. Au niveau du RE, FAM134B co-localise avec deux marqueurs endoplasmiques, CLIMP-62 et SEC61B, alors qu'il interagit avec LC3-II au niveau de l'autophagosome via le motif LIR.

Bien qu'ils ne représentent pas la majorité des récepteurs autophagiques, NOCA4 et FAM134B sont des exemples représentatifs de récepteurs capables de reconnaître leur substrat de façon indépendante de l'ubiquitine et très spécifiques de l'élément à dégrader (Figure 10).

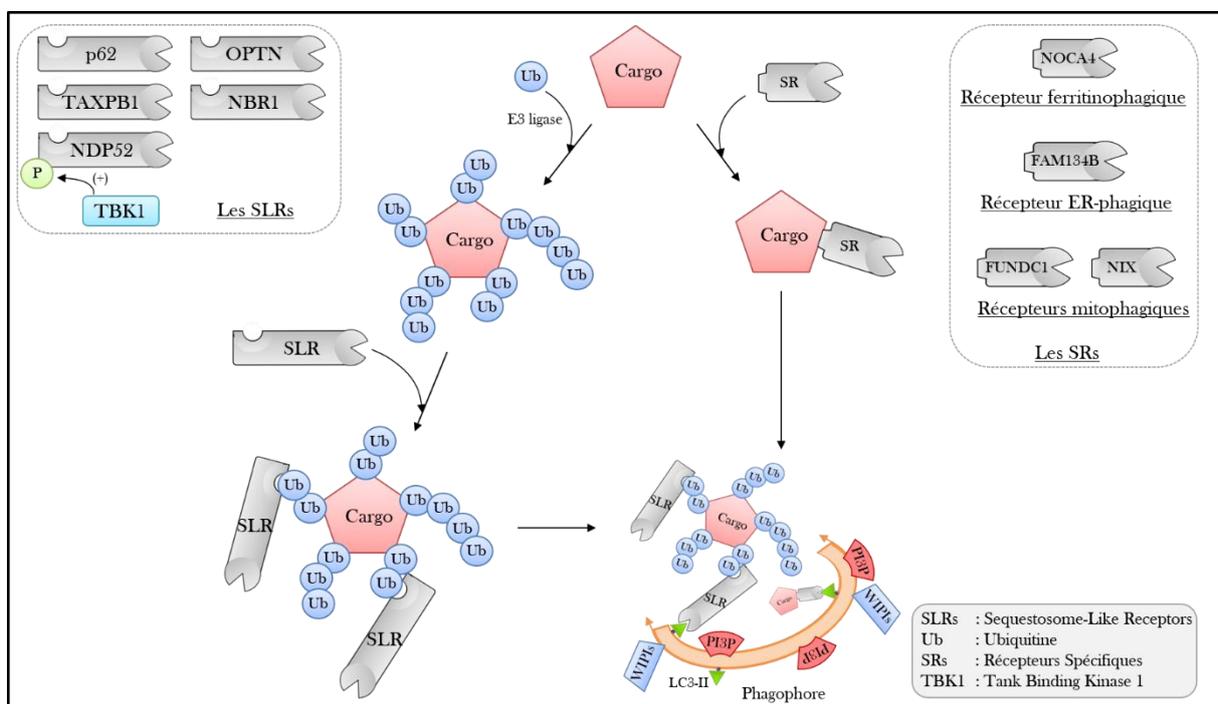


Figure 10 : Reconnaissance d'un substrat par les récepteurs autophagiques

Les récepteurs autophagiques peuvent cibler directement (c'est le cas des SRs) ou indirectement (c'est le cas des SLRs) les substrats à dégrader. Le ciblage indirect des cargos peut se faire par l'intermédiaire d'ubiquitine, qui sera reconnue par les SLRs via leur(s) domaine(s) de liaison à l'ubiquitine. Il s'avère que le récepteur NDP52 est préalablement activé par la kinase TBK1. Une fois l'interaction entre le cargo et le récepteur faite, ce dernier va recruter la machinerie autophagique en se liant au LC3-II enchaîné dans la membrane du phagophore.

b) Exemple d'autophagie sélective : la mitophagie

Au cours de ma thèse, j'ai tout particulièrement analysé la mitophagie dans les cellules dendritiques humaines, comme outil afin d'analyser la fonctionnalité de l'autophagie. De ce fait, j'ai choisi de détailler ce processus dans ce paragraphe.

La mitophagie est une forme spécifique d'autophagie sélective qui correspond à une dégradation sélective des mitochondries. C'est l'un des processus d'autophagie sélective le plus

étudié à ce jour. Il existe différentes voies induisant la mitophagie, selon le stimulus utilisé : la mitophagie induite en condition d'hypoxie, celle qui se déroule lors de la différenciation des cellules érythroïdes, et enfin, celle induite par des dommages à la mitochondrie (non-hypoxique dépendant).

(1) Rôle de la mitophagie pendant la différenciation des érythrocytes

Lors du développement des globules rouges, l'étape terminale induisant la différenciation des réticulocytes en érythrocytes implique un renouvellement complet des organelles de la cellule par autophagie, dont les mitochondries. L'équipe de Sandoval a montré en 2008 que la protéine mitochondriale NIX, un membre de la famille des Bcl-2 (aussi appelé Bnip3L), joue un rôle de senseur de signal de maturation des réticulocytes. La réception de ce signal entraîne une activation du processus de mitophagie dirigé par NIX (Sandoval et al. 2008).

(2) Rôle de la mitophagie induite en condition d'hypoxie

Lorsque les cellules de mammifères sont en condition d'hypoxie, les protéines FUNDC1 (pour FUN14 Domain Containing 1) et NIX ont été décrites comme étant impliquées dans la dégradation des mitochondries endommagées, et ce sous la dépendance de l'autophagie (Liu et al. 2012 ; Novak et al. 2010). Ces deux protéines sont localisées dans la membrane externe de la mitochondrie et jouent un rôle de récepteur autophagique, interagissant d'une part avec la membrane de la mitochondrie et d'autre part avec LC3 via leur motif LIR respectif. Pour cela, FUNDC1 est déphosphorylé au niveau de la sérine 13 (ou ser13) (par PGAM5) et phosphorylé au niveau de la ser17 (par ULK1) (Chen et al. 2014), alors que la protéine NIX, quant à elle, est phosphorylé au niveau de la ser81, permettant leurs interactions avec LC3 (Yuan et al. 2017). Grâce à cette interaction, le phagophore peut être recruté et prendre en charge la mitochondrie pour l'éliminer (Figure 11). Ces récepteurs agissent de façon Parkin-indépendante ; Parkin étant une protéine impliquée dans d'autres voies de mitophagie induites que nous verrons dans les paragraphes suivants.

(3) Rôle de la mitophagie induite par des dommages hypoxiques-indépendants

La mitophagie induite par des dommages à la mitochondrie (dommages hypoxique-indépendant) peut être régulée de façon dépendante ou indépendante de l'ubiquitine.

La régulation ubiquitine-dépendante de la mitophagie passe par la voie PINK1/Parkin (Heo et al. 2015 ; Lazarou et al. 2015) ; PINK1 (pour PTEN-induced putative kinase 1) étant une sérine/thréonine kinase et Parkin étant une E3 ubiquitine-ligase (Narendra et al. 2008 ; Matsuda et al. 2010). En condition stationnaire, PINK1 est, de manière constitutive, ciblée à la

membrane interne de la mitochondrie, grâce à la séquence MPP (pour Matrix Processing Peptidases), afin d'y être clivée par la protéase PARL (pour Presenilin-Associated Rhomboïd Like). Par la suite, le PINK clivé transloque vers le cytosol pour y être dégradé via le protéasome (Matsuda et al. 2010). Différents types de dommages à la mitochondrie entraînent une dépolarisation de la membrane de celle-ci, diminuant le clivage de PINK1 qui s'accumule alors au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. PINK1 accumulée s'active par autophosphorylation, afin de recruter et activer Parkin. Une fois actif Parkin va poly-ubiquitinyler ses différents substrats pour qu'ils soient dégradés, entraînant l'élimination de la mitochondrie endommagée (Tanaka et al. 2010 ; Chan et al. 2011 ; Nguyen et al. 2016). En effet, la poly-ubiquitinylation des substrats au niveau de la lysine63 favorise le recrutement de différents récepteurs autophagiques comme p62 ou NDP52 (voir paragraphe précédent concernant les récepteurs autophagiques) via leur domaine UBD. L'interaction de ces récepteurs avec la machinerie autophagique passe par le motif LIR qui lie la protéine LC3 (Lazarou et al. 2015). Parmi tous les récepteurs autophagiques impliqués dans cette voie, OPTN apparait comme étant l'adaptateur le plus important. En effet, il peut être préférentiellement phosphorylé par le régulateur TBK1 (pour Tank Binding Kinase 1), augmentant sa capacité à lier l'ubiquitine et donc à cibler les mitochondries (Moore et Holzbaur. 2016). Parmi les substrats de Parkin, la dégradation de MFN1/2 entraîne la fission de la mitochondrie et sa dégradation par autophagie (Tanaka et al. 2010) (Figure 11).

De façon intéressante, il a été montré que PINK1 peut réguler la dégradation des mitochondries indépendamment de Parkin. En effet, PINK1 est capable de recruter directement les récepteurs OPTN et NDP52 à la membrane de la mitochondrie. Ces derniers vont alors se fixer à différents substrats ubiquitinylés et recruter la machinerie autophagique pour éliminer la mitochondrie ciblée (Lazarou et al. 2015).

La régulation ubiquitine-indépendante de la mitophagie induite par des dommages aux mitochondries, implique différents acteurs comme la protéine CHDH ou le senseur TBC1D15. La protéine CHDH (ou choline déshydrogénase) se localise dans les membranes interne et externe de la mitochondrie en condition stationnaire. Les différents stress entraînant une dépolarisation de la membrane des mitochondries, induisent une accumulation de CHDH au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, qui sera alors reconnue par le récepteur p62. Park et coll. ont démontré que la formation du complexe CHDH-p62-LC3 était suffisante pour induire la dégradation des mitochondries via la machinerie autophagique (Park et al. 2014).

La protéine TBC1D15 (pour TBC1 domain family member 15) est une Rab-GAP mitochondriale (pour Rab-GTPase activating protein), qui forme un complexe avec la protéine

TBC1D17, agissant alors comme un senseur de dommages mitochondriaux. En effet, ce complexe migre et se localise au niveau de la membrane externe de la mitochondrie par interaction avec la protéine FIS1 (pour fission protein 1). Le complexe TBC1D15/17 étant stabilisé à la membrane, il peut alors interagir avec la protéine LC3 et permettre à la mitochondrie d'être éliminée par mitophagie (Yamano et al. 2014).

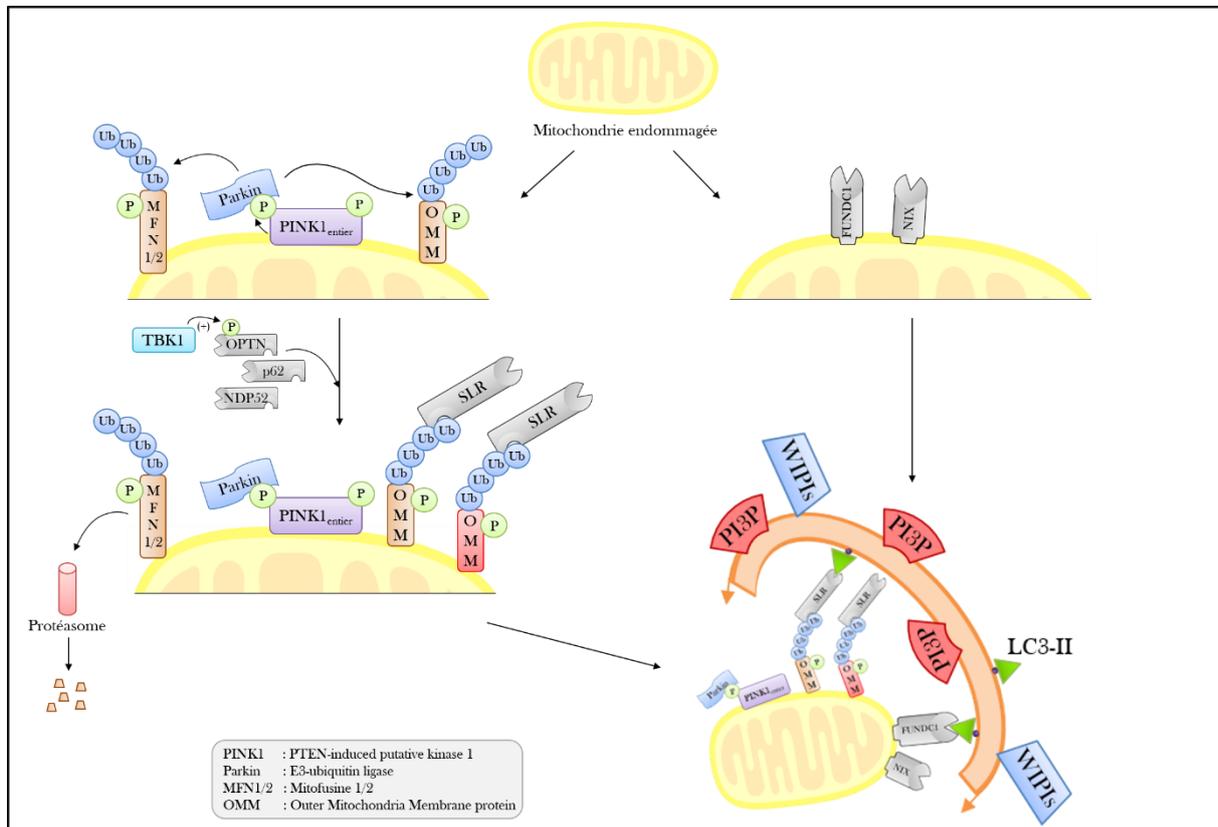


Figure 11 : Autophagie sélective des mitochondries : la mitophagie

La mitophagie est un processus de dégradation sélectif des mitochondries endommagées dans une cellule. Ce processus est activé selon deux voies majeures : les voies dépendantes et indépendantes de PINK-1/Parkin. C'est la dépolarisation des membranes des mitochondries qui délocalise la kinase PINK-1 à la surface des mitochondries. PINK-1 s'autophosphoryle, afin d'activer la ligase Parkin par phosphorylation. Les protéines mitochondriales (OMM, ou MFN-1/2) sont ensuite ubiquitinylées par Parkin, puis ciblées par certains SLRs (OPTN, NDP52, ou p62), afin que les mitochondries soient dégradées par autophagie. Indépendamment de la voie PINK-1/Parkin, les mitochondries endommagées peuvent être directement ciblées par des récepteurs autophagiques spécifiques (tels que NIX ou FUNDC1), capables de recruter la machinerie autophagique.

5. Modulation du processus autophagique

a) Notion de flux autophagique

Au regard de ces fonctions, l'autophagie est impliquée dans la dégradation d'éléments cytosoliques, comme des agrégats protéiques ou encore des organites intracellulaires. Ce processus est hautement dynamique et flexible, mais il se déroule aussi en continu dans la cellule, pour maintenir l'homéostasie cellulaire. L'étude de ce dynamisme est appelée analyse du flux

autophagique et fait référence à l'évaluation de l'ensemble du processus autophagique, c'est-à-dire de l'activité catabolique autophagique dans une cellule (Klionsky et al. 2016). Actuellement, il n'existe pas de « norme de référence » pour mesurer le flux autophagique. Communément, c'est la détection de la macroautophagie, c'est-à-dire la détection ou l'estimation de la quantité d'autophagosomes qui est utilisée pour analyser l'autophagie dans une cellule. Or le flux autophagique fait référence au dynamisme du processus autophagique, qui a donc un début (la formation du phagophore) et une fin (la dégradation du contenu de l'autophagosome et le recyclage de composants intracellulaires). On peut donc envisager de suivre ce processus du début à la fin pour en estimer la dynamique : durée, vitesse et intensité du processus.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à mesurer ce dynamisme, en utilisant de manière originale le suivi en cinétique de la lipidation de la protéine MAP1LC3, ou LC3. Comme nous l'avons vu précédemment, lors de l'élongation du phagophore le LC3-I est lipidé pour former le LC3-II, qui est ensuite enchâssé dans la membrane des autophagosomes. Ainsi, il est communément utilisé de quantifier le LC3-II pour estimer la quantité d'autophagosomes (Zhang et al. 2016). Pour aller plus loin, nous nous sommes basés sur les travaux de Loos et Haspel qui ont développé différentes manières de suivre le processus autophagique selon une cinétique de temps, qui permet alors d'évaluer sa dynamique (Haspel et al. 2011 ; Loos et al. 2014).

A l'état basal, la quantité d'autophagosomes dans la cellule est approximativement constante (Loos et al. 2014). Une perturbation du flux autophagique, médiée par une carence en nutriment ou par l'utilisation d'inhibiteurs autophagiques, peut modifier en retour la quantité d'autophagosomes détectés dans une cellule. Par exemple, l'inhibition de l'étape de maturation de l'autophagie bloque la dégradation des autophagosomes et entraîne leur accumulation dans la cellule (Haspel et al. 2011 ; Loos et al. 2014 ; Toit et al. 2018). L'analyse de cette accumulation peut permettre d'évaluer la nature du flux autophagique : la vitesse d'accumulation de ces autophagosomes est un indicateur de la vitesse initiale du flux autophagique, de même que la quantité d'autophagosomes accumulés est un indicateur de l'intensité du flux.

b) Agents pharmacologiques utilisés

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé différents agents pharmacologiques afin de moduler le flux autophagique dans mes cellules d'intérêt. Dans ce paragraphe, je vais présenter les différents inhibiteurs autophagiques, ainsi que le seul activateur avec lesquels j'ai traité mes cellules.

La rapamycine a été utilisée pour activer le processus autophagique ; son mode d'action étant d'inhiber le complexe mTOR. Pour ce faire, cette drogue forme un complexe avec la protéine FKBP12 qui inhibe l'activité kinase de mTOR, en bloquant le recrutement de ces substrats (Julien et Roux. 2010).

La spautin-1 (pour specific and potent autophagy inhibitor-1) a été utilisé comme inhibiteur autophagique ; son mode d'action étant de bloquer les deux peptidases USP10 et USP13 qui sont responsables de la dé-ubiquitinylation de Beclin1, nécessaire à son activation. De ce fait, Beclin-1 n'étant pas dé-ubiquitinylé, il sera dégradé par le protéasome (**Liu et al. 2011**). Par conséquent, la dégradation de Beclin-1 bloque l'étape d'initiation de l'autophagie.

La chloroquine et la bafilomycine A1 ont été utilisés pour bloquer le flux autophagique. En effet, ces drogues sont capables d'inhiber l'étape de maturation de l'autophagie. La bafilomycine A1 inhibe le fonctionnement de la V-ATPase présente à la membrane des lysosomes, en bloquant les transferts de proton et l'acidification des lysosomes, les rendant alors non-fonctionnels (**Yoshimori et al. 1991 ; Yamamoto et al. 1998**). La chloroquine, quant à elle, bloque la fusion entre le lysosome et l'autophagosome, en interférant probablement dans le recrutement de SNAP29 au niveau du complexe « trans-SNARE » (**Mauthe et al. 2018**).

II. Cellules dendritiques humaines et autophagie

1. Découvertes et caractéristiques cellulaires

C'est en 1868 que Paul Langerhans observe pour la première fois des cellules ayant « une forme d'arbre » à partir de sections de peau humaine, que l'on nommera plus tard cellules de langerhans, une population spécifique de cellules dendritiques. Mais ce sont les travaux réalisés en 1973 par les chercheurs Ralph Steinman et Zanvil Cohn, sur le système phagocytaire de souris, qui ont permis de mettre en évidence une nouvelle population cellulaire, capable d'induire une réponse anticorps qu'ils nommèrent « cellules dendritiques » (ou DCs pour dendritic cells) (Steinman et Cohn. 1973). Les cellules dendritiques sont des cellules immunitaires issues de la lignée des cellules myéloïdes qui dérive des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ (pour Cluster de Différenciation 34), présentes dans la moelle osseuse. Elles se localisent aussi bien dans les tissus lymphoïdes, comme la rate ou les ganglions lymphatiques (Steinman et Cohn. 1973), que dans les tissus périphériques, comme les intestins ou la peau (Hart et Favre. 1981), mais aussi dans le sang (Van Voorhis et al. 1982). Les DCs sont définies grâce à leurs caractéristiques phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles. En effet, elles sont caractérisées par une concentration forte en molécules du CMH (pour Complexe Majeur d'Histocompatibilité, ou HLA pour Human Leucocyte Antigen), en particulier les molécules du CMH de classe II (ou CMH-II) au niveau de leur membrane plasmique. De plus, elles ont un faible niveau d'expression des marqueurs de surface suivant ; le CD3 (marqueur des lymphocytes T), les CD19 et CD20 (marqueurs des lymphocytes B) et le CD56 (marqueurs des Natural Killer) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Elles se distinguent morphologiquement des autres cellules immunitaires via leurs prolongements cytoplasmiques spécifiques, « en forme de bras », appelés dendrites. On distingue les DCs selon deux états, les DCs immatures (ou iDCs) et les DCs matures (ou mDCs) ; ainsi elles assurent un rôle clé dans la réponse immunitaire en participant à la réponse immunitaire innée, et à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative spécifique. Les DCs possèdent trois fonctions principales qui sont : la capacité à détecter et capturer efficacement des antigènes présents dans l'environnement, la capacité à sécréter de cytokines, et enfin la capacité à présenter des antigènes aux lymphocytes T. Les cytokines sont des molécules chimiques (ou médiateurs chimiques), qui peuvent être pro- ou anti-inflammatoires, ayant diverses fonctions, dont la capacité de recruter et d'activer d'autres cellules immunitaires. La fonction de présentation antigénique est la fonction majeure des DCs, de ce fait, elles appartiennent à la famille des cellules présentatrices d'antigènes (ou CPA et APC en anglais), composée des macrophages, des monocytes et des lymphocytes B. Pour finir, il est important de noter que les cellules dendritiques ont la capacité unique de pouvoir maintenir la

tolérance immunitaire face aux antigènes du « soi » et de participer à l'immunité protectrice contre les antigènes du « non-soi » et du « soi-modifié » (Medzhitov et Janeway. 2002; Merad et al. 2013).

2. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée

L'immunité innée est la seconde barrière de défense de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes, après les barrières physiques, telles que la peau, la muqueuse intestinale, et les autres tissus de revêtements. Les effecteurs de la réponse immunitaire innée prennent place, notamment, afin de contrôler l'invasion de pathogènes, et de les éliminer efficacement. Parmi ces effecteurs on trouve les macrophages, les cellules NKs, les neutrophiles, ou encore les cellules dendritiques. Les DCs font partie des cellules clé de la réponse immunitaire innée, jouant un rôle de sentinelle au sein des tissus, dans leur état immature (appelée alors iDCs). En effet, les iDCs sont spécialisées dans la détection de signaux de danger, grâce à l'expression de senseurs membranaires et cytosoliques. Grâce à cette spécificité, elles sont capables d'initier la réponse immunitaire contre l'élément de danger détecté. À la suite de cette détection, la iDC est alors stimulée/activée et rentre alors dans un processus de maturation, aboutissant à un changement d'état de la DC qui devient une DC mature (appelée alors mDC). La DC mature acquiert alors de nouvelles compétences, permettant notamment d'activer la réponse immunitaire adaptative.

a) Détection des signaux de dangers

On distingue deux catégories de signaux de dangers : les PAMPs (pour Pathogens Associated Molecular Pattern) et les DAMPs (pour Damaged Associated Molecular Pattern). On retrouve les PAMPs chez différents types de pathogènes comme les virus, les bactéries, ou les parasites ; alors que les DAMPs peuvent être délivrées par des cellules endommagées de l'organisme, comme les cellules cancéreuses, ou peuvent provenir d'agents chimiques exogènes (Medzhitov et Janeway. 2002). De nombreux motifs pathogéniques ont été décrits à ce jour : comme les protéines, telle que la flagelline exprimée par des bactéries flagellées ; mais aussi les glycanes, dont le plus connu est le lipopolysaccharide (ou LPS) porté par les bactéries Gram⁺ ; le mannose porté par certaines bactéries et levures ; ou encore les acides nucléiques (AND ou ARN).

Ces signaux de dangers sont, notamment, reconnus par des récepteurs spécifiques, appelés récepteurs de l'immunité innée ou PRRs (Pattern Recognition Receptors). Il existe 5 catégories de PRRs : les récepteurs Toll (ou TLRs pour Toll-Like Receptors), les récepteurs lectine de type C (ou CLR pour C-Lectin Receptors), les récepteurs Nod (ou NLRs pour Nod-Like Receptors), les récepteurs RIG (ou RLR (RIG-1-Like Receptor) et les récepteurs à ADN

(Kawai et Akira. 2009 ; Kumar et al. 2011 ; Hémond et al. 2013 ; Lundberg et al. 2014 ; Geginat et al. 2015 ; Chanut et Petrilli. 2019) (Figure 12).

(1) Les Toll-like récepteurs (TLRs)

Chez l'homme, 10 récepteurs Toll ont été identifiés à ce jour (TLR-1 à 10). Ce sont des récepteurs transmembranaires que l'on trouve aussi bien au niveau de la membrane plasmique, comme les TLR-1/2/4/5/6 et 10, que dans les endosomes, comme le TLR-3/4/7/8 et 9 (Gay et Gangloff 2007). Ils sont composés de 3 domaines ; un domaine extracellulaire riche en Leucine (ou LRR pour Leucine Rich Repeat) impliqué dans la liaison ligand-récepteur, un domaine transmembranaire riche en Cystéine, et enfin un domaine intracytoplasmique TIR (pour Toll IL-1 Receptor, par homologie avec le récepteur de l'interleukine-1) qui permet la transduction du signal via l'interaction avec des protéines adaptatrices (Gay et Gangloff. 2007 ; Kawai et Akira. 2010). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules immunitaires, comme les DCs, mais aussi au niveau des cellules épithéliales de l'intestin ou encore les cellules endothéliales.

La fonction principale des TLRs est de détecter des PAMPs à la surface de la cellule ou au niveau des endosomes. La nature des ligands détectés par les TLRs est très variable (Tableau 1). Une fois que le ligand a fixé son récepteur, différents adaptateurs sont recrutés au niveau du domaine TIR des TLRs afin de transduire un signal d'activation dans la cellule. Ainsi, deux voies de transduction peuvent être activées, la voie dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (pour Myeloid Differentiation primary response protein 88), ou la voie indépendante de MyD88, passant alors par la molécule adaptatrice TRIF (pour TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , aussi appelée TICAM-1), TRAM (pour TRIF Related Adapter Molecule), ou TIRAP (pour TIR domain containing Adaptor Protein, aussi appelée MAL) (Dzopalic et al. 2012). Ces différentes voies de transduction entraînent des cascades de phosphorylations aboutissant, particulièrement, à l'activation de trois voies de signalisation, la voie NF- κ B (pour Nuclear Factor- κ B) (Figure 15), la voie MAPK (pour Mitogen-Activated Protein Kinases) (Figure 16) et la voie interféron qui passe par deux facteurs de transcriptions IRF-3 et IRF-7 (pour Interferon Regulated Factors) (Figure 14) (Kawai et al. 2004 ; Kawai et Akira. 2006 ; 2009). (Figure 12) Il est important de noter que seuls les TLRs localisés au niveau intracellulaire (TLR-3/4/7/8 et 9) sont capables d'activer la voie interféron. L'activation des voies NF- κ B et MAPK permet d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (ces molécules seront définies clairement au paragraphe 2.c.(4.1)), mais aussi l'expression de molécules de co-stimulation (Kawai et al. 2004 ; Kawai et Akira. 2006 ; 2009). Les cytokines vont permettre d'amplifier la réponse immunitaire, en permettant notamment le recrutement d'autres cellules immunitaires au site enflammé, ou encore d'orienter la réponse immunitaire adaptative lorsque l'immunité

innée n'est pas suffisante pour éliminer « le danger » (voir la partie II.4. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative). Les molécules de costimulation sont, quant à elles, impliquées dans la présentation antigénique afin d'activer une réponse immunitaire adaptative spécifique. Par ailleurs, la voie interféron, passant par IRF-3 et IRF-7, entraîne la production d'interféron de type-I (IFN- α et β) (Kawai et al. 2004 ; Kawai et Akira. 2006 ; 2009). Ces molécules interférons participent à la réponse antivirale.

Récepteurs	Ligands	Adaptateurs
TLR-1/2	Lipopeptides de bactéries	TIRAP, MyD88
TLR-2/6	Glycoprotéines de bactéries, glycans de bactéries, lipopeptides	TIRAP, MyD88
TLR-3	ARN viral double brin	TRIF
TLR-4	Glycoprotéines, glycans, protéines virales (comme RSV)	TIRAP, TRIF, TRAM, MyD88
TLR-5	Flagelline de bactéries	MyD88
TLR-6	Lipopeptides de mycoplasmes	MyD88
TLR-7/8	ARN viral simple brin	MyD88
TLR-9	ADN non-méthylé riche en CpG de bactéries	MyD88
TLR-10	Inconnus	

Tableau 1 : Agonistes des TLRs humains

(2) Les récepteurs lectines de type C (CLRs)

Chez l'homme la famille des CLRs représente la famille la plus vaste de PRRs. Ce sont des récepteurs transmembranaires localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules, pouvant interagir avec les TLRs et moduler leur activation (Lundberg et al. 2014). Ils sont exprimés par les cellules myéloïdes comme les cellules dendritiques et les macrophages, mais aussi les lymphocytes, les granulocytes ou encore les cellules épithéliales. Ces récepteurs vont fixer des ligands riches en protéines glycosylées (carbohydrate), présents chez certaines bactéries mais aussi certains champignons, grâce à des domaines CDRs (pour Calcium-Dependent carbohydrate Recognition domain) et CDR-like (qui fixent les carbohydrates de façon indépendante du calcium) (Figdor et al. 2002 ; Hoving et al. 2014). Les différents récepteurs CLRs se distinguent via leur nombre de CDR et CDR-like, mais aussi via leur capacité immunorégulatrice ; certains CLRs possèdent un domaine ITAM (Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif) conférant des capacités immunoactivatrices aux cellules, d'autres possèdent un domaine ITIM (Immunoreceptor Tyrosinebased Inhibition Motif) conférant des capacités immunosuppressives, et enfin certains CLRs ne possèdent aucun des deux motifs (Hoving et al. 2014) (Figure 12).

La fixation du ligand de CLR à son récepteur entraîne une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation ou l'inhibition du récepteur. Trois modes de signalisation sont connues aujourd'hui ; la fixation directe au récepteur possédant un motif ITAM, la fixation directe au récepteur possédant un motif ITIM (Bates et al. 1999), et enfin la fixation au récepteur possédant un motif ITAM en association avec un adaptateur, comme Fc-R γ (Dinther et al. 2017). Lorsque les récepteurs possèdent un motif ITAM, ils vont pouvoir s'activer et entraîner le recrutement et la phosphorylation de la protéine kinase Syk, associée au complexe protéique composé des protéines CARD9, BCL10 et Malt1. Par la suite, différents partenaires seront activés, comme la protéine PKC δ ou le complexe ASC, qui entraîneront l'activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPK, aboutissant finalement à l'activation et la maturation de la DC, la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation de l'inflammasome, ou encore l'induction de phagocytose (Hoving et al. 2014 ; Dinther et al. 2017). Par ailleurs, lorsque les récepteurs possèdent un motif ITIM, cela entraîne l'inhibition du récepteur et le recrutement des adaptateurs SHP-1 ou SHP-2 (pour Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-1/2) qui favorisent l'inhibition des autres récepteurs innés, et bloquant l'activation de la DC (Hoving et al. 2014 ; Dinther et al. 2017).

(3) Les récepteurs Nod (NLRs)

Les NLRs représentent une vaste famille de récepteurs d'environ 23 membres chez l'homme. Ce sont des récepteurs cytosoliques, impliqués dans la détection de certains PAMPs, ainsi que d'autres molécules endogènes cytosoliques, renforçant la surveillance immunitaire. Ces récepteurs peuvent se localiser au niveau de la membrane plasmique des cellules, afin d'interagir avec les TLRs et moduler leur activation (Watanabe et al. 2004). Ils sont exprimés par les leucocytes, tels que les cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes, mais aussi par les cellules épithéliales. Les NLRs sont composés de trois domaines principaux : un domaine LRR au niveau C-terminal impliqué dans la détection du signal de danger, un domaine d'interaction protéine-protéine en au niveau N-terminal comprenant le motif de mort DED (pour Dead Effector Domain), ou un motif PYD (pour Pyrin Domain), un motif CARD (pour Caspase Activation and Recruitment Domain), ou encore un motif BIR (pour Baculovirus Inhibitor Repeats), et enfin un domaine intermédiaire comprenant le domaine NOD (pour Nucleotide-binding and Oligomerization Domain) qui permet au récepteur de s'oligomériser afin de s'activer et de transduire le signal (Franchi et al. 2009 ; Kumar et al. 2011 ; Corridoni et Simmons. 2019) (Figure 12). Il est intéressant de noter que les domaines CARD, DED et PYD sont impliqués dans l'induction de mort cellulaire par apoptose ou inflammation, associée à une activation de l'inflammasome via l'activation de caspases. Par ailleurs, le domaine BIR quant à lui est lié à la

régulation de l'apoptose via les protéines IAPs (pour Inhibitor of Apoptosis Proteins). Il existe 5 sous-familles de NLRs : NLRA comprenant CIITA, NLRB comprenant NAIPs, NLRC comprenant NOD-1, NOD-2, NLRC3/4 et 5, NLRP comprenant NLRP 1 à 14 et NLRX comprenant NLRX1 (Corridoni et Simmons. 2019).

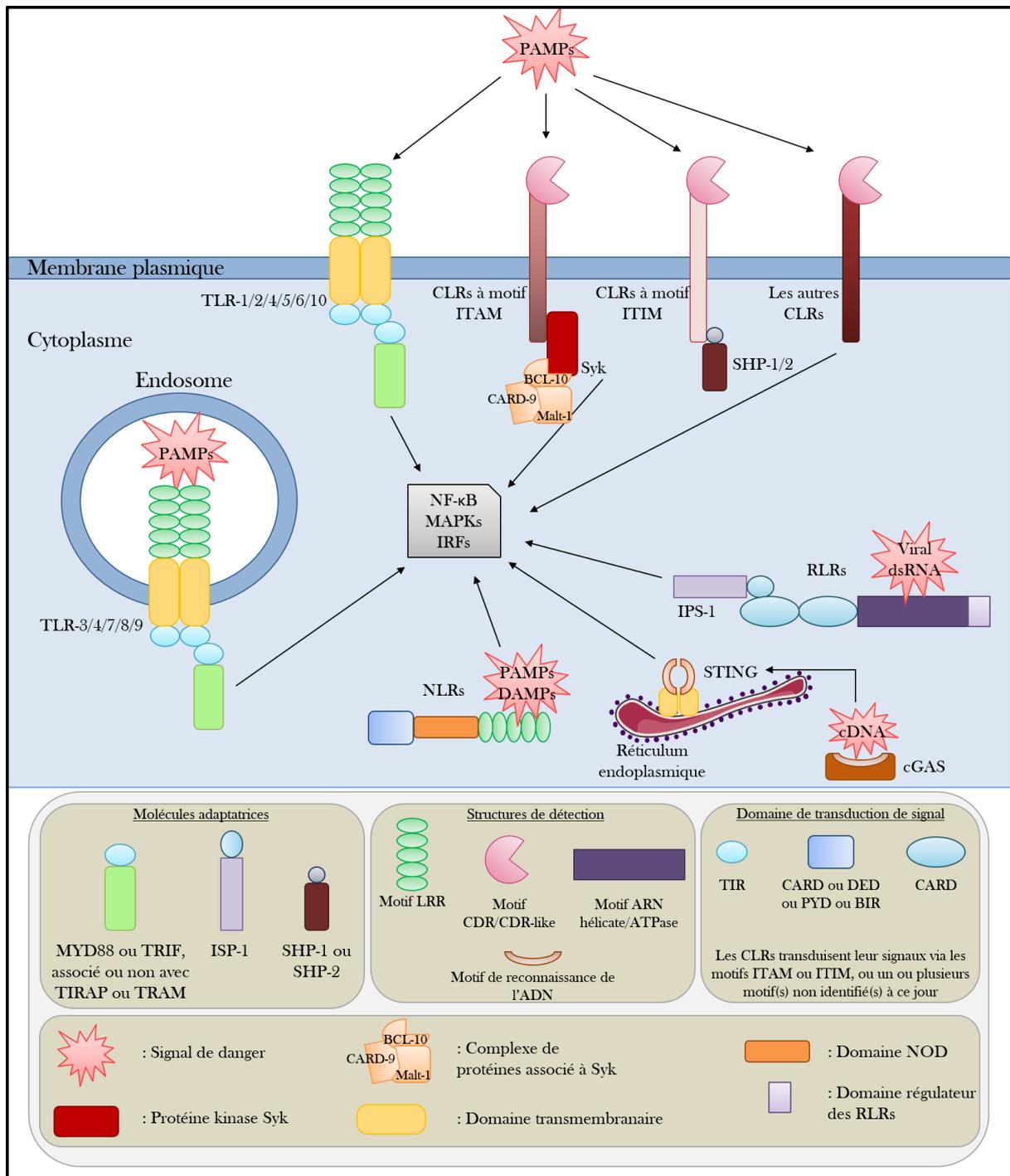


Figure 12 : Systèmes de détection des signaux de dangers

Il existe deux catégories de signaux de dangers, les PAMPs et les DAMPs, qui sont reconnus, notamment, par cinq types de récepteurs de l'immunité innée les TLRs, les NLRs, les CLRs, les RLRs et le système cGAS/STING. Ces récepteurs possèdent tous un domaine capable de détecter ces signaux de dangers, ainsi qu'un domaine de transduction du signal aboutissant généralement à l'activation de trois voies de signalisation, les voies NF-κB, IFNs et MAPKs. Certains de ces récepteurs transduisent leurs signaux par

l'intermédiaires d'adaptateurs (pour certains TLRs, CLR et les RLRs) ou de protéines kinases (telle que la kinase Syk pour certains CLR).

La fixation du ligand au récepteur de type NLR entraîne l'activation de voies de signalisation, dont les voies MAPK et NF- κ B, induisant la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation du complexe de l'inflammasome avec la sécrétion d'IL-18 et IL-1 β , mais aussi l'activation et la maturation des DCs (Chen et al. 2009 ; Kumar et al. 2011 ; Corridoni et Simmons. 2019).

(4) Les récepteurs RIG (RLRs)

Les RLRs sont des récepteurs cytoplasmiques ubiquitaires, composés de trois membres : les récepteurs RIG-I et MDA5, ainsi que le régulateur LGP2 (Loo et Gale. 2011). Ils sont spécialisés dans la détection d'antigènes viraux, en particulier d'ARNviral ; RIG-I reconnaît les ARNs à brin court, alors que MDA5 reconnaît les ARNs à brin long (Loo et Gale. 2011 ; Szabo et Rajnavolgyi. 2013). Ces récepteurs sont composés de trois domaines : un domaine CARD au niveau N-terminal, un domaine de régulation au niveau C-terminal et un domaine DEAD intermédiaire où l'on trouve un motif ARN hélicase/ATPase. Le domaine intermédiaire permet la reconnaissance des éléments viraux, alors que le domaine CARD permet la transduction du signal via l'adaptateur IPS-1 (pour IFN- β -Promoter Stimulator 1), après la détection de l'ARN virale reconnu comme signal de danger (Loo et Gale. 2011 ; Kawai et al. 2005) (Figure 12). IPS-1 est un adaptateur localisé au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, composé d'un domaine CARD-like situé en N-terminal lui permettant d'interagir avec RIG-I et MDA5, ainsi qu'un domaine effecteur situé en C-terminal (Kawai et al. 2005).

La fixation du ligand à son récepteur RLR entraîne l'activation des voies de signalisation NF- κ B et interféron (via les facteurs de transcription IRF3 et IRF7), grâce à une cascade de phosphorylation, aboutissant à l'activation et la maturation de la DC, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , l'activation de l'inflammasome, mais aussi la production d'interféron de type I (IFN- α et β) associé à une réponse immunitaire antivirale (Szabo et Rajnavolgyi. 2013 ; Fekete et al. 2018 ; Kawai et al. 2005).

(5) Les récepteurs à ADN

Il existe une grande diversité de récepteurs à ADN, parmi lesquels le système de détection cGAS/STING est le plus décrit à ce jour (Dempsey et Bowie. 2015). C'est un système ubiquitaire, composé de l'enzyme cGAS (pour cyclic GMP-AMP synthase) et du récepteur STING (pour stimulator of interferon genes) (Sun et al. 2013 ; Chanut et Petrilli. 2019). Ce système reconnaît divers ADN cytosolique double brin de type viraux, bactériens mais aussi cellulaires, considérés alors comme des DAMPs. Le récepteur STING est composé d'un domaine transmembranaire

situé en N-terminal, qui lui permet de s'ancrer dans la membrane du réticulum endoplasmique, ainsi qu'un domaine CBD (pour c-di-GMP-binding domain) qui lie le c-di-GMP. C'est tout d'abord cGAS qui détecte l'ADN cytosolique, entraînant son activation et la production du messenger cGAMP (pour cyclic GMP-AMP). Ce dernier sera reconnu par STING au niveau du domaine CBD, entraînant sa dimérisation et son activation (Sun et al. 2013 ; Chanut et Petrilli. 2019).

La fixation du ligand sur son récepteur active les voies de signalisation NF- κ B et interféron (via les facteurs de transcription IRF3), grâce à une cascade de phosphorylation aboutissant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-6 et la production d'interféron de type I (IFN- α et β) (Chanut et Petrilli. 2019).

(6) Récepteurs de l'immunité innée et autophagie

Au regard de ces fonctions, l'autophagie, en tant que processus catabolique, fait partie intégrante des mécanismes de défense contre les microorganismes pathogènes. En effet, elle participe à leur détection et leur élimination, grâce aux récepteurs autophagiques présent dans la cellule (voir partie I.4. L'Autophagie sélective). Il existe plusieurs espèces de pathogènes qui sont sélectivement dégradés par xénophagie, comme des virus (par exemple le virus VIH, (Blanchet et al. 2010)), des bactéries (par exemple le *Porphyromonas gingivalis*, (El-Awady et al. 2015)) ou encore *Escherichia Coli* adhérentes et invasives (ou AIECs) (Lapaquette et al. 2010 ; 2012)), ou encore des parasites (par exemple le *Toxoplasma Gondii*, (Liu et al. 2015)). Il a été récemment démontré que les récepteurs de l'immunité innée peuvent activer l'autophagie afin d'induire une réponse immunitaire efficace contre des pathogènes infectieux (Cooney et al. 2010 ; Ghislat et Lawrence. 2018). De façon complémentaire, l'autophagie peut elle aussi réguler la signalisation induite par la stimulation de PRRs (Ghislat et Lawrence. 2018).

L'autophagie est un processus cellulaire qui implique un trafic membranaire important. La membrane plasmique et les endosomes participent tous deux à ce trafic vésiculaire. Par ailleurs, c'est au niveau de ces membranes que se localisent les TLRs, ce qui pourrai faciliter leur interaction avec l'autophagie. En 2010, Blanchet *et coll.* ont démontré que l'activation des voies de signalisation qui passent par les TLR-4 et TLR-8 dans des DCs humaines, lors d'une infection par le virus VIH, était dépendante du processus autophagique. En effet, des DCs déficientes pour l'autophagie montraient un défaut d'activation de la voie de signalisation NF- κ B après stimulation de ces deux récepteurs (Blanchet et al. 2010). De plus, chez les pDCs, il a été montré qu'une inhibition d'autophagie, via l'utilisation de la molécule pharmacologique 3-MA, entraine une perturbation de la signalisation induite par l'activation du TLR7 par le virus VIH, mais aussi le virus SV5 (Manuse et al. 2010 ; Zhou et al. 2012). En effet, en l'absence d'autophagie, le facteur

de transcription IRF7 est régulé négativement, ce qui bloque la production d'interféron et affecte la réponse antivirale (Zhou et al. 2012). Ces deux études montrent l'importance de l'autophagie dans la réponse antivirale médiée par les DCs humaines, particulièrement dans son interaction avec la signalisation induite par la stimulation des TLR-4/7 et 8.

De manière réciproque, d'autres études suggèrent que l'induction d'autophagie peut être contrôlée par la signalisation induite par les TLRs. En effet, lors d'une infection par un ARN viral simple brin dérivé du VIH, la signalisation induite par l'activation du TLR7 est responsable de l'induction d'autophagie dans des pDCs humaines (Zhou et al. 2012). Il est intéressant de noter que des observations similaires ont été faites lors d'une infection par EBV de pDCs humaines. En effet, après la reconnaissance du virus via les TLR-7 et TLR-9, le processus autophagique est alors induit (Severa et al. 2013), afin de mieux contrôler l'infection virale. Pour finir, la stimulation *in vitro* des TLR-4 et TLR-2, via l'utilisation de LPS et PAM3CSK4 respectivement, est associée à une augmentation d'autophagosomes dans des MDDCs humaines, soulignant l'importance de la signalisation par les TLRs dans l'induction d'autophagie (El-Awady et al. 2015).

Cooney *et coll.* ont montré en 2010 que les NLRs sont eux aussi associés à la modulation d'autophagie dans les DCs humaines. En effet, ils observent que l'induction d'autophagie dans ces cellules est dépendante de la stimulation des récepteurs NOD-1 et NOD-2. La mutation de ces récepteurs entraîne un défaut d'induction d'autophagie en conditions d'infection par la bactérie *S. enterica* (Cooney et al. 2010). De plus, ils ont démontré que l'activation du processus autophagique était dépendante des protéines ATG5, ATG7 et ATG16L1. Il est intéressant de souligner que dans la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire de l'intestin, des variants pour NOD-2 et ATG16L1 sont associés à un déséquilibre dans la flore intestinale (Cooney et al. 2010 ; Sorbara et al. 2013). Ces observations sont en lien avec un défaut dans le trafic et l'élimination de bactéries intracellulaires associés à un défaut d'autophagie, favorisant la persistance des bactéries au niveau intestinal. Cette persistance favorise notamment l'induction disproportionnée de la réponse immunitaire dirigée contre ces bactéries, associée à une forte inflammation (voir partie III. Maladie de Crohn et polymorphismes autophagiques).

Ainsi, on comprend mieux l'importance du processus autophagique dans les fonctions de la cellule dendritique en lien avec la réponse immunitaire innée. Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettent de faire lien entre les récepteurs de l'immunité innée et la machinerie autophagique sont peu décrit à ce jour dans les DC humaines.

b) Capture des antigènes

A la suite de la détection des signaux de danger, les iDCs vont ensuite mettre en place différents mécanismes afin de capturer les antigènes. Il existe trois mécanismes responsables de la capture des antigènes extracellulaires qui sont : l'endocytose médiée par les récepteurs, la phagocytose et la macropinocytose (**Land. 2018**). Malgré un ciblage efficace des microorganismes pathogènes par ces trois mécanismes, certains pathogènes ont développé des stratégies d'échappements du système endo/lysosomal, mais aussi phagocytaire. C'est alors que l'autophagie prend place comme mécanisme de sauvetage permettant la capture et la dégradation de ces pathogènes (voir partie I.4. L'autophagie sélective). De plus l'autophagie est aussi responsable de la prise en charge des antigènes intracellulaires. (**Figure 13**)

(1) L'endocytose médiée par les récepteurs

L'endocytose médiée les récepteurs implique des récepteurs spécifiques, localisés à la surface des DCs et qui vont être capables de reconnaître une grande diversité d'antigènes (en particulier des molécules solubles). On distingue quatre types de récepteurs : les récepteurs Fc, les récepteurs de type lectines, les récepteurs « scavenger » et les récepteurs du complément (**Land. 2018**) (**Figure 13**).

Les récepteurs Fc (pour Fragment Crystallizable region ou fragment constant) vont reconnaître la partie Fc des immunoglobulines, elles même fixée à des antigènes libres, formant ainsi des complexes immuns (**Andersson et al. 2008 ; Platt et al. 2010**).

Parmi les récepteurs de type lectines on retrouve certains CLR comme DC-SIGN impliqué dans la capture du virus VIH ou *Candida Albicans*, les Dectine-1 et 2 impliqués dans la capture de mycobactéries comme *M.tuberculosis* (**Hoving et al. 2014**).

Il existe une très grande variété de récepteurs « scavenger » spécialisés dans la reconnaissance des lipoprotéines modifiées, comme le CD36 ou encore MARCO (**Valeska et al. 2000 ; Shakushiro et al. 2004**).

Pour finir, les récepteurs du complément vont reconnaître les molécules du complément que l'on retrouve fixées sur des cellules cibles (cellules infectées ou pathogènes infectieux) permettant la capture d'éléments dits « opsonisés » (**Heesters et al. 2013**).

Par la suite, ces antigènes sont internalisés dans une vésicule recouverte ou non d'un manteau de clathrine, une protéine structurale impliquée dans les mouvements de membrane. Les vésicules comprenant un manteau de clathrine vont ensuite délivrer leur contenu dans les endosomes précoces, afin qu'il soit finalement pris en charge pour être envoyé vers le compartiment multivésiculaire (qui comprend des endosomes tardifs et des lysosomes)

(McMahon et Boucrot. 2011). C'est au niveau de ce compartiment que les antigènes sont préparés/dégradés pour la présentation antigénique.

(2) La phagocytose

Les DCs sont des cellules phagocytaires professionnelles, tout comme les macrophages et les neutrophiles. La phagocytose est une forme particulière d'endocytose qui va cibler des antigènes insolubles, comme des pathogènes extracellulaires ou des cellules en nécrose/apoptose (Henderson et al. 1997 ; Nagl et al. 2002 ; Borg et al. 2015 ; Rodriguez-Fernandez et al. 2018). Tout comme l'endocytose, elle fait intervenir des récepteurs spécifiques, comme les récepteurs « scavenger » ou encore les récepteurs de type lectines, au niveau de la surface des DCs, afin d'absorber les antigènes dans une vésicule particulière appelée phagosome. Le contenu du phagosome va ensuite être dégradé via la machinerie des lysosomes ou pris en charge par le compartiment multivésiculaire (Savina et Amigorena. 2007 ; Groves et al. 2008). Contrairement aux autres cellules phagocytaires, dans les iDCs la phagocytose induite après détection d'un antigène est « plus douce » en termes de dégradation, afin de conserver une partie de l'élément à dégrader pour permettre de faire de la présentation antigénique. (Figure 13) La dégradation partielle des antigènes passe notamment, par un contrôle du pH des phagosomes, via notamment la protéine NOX2 (pour NADPH oxidase 2) (Savina et al. 2006 ; Savina et Amigorena. 2007).

En 2007, l'équipe de Sanjuan a décrit pour la première fois l'association entre machinerie autophagique et le système phagocytaire, dans des macrophages de souris. En effet, à la suite de stimulations de TLRs, la protéine autophagique LC3, sous sa forme lipidée (LC3-II), est alors recrutée au niveau de la membrane des phagosomes. Ce recrutement est dépendant des protéines autophagiques ATG5 et ATG7 (Sanjuan et al. 2007) et indépendante de ULK1 et FIP200 (Martinez et al. 2011b ; Florey et al. 2011). On appelle ce processus LAP, pour LC3-associated phagocytosis (Sanjuan et al. 2009). Il est intéressant de noter que les phagosomes associés à LC3 ne représentent qu'une faible proportion de phagosomes générés dans les DCs (entre 5 à 10%). De plus, le LAP serait associé à une accélération de la maturation des phagosomes. De nombreux récepteurs sont impliqués dans l'induction de LAP, comme certains TLRs (Romao et Münz. 2014). Dans des MoDCs (pour Monocyte-derived Dendritic cells, ou cellules dendritiques dérivées de monocytes) humaines, il a été montré que l'induction de LAP était induite à la suite d'une stimulation TLR, notamment du TLR-2, et de manière dépendante de NOX2 (Romao et al. 2013). Ce processus est impliqué dans la prise en charge de certains antigènes exogènes et la présentation antigéniques via les molécules de CHM-II dans la DC. De manière intéressante, une autre étude a montré l'importance du LAP dans la sécrétion d'IFN- α par des pDCs humaines en réponse à une stimulation par le TLR-9 (Henault et al. 2012).

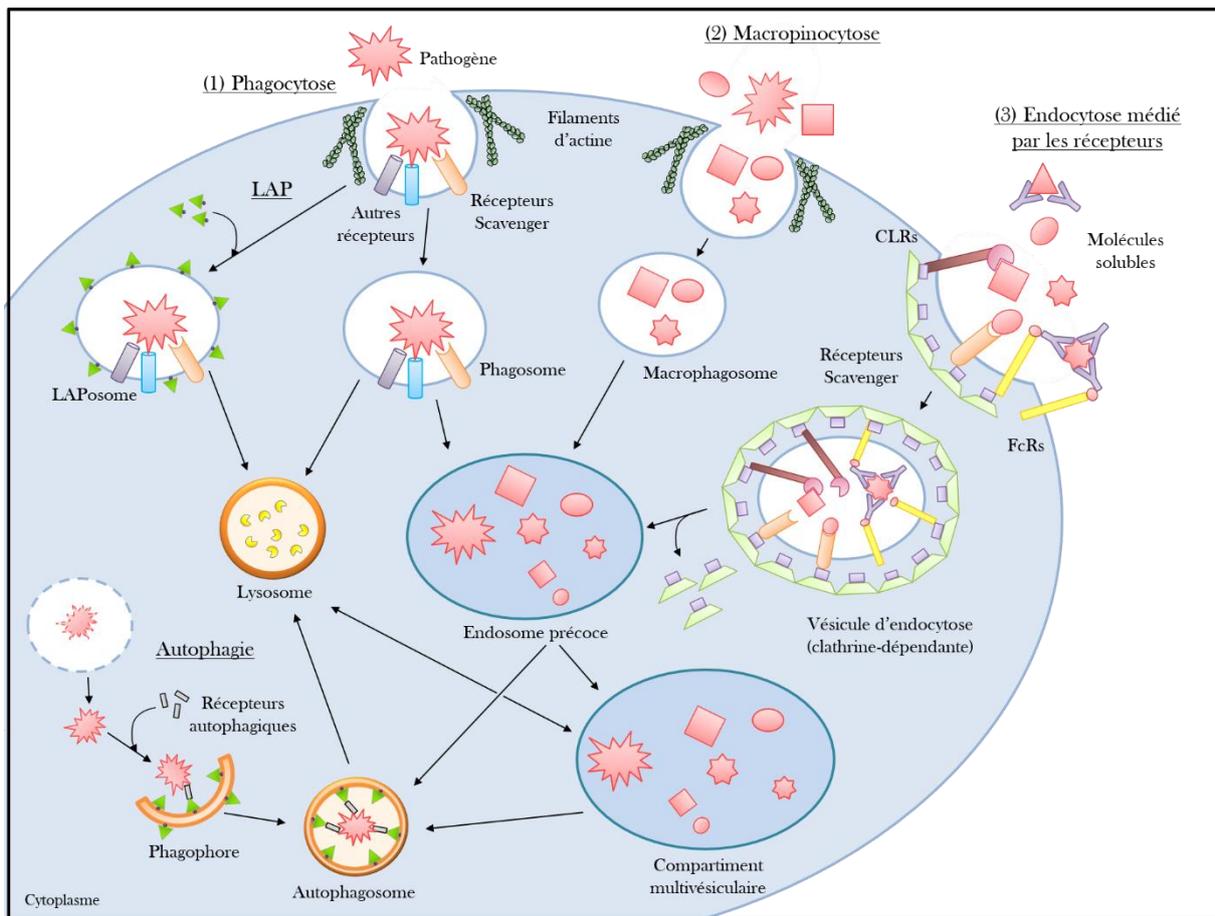


Figure 13 : Systèmes de capture et de trafic des antigènes

La cellule dendritique possède trois systèmes de capture des antigènes : (1) la phagocytose, (2) la macropinocytose et (3) l'endocytose médié par les récepteurs. Chacune de ces voies permet de délivrer des antigènes au niveau du compartiment multivésiculaire, via l'intermédiaire de vésicules spécialisées : (1) le phagosome, (2) le macrophagosome et (3) la vésicule d'endocytose dépendante (ou indépendante) de la clathrine. Ce compartiment peut fusionner avec un lysosome afin de dégrader son contenu. L'autophagie participe à la capture et à la dégradation des antigènes. En effet, on retrouve des phagosomes associés à des molécules LC3 au sein d'un processus appelé LAP (pour LC3-Associated Phagocytosis). Enfin, lorsque des pathogènes s'échappent de leurs vésicules de capture, ils sont pris en charge par les récepteurs autophagiques pour être dégradés par xénophagie.

(3) La macropinocytose

La macropinocytose est un processus d'endocytose non-spécifique/non-sélectif de portion de cytosol comprenant des antigènes, ou des molécules solubles. Dans les DCs immatures, la macropinocytose est le processus majeur de capture des antigènes (West et al. 2000 ; 2004). Contrairement à l'endocytose médiée par les récepteurs et la phagocytose, aucun récepteur n'intervient lors de la capture d'éléments extracellulaires par macropinocytose. Cependant un réseau important de cytosquelette d'actine va permettre la formation d'une vésicule autour de la portion à endocyter, que l'on appelle macropinosome. Par la suite, cette vésicule va déverser son contenu dans le compartiment multivésiculaire afin d'être dégradé (Lim et Gleeson. 2011 ; Liu et Roche. 2015). (Figure 13)

(4) Coopération entre détection des signaux de danger et capture des antigènes

De manière intéressante, il existe une coopération entre détection des signaux de danger et les mécanismes de capture des antigènes. En effet, les divers éléments extracellulaires capturés sont ensuite internalisés au sein de vésicules de transports. Ces vésicules sont issues de la membrane plasmique où les PRRs sont majoritairement localisés. De plus, le contenu des vésicules de transport est généralement déversé dans les compartiments endo/lysosomaux qui sont eux aussi riches en PRRs. Ainsi, la rencontre entre les signaux de danger et les PRRs est renforcée par les différents systèmes de capture au sein des DCs.

Il est intéressant de noter que le phagosome est décrit comme étant une plateforme de signalisation, permettant d'amplifier la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène phagocyté (Mantegazza et al. 2012 ; Moretti et Blander. 2014). De manière réciproque, plusieurs études démontrent que la stimulation des TLRs favorise la formation et la maturation des phagosomes dans les DCs (Trombetta et al. 2003 ; Vulcano et al. 2004). De plus, une autre étude montre que la stimulation de certains TLRs, comme le TLR-4, induit l'activation de la macropinocytose et l'internalisation, alors, d'une grosse portion de cytoplasme (West et al. 2004).

3. Maturation des cellules dendritiques

Comme décrit précédemment, la DCs dans son état immature (iDC) est spécialisée dans la détection des signaux de danger et la capture des antigènes. Lors de ces événements, la iDC reçoit des signaux lui permettant notamment d'activer un programme transcriptionnel particulier, lui permettant d'entrer dans un processus de maturation. A l'issue de ce processus, la DC va subir un changement d'état et devenir alors une cellule dendritique mature (mDC) (Dalod et al. 2014). Il est important de noter que la maturation des DCs n'est pas uniquement dépendante d'une activation transcriptionnelle de celles-ci (Dalod et al. 2014). Le processus de maturation est un processus essentiel à la biologie de la DC, et se caractérise par l'acquisition de nouvelles propriétés fonctionnelles, mais aussi la perte de capacités propre aux iDCs. La caractéristique majeure des DCs matures (mDCs) est leur capacité à présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T (LT) naïfs afin d'activer une réponse immunitaire adaptative spécifiquement dirigée contre l'antigène présenté (Steinman et Hemmi. 2006 ; Dalod et al. 2014). Ce gain de fonction s'accompagne de nombreux changements morphologiques, permettant à la DC de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, où sont localisés les LT naïfs, mais aussi phénotypiques, avec la surexpression de molécules de co-stimulation et l'augmentation en surface des molécules du CMH (Mellman et Steinman. 2001 ; Steinman et Hemmi. 2006 ; Dalod et al. 2014). La DC mature devient alors spécialisée dans la présentation

antigénique et perd en contrepartie ces capacités de reconnaissance et de capture des antigènes, passant par une diminution des capacités d'endocytose et de phagocytose (Sallusto et al. 1995 ; West et al. 2000). (Figure 17)

a) Activation du processus de maturation

Il existe différents types de signaux permettant d'activer les iDCs humaines et qui passe notamment par la reconnaissance des signaux de dangers via des récepteurs spécifiques. A la suite de cette activation, une cascade de signalisation est induite, aboutissant à l'activation de voies de signalisation, dont les principales sont les voies NF- κ B, MAPK et IRFs. (Figure 12) Ces voies permettent l'induction d'un programme transcriptionnel responsable de la mise en place du processus de maturation dans les DCs (Takeuchi et Akira. 2010 ; Dalod et al. 2014).

Par ailleurs, les DCs peuvent entrer dans un processus de maturation de manière indépendante de récepteurs spécifiques. En effet, il a été décrit, que certains types de DCs sont capables d'entrer dans un processus de maturation dit « homéostatique », à l'état basale (Dalod et al. 2014).

(1) Les signaux d'activation de la maturation

On distingue différents signaux capables d'induire le processus de maturation, dont les deux principaux sont : la reconnaissance directe des PAMPs et des DAMPs par les PRRs, et en particulier la stimulation TLR-dépendante (voir partie II.2. a. Détection des signaux de dangers) et l'engagement des récepteurs du TNF.

(a) Stimulation TLR-dépendante

L'engagement des TLRs constitue le signal majeur d'activation des DCs vers le processus de maturation (Dalod et al. 2014 ; Cardinaud et al. 2017). Il conduit à l'activation de deux voies de transduction : la voie dépendante de la protéine adaptatrice MyD88, ou la voie indépendante de MyD88 (Dzopalic et al. 2012).

La protéine MyD88 se compose de deux domaines : un domaine TIR et un domaine de mort. Le domaine TIR lui permet d'interagir directement avec les TLR-5/6/7/8 et 9. Son interaction avec les TLR-1/2 et 4 se fait par l'intermédiaire de l'adaptateur TIRAP. Le domaine de mort, quant à lui, permet de transduire les signaux d'activation via le recrutement de protéines kinases IRAKs (pour Interleukine Receptor Associated Kinases). Ce sont les kinases IRAK-1/2 et 4 qui permettent le recrutement de la protéine de liaison TRAF-6 (pour TNFR-Associated Factor-6). Le complexe IRAKs/TRAF-6 se détache alors de MYD88 pour interagir avec un complexe protéique composé de la kinase TAK-1 (pour TGF β -associated kinase-1) et des protéines d'adhésion TAB-2 et TAB-3 (pour TAK-1 Binding protein-2 ou 3). C'est le détachement des kinases IRAKs qui permet au complexe ainsi formé d'être transloqué dans le

cytosol, où l'ubiquitinylation de TRAF-6 induit l'activation de TAK-1. C'est via l'activation de cette kinase qu'une cascade de phosphorylation entraîne l'activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPKs (Kawai et al. 2004 ; Kawai et Akira. 2006 ; 2009) (Figures 15 et 16). D'autre part, les kinases IRAK-1/2 et 4 peuvent aussi interagir avec TRAF-3, afin de recruter le complexe IKK (pour I κ B Kinase). C'est avec la sous-unité IKK- α de IKK que le complexe IRAKs/TRAF-3 interagit pour finalement recruter et phosphoryler le facteur de transcription IRF-7, afin d'induire la production d'IFN-I (Kawai et al. 2004 ; Kawai et Akira. 2006 ; 2009) (Figure 14).

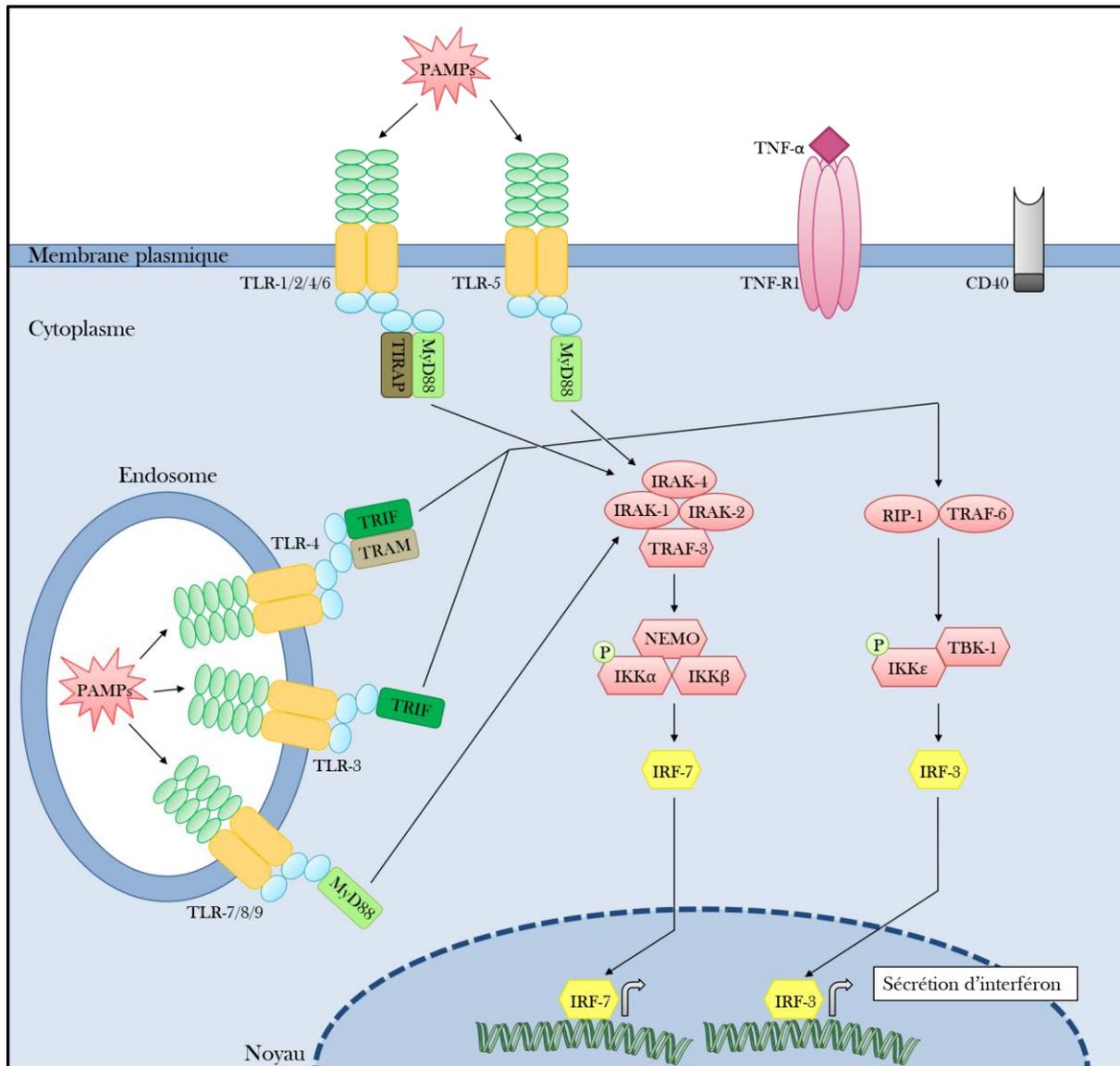


Figure 14 : Voie des interférons impliquée dans la maturation des cellules dendritiques

L'induction de la maturation des cellules dendritiques passe par l'engagement et l'activation de récepteurs spécifiques, dont les principaux sont les TLRs, le TNF-R1 et le CD40. L'activation des TLRs-MyD88 dépendant permet d'activer de multiples intermédiaires (protéines rouges) aboutissant à la translocation du facteur de transcription IRF-7 dans le noyau des DCs. Le facteur IRF-3 est, quant à lui, transloqué à la suite de l'activation de TLRs-TRIF dépendant. La voie des interférons favorise la sécrétion d'interféron qui module la réponse immunitaire adaptative.

La voie indépendante de la protéine MyD88 passe alors par la molécule adaptatrice TRIF. La stimulation du TLR-3 entraîne le recrutement direct de l'adaptateur TRIF grâce à son domaine TIR. Par ailleurs, la stimulation du TLR-4, quant à lui, entraîne le recrutement de TRIF via l'adaptateur intermédiaire TRAM (Dzopalic et al. 2012). La protéine TRIF induit le recrutement et l'activation de la protéine TRAF-6 ou RIP-1 (pour Receptor Interacting Protein-1). Par la suite une cascade de phosphorylation entraîne l'activation des voies de signalisation NF- κ B et interféron (Kawai et al. 2004 ; Kawai et Akira. 2006 ; 2009) (Figures 14 et 15). Il est intéressant de noter que la voie interféron est activé via l'interaction entre TRIF et le complexe IKK- ϵ /TBK-1. Cette interaction induit la phosphorylation du facteur de transcription IRF-3, afin d'induire la production d'IFN-I.

(b) Stimulation via les récepteurs du TNF

Les récepteurs aux TNFs (pour Tumor Necrosis Factors) sont une vaste famille de récepteurs transmembranaires capables de reconnaître différents types de ligands, tels que des cytokines pro-inflammatoires, et dont la stimulation conduit à la maturation des DCs. En effet, il a été montré *in vitro* que des iDCs sont capable de maturer à la suite d'une détection de cytokines pro-inflammatoires, telle que le TNF- α , ou via l'engagement du récepteur CD40 avec le CD40 ligand (Reddy et al. 1997 ; Caux et al. 1994 ; Xia et al. 2008 ; Spadaro et al. 2012). On distingue deux groupes de récepteurs aux TNFs : les récepteurs qui possèdent un domaine intracellulaire de mort, transduisant un signal d'induction d'apoptose, et les récepteurs qui n'en possèdent pas, transduisant des signaux activateurs et anti-apoptotiques.

Tout d'abord, seul le TNF-R1 est impliqué dans l'induction de la maturation chez les DCs (Sallusto et al. 1995). TNF-R1 est exprimé à la membrane plasmique des DC et reconnaît le TNF- α . La stimulation du récepteur induit le recrutement de la protéine TRADD (pour TNFR-Associated DD protein) qui va transduire les signaux d'activation via RIP-1 et TRAF-2. Ces deux protéines entraînent une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPKs (Reddy et al. 1997 ; Bradley. 2008 ; Xia et al. 2008) (Figures 15 et 16).

Le CD40 (ou TNFRSM5 pour TNF Receptor Superfamily Member 5) est reconnu par le ligand CD40L, et exprimé à la membrane plasmique des DCs. La stimulation de ce récepteur entraîne l'oligomérisation de plusieurs récepteurs entre eux, afin de transduire le signal d'activation. De nombreuses protéines TRAFs, telles TRAF-2/3/5 et 6, sont alors recrutées au niveau du domaine intracellulaire du CD40. Le recrutement des protéines TRAFs entraînent une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation des voies de signalisation NF- κ B et

MAPKs (Caux et al. 1994 ; Vidalain et al. 2000 ; Xia et al. 2008 ; Ma et Clark. 2009) (Figures 15 et 16).

(2) Les voies de signalisation induites

(a) La voie NF- κ B

La famille NF- κ B est une famille de facteurs de transcription inductibles constituée de cinq membres : NF- κ B1 (aussi appelé p50), NF- κ B2 (aussi appelé p52), RelA (aussi appelé p65), RelB and c-Rel. On distingue deux voies NF- κ B : la voie classique (ou canonique) et la voie alternative (ou non-canonique) (Lawrence. 2009 ; Liu et al. 2017) (Figure 15).

La voie de signalisation classique de NF- κ B fait intervenir majoritairement p50, p65 et c-Rel. Ces membres sont séquestrés dans le cytoplasme par la protéine régulatrice I κ B, sous forme de dimères (p50/p65 et p50/c-Rel). C'est à la suite de l'activation du processus de maturation dans la DC passant par la stimulation de PRRs, du TNF-R1, ou bien de récepteurs aux cytokines, que la kinase TAK-1 est activée, permettant l'assemblage et l'activation du complexe kinase IKK. Ce complexe est composé de deux sous-unités catalytiques nommés IKK α et IKK β , et une sous-unité régulatrice nommé NEMO (pour NF κ B Essential MODulator ou IKK γ). Le complexe IKK activé va phosphoryler de I κ B, entraînant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. La dégradation de cette protéine entraîne la libération de NF- κ B (p50/p65 et p50/c-Rel) qui peut alors transloquer jusqu'au noyau (Lawrence. 2009 ; Liu et al. 2017). En tant que facteur de transcription NF- κ B se fixe à l'ADN au niveau d'une séquence κ B, afin d'induire la transcription de gènes cibles impliqués dans l'adhésion, la prolifération et la survie cellulaire, mais aussi dans la réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Ade et al. 2007 ; Laar et al. 2010).

La voie de signalisation alternative de NF- κ B fait intervenir p52 et RelB. C'est à la suite de l'activation du processus de maturation dans la DC passant la stimulation du TNF-R1, ou bien l'engagement du CD40, que la kinase NIK (pour NF- κ B-Inducing Kinase) et le complexe IKK coopèrent afin de phosphoryler la protéine p100, une protéine précurseur de p52. La phosphorylation de p100 entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation partielle, ce qui active p52. Le dimère p52/RelB peut alors transloquer jusqu'au noyau et induire la transcription de gènes cibles, et en particulier des gènes impliqués dans l'immunité adaptative, codant notamment pour les molécules de costimulations ou des cytokines immuno-stimulatrices (Tas et al. 2007 ; Lawrence. 2009 ; Liu et al. 2017 ; Sun. 2017).

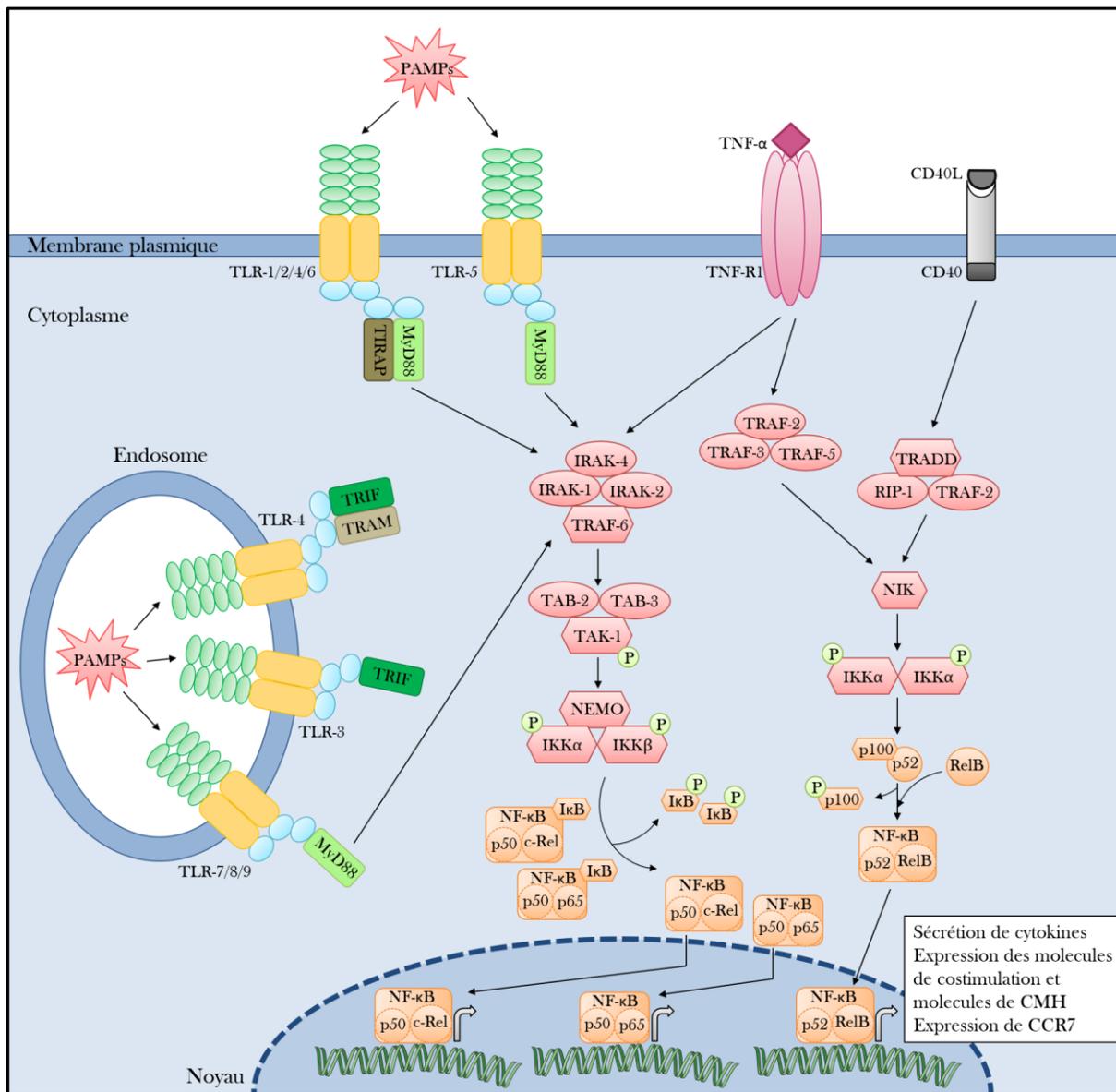


Figure 15 : Voie NF-κB impliquée dans la maturation des cellules dendritiques

L'induction de la maturation des cellules dendritiques passe par l'engagement et l'activation de récepteurs spécifiques, dont les principaux sont les TLRs, le TNF-R1 et le CD40. L'activation de ces récepteurs induit une cascade de phosphorylation de multiples intermédiaires (protéines rouges) qui permettent d'activer la voie NF-κB (protéines oranges). La translocation des facteurs de transcription NF-κB(p50/c-Rel) et NF-κB(p50/p65) se déroule à la suite de l'engagement des TLRs-MyD88 dépendant, ainsi que du TNF-R1, alors que celle du facteur NF-κB(p52/RelB) se déroule à la suite de l'engagement du TNF-R1 et du CD40. L'activation de la voie NF-κB dans les DCs induit la sécrétion de nouvelles cytokines et l'expression des marqueurs de maturation, tels que le récepteur CCR7, les molécules de costimulation ou encore les molécules du CMH. Cette voie centrale du processus de maturation permet l'acquisition de nouvelles fonctions biologiques pour la DC.

(b) La voie des MAPKs

La famille des MAPKs est une famille de protéines kinases qui se distinguent en trois groupes : le groupe ERK (pour Extracellular signal-Regulated Kinase) qui se compose de ERK-1 et 2, le groupe JUNK (pour c-JUN N-terminal Kinase) qui se compose de JUNK-1, 2 et 3, et

enfin le groupe p38MAPK qui se compose de p38MAPK- α , β , δ et γ . Les groupes ERK, JUNK et p38MAPK diffèrent par leurs structures et leurs fonctions. Ces kinases sont toutes régulées par d'autres kinases, les MAPKK (MAPK Kinases), elles-mêmes régulées par des MAPKKK (MAPKK Kinase) (Chang et Karin. 2001 ; Nakahara et al. 2006 ; Soares-Silva et al. 2016) (Figure 16).

C'est après stimulation divers récepteurs que la voie ERK est activée, afin de réguler négativement la maturation des DC humaines (Puig-Kröger et al. 2001). En effet, après engagement du récepteur, une cascade de phosphorylation se met en place, avec tout d'abord, le recrutement et activation d'une protéine Ras. Ras va ensuite recruter et activer la protéine Raf, une MAP3K, qui recrute et active à son tour la protéine MEK, une MAP2K. C'est finalement MEK qui recrute et active ERK-1/2 au niveau de son motif Thréonine-Tyrosine (TEY). ERK-1/2 vont ensuite activer des facteurs de transcriptions, tel que AP-1, afin d'induire la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10 ou le TNF- α , et réguler négativement la sécrétion d'IL-12 ou encore IFN- β (Chang et Karin. 2001 ; Nakahara et al. 2006 ; Soares-Silva et al. 2016).

La voie JUNK prend place à la suite de la détection d'antigènes extracellulaires. La stimulation de ces récepteurs conduit à une cascade de phosphorylation qui commence par le recrutement et à l'activation de la protéine RAC-1. Cette protéine va ensuite recruter et activer la kinase MEKK, qui recrute et active la protéine régulatrice MKK-4/7. C'est MKK-4/7 qui finalement recrute et active JUNK-1/2 et 3 au niveau du motif Thréonine-Tyrosine (TPY). JUNK-1/2 et 3 vont ensuite activer des facteurs de transcriptions, tel que c-Jun, afin de réguler l'expression de molécules de co-stimulations telles que CD86/80, ou encore le CD83, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , ou encore IL-12 β (Chang et Karin. 2001 ; Nakahara et al. 2006 ; Soares-Silva et al. 2016).

La stimulation de TLRs induit majoritairement l'activation de la voie p38MAPK, qui est essentielle à la maturation de la DC. C'est TRAF-2/3 ou 6, puis la protéine Rho, qui sont premièrement recrutées et activées au niveau du récepteur, afin de recruter et activer les kinases MEKK-1, ASK-1 ou TAK-1. Ces kinases peuvent recruter et activer, à leur tour, les kinases MKK-3/6, pour finalement activer p38MAPK- α , β , δ et γ au niveau du motif Thréonine-Tyrosine (TGY). Les protéines p38MAPK- α , β , δ et γ vont ensuite activer des facteurs de transcriptions, tels que ATF-1/2, afin de réguler l'expression de molécules de co-stimulations telles que CD86/80/CD40, ou encore le CD83, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6 ou encore IL-12 β (Chang et Karin. 2001 ; Nakahara et al. 2006 ; Soares-Silva et al. 2016).

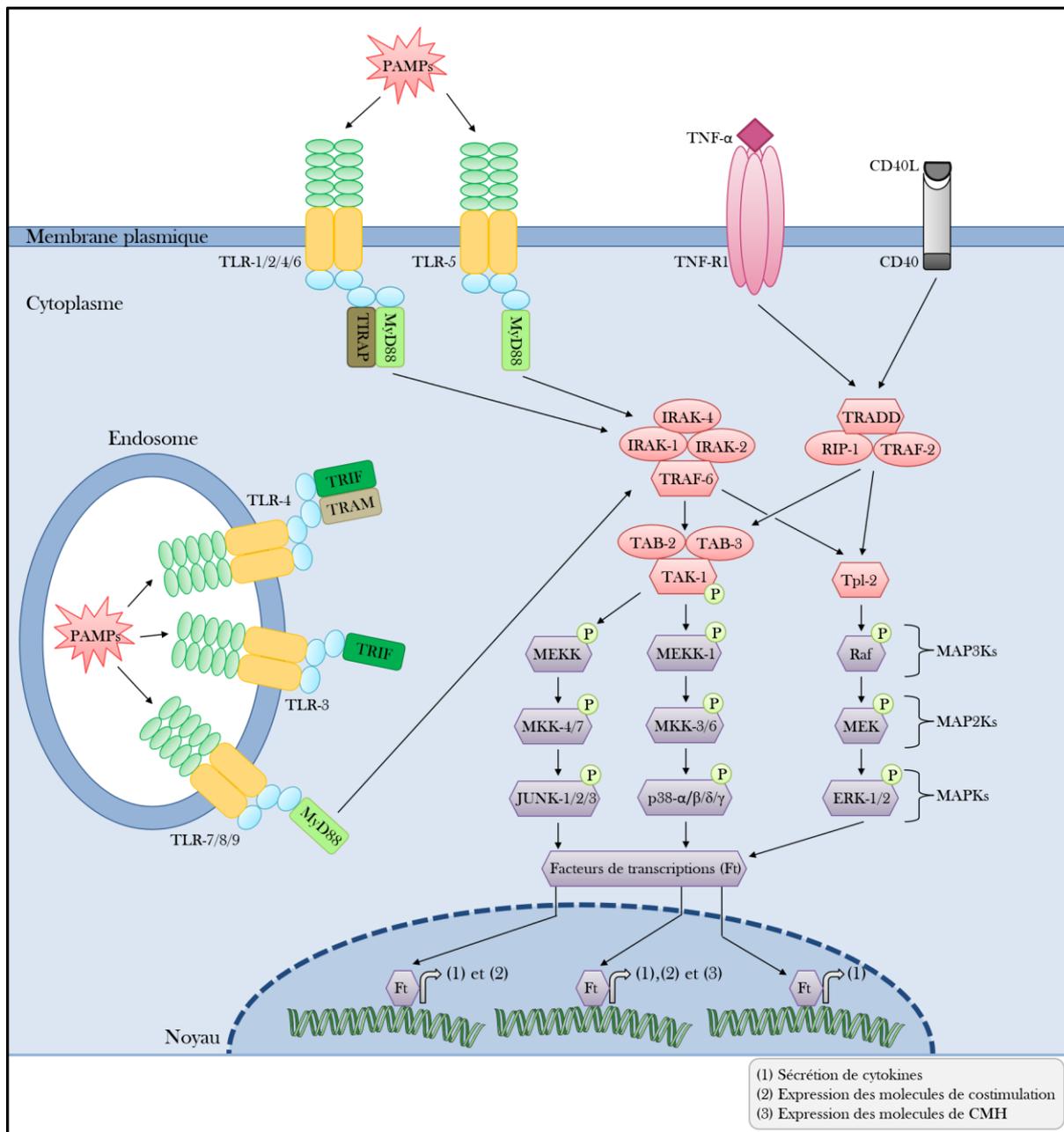


Figure 16 : Voie des MAPKs impliquée dans la maturation des cellules dendritiques

L'induction de la maturation des cellules dendritiques passe par l'engagement et l'activation de récepteurs spécifiques, dont les principaux sont les TLRs, le TNF-R1 et le CD40. L'activation des TLRs-MyD88 dépendant, ainsi que du TNF-R1 et du CD40 induit une cascade de phosphorylation de multiples intermédiaires (protéines rouges) permettant d'activer la voie des MAPKs (protéines violettes). Cette voie se découpe en quatre étapes : elle commence par l'activation d'une MAPKKK, puis une MAPKK, pour finir par activer une MAPK, permettant à divers facteurs de transcriptions de transloquer dans le noyau des DCs. Il existe trois groupes de MAPKs qui participent différemment à l'acquisition de nouvelles fonctions au sein de la DC. Les ERK-1/2 induisent (1) la sécrétion de nouvelles cytokines. Les JNK-1/2/3 partagent aussi les fonctions de ERK (1) et sont capables d'induire (2) l'expression de molécules de costimulation. Les p38-α/β/δ/γ partagent les fonctions des JNK (1) et (2) et sont capable d'induire (3) l'expression des molécules du CMH.

b) Acquisition des capacités de migration

(1) Acquisition de la mobilité

La fonction principale des mDCs est d'activer les LT naïfs, situés dans les organes lymphoïdes secondaires (ou OLS). Afin de réaliser cette fonction, les DCs doivent quitter le tissu endommagé/infecté et migrer jusqu'à la zone T des OLS. Ainsi, lors de la maturation, les DCs vont sur-exprimer le récepteur CCR7 (pour CC-chemokine Receptor 7) responsable de la migration des DCs vers les OLS (Sallusto et al. 1998 ; Yanagihara et al. 1998 ; Xia et al. 2008 ; Worbs et al. 2017). L'expression de ce récepteur est notamment régulée par le récepteur aux lectines, LepRb (Al-Hassi et al. 2013). CCR7 va reconnaître deux chimiokines sécrétées au niveau de la zone T des OLS, qui sont CCL19 (pour CC-chemokine Ligand 19) et CCL21 (Dieu et al. 1998 ; Geissmann et al. 2002 ; Worbs et al. 2017 ; Tiberio et al. 2018) (Figures 17 et 18). Ces chimiokines vont ainsi guider les DCs jusqu'aux LT à travers la circulation lymphatique.

Pour permettre aux DCs de migrer physiquement vers les OLS, de nombreux changements morphologiques sont mis en place lors de la maturation. En effet, ces cellules vont subir des réarrangements du cytosquelette d'actine, régulé notamment par les protéines cofilin, Rac, Rho, Cdc42, ou encore la protéine WAS (pour Wiskott-Aldrich Syndrome protein) (Burns et al. 2001 ; Verdijk et al. 2004). Ces réarrangements induisent une augmentation du nombre et de la taille des dendrites à la surface des DCs, afin de favoriser les contacts cellulaires permettant aux DCs de bouger/migrer à travers la lymphe, mais aussi d'interagir avec les LT dans les OLS. Il est intéressant de noter que les contraintes physiques environnementales et les contacts cellule-cellule contrôlent la migration des DCs (Heuzé et al. 2013).

(2) Régulation de la mobilité par autophagie

De manière intéressante, il a été démontré que l'autophagie régule la migration des DCs vers les OLS. En effet, Wildenberg *et coll.* ont montré que des DCs humaines déficientes en ATG16, donc déficientes en autophagie, présentaient des défauts de migration associés à une augmentation d'adhérence cellulaire (Wildenberg et al. 2012 ; 2017). L'absence d'autophagie entraîne une augmentation de la polarisation d'actine dans les DC, ce qui favorise l'attachement des cellules aux cellules épithéliales. En effet, ils démontrent que l'autophagie régule la dynamique de formation du cytosquelette d'actine, via la protéine Rac1, et associé à la capacité de migration des DCs (Wildenberg et al. 2017). Sans ce dynamisme de formation des filaments d'actine, la DC va stagner au niveau des tissus. (Figure 18)

c) Acquisition des capacités de présentation d'antigène

(1) Expression des protéines impliquées dans la présentation des antigènes

En parallèle de l'acquisition des capacités de migration, la DC acquiert des capacités de présentation antigénique. Cette présentation se fait grâce à des molécules du CMH qui vont présenter des antigènes sous forme de peptides antigéniques, on parle alors de complexes CMH/peptide. Il existe deux types de molécules du CMH : les molécules du CMH de classe I (CMH-I) et de classe II (CMH-II). Les complexes formés sont transportés à la membrane plasmique et peuvent être reconnus par les récepteurs des lymphocytes T (ou TCR pour T-Cell Receptor) lors de la présentation antigénique (**Mellman et Steinman. 2001**). Comme toutes les cellules nucléées, les DCs expriment une grande quantité de CMH-I en surface. Par ailleurs, seules les cellules présentatrices d'antigènes, dont font parties les DCs, expriment également des molécules du CMH-II.

Au sein des iDCs, les molécules du CMH-II sont faiblement exprimées à la surface des cellules (**Pierre et al. 1997**). En effet, ces molécules sont transportées vers des endosomes tardifs particuliers, aussi appelés MIICs (pour MHC class II compartments), où elles sont retenues après ubiquitination par la E3 ubiquitine ligase MARCH1. Par la suite, les MIICs fusionnent avec des lysosomes afin de dégrader les molécules du CMH-II ubiquitinées (**Walseng et al. 2010 ; Garstka et Neefjes. 2013**). Lors de la maturation des DCs, l'activité de MARCH1 est fortement réduite permettant aux molécules du CMH-II d'être transportées et stabilisées à la membrane plasmique (**Pierre et al. 1997 ; Broekeet al. 2013**). Par ailleurs, il a été montré qu'à la suite de la stimulation de BMDCs, par du LPS ou différents agents microbiens, le trafic intracellulaire des molécules du CMH-II est rapidement régulé. En effet, *Chow et coll* ont montré qu'après quelques minutes de stimulation, des tubules se forment au niveau des lysosomes qui, se détachent alors et fusionnent ensuite avec la membrane plasmique (**Chow et al. 2002**). Les lysosomes étant des compartiments riches en molécules du CMH-II, cet événement est associé à une relocalisation de ces molécules, ainsi qu'à leur stabilisation à la surface de la membrane plasmique des DCs (**Chow et al. 2002**). Bien que cela n'ait été montré que chez la souris, il est tout à fait possible d'envisager cette régulation du trafic des molécules du CMH-II au sein de DCs humaines. De manière intéressante, il a été montré que la néosynthèse de molécules du CMH-II est transitoire au cours de la maturation des DCs et suite à l'engagement de récepteurs de l'immunité innée par des composants microbiens (**Broekeet al. 2013**). Cependant, cette néosynthèse reste marginale puisque la régulation du trafic des molécules du CMH-II ne dépend pas, en majorité, d'une régulation transcriptionnelle.

De manière complémentaire, l'activation des DCs entraîne une régulation transcriptionnelle aboutissant à l'expression du marqueur d'activation CD83, mais aussi la surexpression de molécules dites « de co-stimulation » CD80, CD86, CD54, CD58 et CD40 (Caux et al. 1994 ; McLellan et al. 1995 ; Hubo et al. 2013 ; Cardinaud et al. 2017 ; Bazan et al. 2018). (Figure 17) Les molécules de co-stimulation permettent de co-activer ou co-inhiber les LT pendant la présentation antigénique. Je détaillerai les familles majeurs de molécules de co-stimulation dans la partie « 4.b)(1) Les molécules de co-stimulation ». Ainsi, on appelle « signal 1 » le signal donné par le complexe CMH/peptide vers le lymphocyte T et « signal 2 » celui donné par les molécules de co-stimulation afin d'activer, ou d'inhiber, pleinement la cellule T.

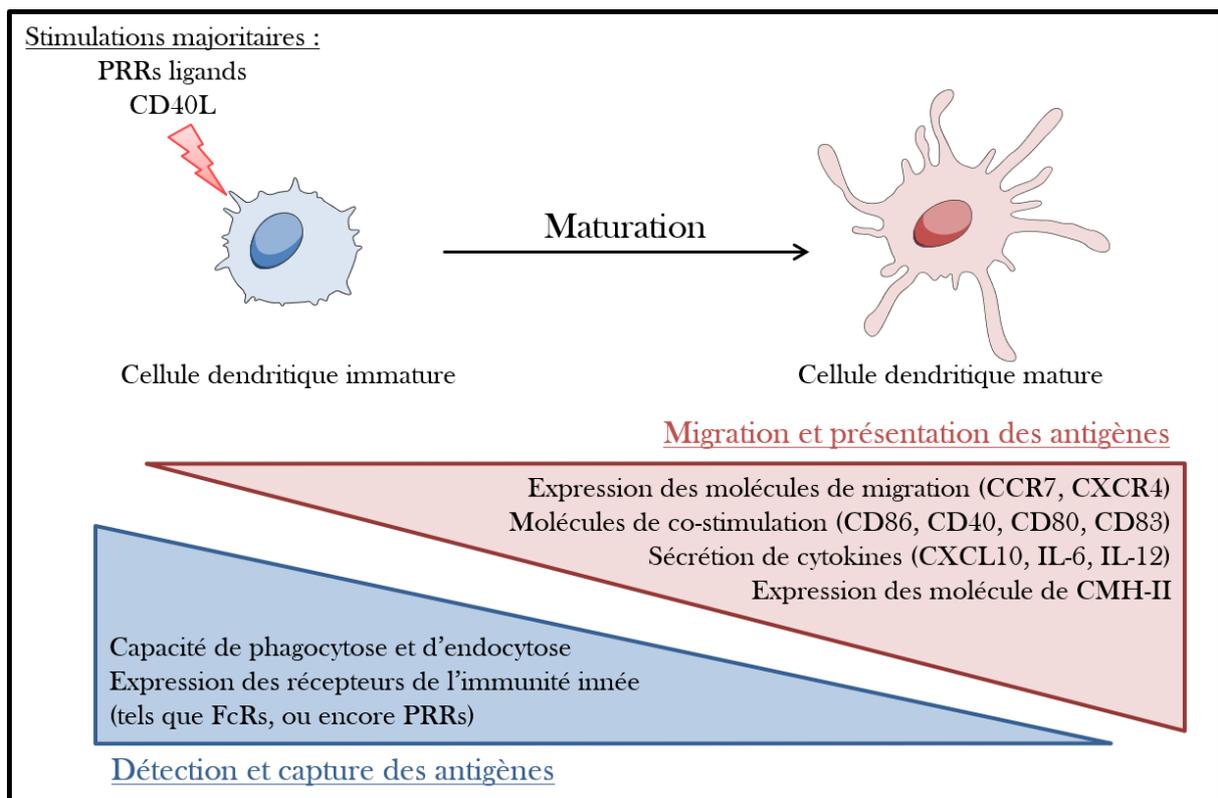


Figure 17 : Evolution d'une cellule dendritique au cours du processus de maturation
 Lorsque la DC est dans son état immature, elle possède des particularités (triangle bleu) qui lui permettent d'être spécialisée dans la détection des signaux de danger et la capture d'antigènes. Au cours de son processus de maturation, elle perd certaines de ces particularités afin d'en acquérir de nouvelles (triangle violet), lui permettant de développer de nouvelles fonctions. Ainsi, lorsque la DC est dans son état mature, elle est spécialisée dans la migration et la présentation des antigènes.

(2) Régulation de l'expression des protéines impliquées dans la présentation des antigènes par autophagie

Tout comme l'acquisition de la mobilité, l'autophagie régule aussi le niveau d'expression des molécules de co-stimulation et le niveau de molécules du CMH en surface des DCs. En effet, il a été montré que dans des DC humaines, en réponse à une infection par la bactérie *M. tuberculosis*, l'autophagie induite est associée à la maturation de ces DCs. Min *et coll.* démontrent

que l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 et la translocation des molécules du CMH-II (HLA-DR particulièrement) est dépendante du processus autophagique (Min et al. 2010). De manière intéressante, Mamuse *et coll.* observent qu'une inhibition d'autophagie dans des pDCs humaines diminue la réponse à une infection par le virus SV5 (pour Simian Virus 5), associé à un défaut d'expression de la molécule CD80 (Manuse et al. 2010). Pour finir, une autre étude souligne l'importance de l'autophagie dans la présentation antigénique et la mise en place d'une réponse T spécifique, associée à une stimulation par un NLR. En effet à la suite d'une activation du récepteur NOD-2, l'autophagie est activée dans les DCs humaines et favorise le trafic membranaire du marqueur de maturation CMH-II (HLA-DM particulièrement) (Cooney et al. 2010). (Figure 18)

d) Sécrétion de médiateurs chimiques immunitaires

(1) Production de cytokines

En réponse au programme transcriptionnel mis en place pour leur maturation, les DCs acquièrent une plus grande capacité de sécrétion de cytokines essentielles à l'homéostasie du système immunitaire (Figure 17). Les cytokines sont des molécules chimiques (ou médiateurs chimiques) sécrétées par les cellules du système immunitaires, mais aussi les cellules épithéliales. Elles sont produites lors d'une réponse immunitaire notamment afin de recruter et d'activer les cellules immunitaires au sein d'un tissu enflammé (Matricon. 2010). Les cytokines sont des messagers importants de la réponse immunitaire innée en tant que médiateurs de la réponse inflammatoire, mais aussi de l'immunité adaptative en permettant la polarisation des lymphocytes T (Nizzoli et al. 2013). On distingue deux types de cytokines, les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires. Elles sont composées de différents sous-groupes qui comprend : les interleukines (ou IL), les chimiokines, les molécules interférons (ou IFN), des molécules de la famille du CSF (pour Colony-Stimulating Factors), des molécules de la famille du TGF (pour Transforming Growth Factor) et des molécules de la famille du TNF.

Lors de la réponse immunitaire innée, la mise en place de la réponse inflammatoire est essentielle pour l'élimination de bactéries ou virus infectieux, mais aussi de débris cellulaires induits par des lésions au sein des tissus. Cette réponse passe notamment par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α (Blanco et al. 2008 ; Chen et al. 2009 ; Hémond et al. 2013 ; Ferreira et al. 2017). Les DCs qui sécrètent ce type de cytokines ont un profil de type DCs inflammatoires. En contrepartie, les DCs tolérogènes sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, tels que le TGF- β et l'IL-10, pour contrôler l'inflammation afin d'éviter les lésions tissulaires ou la mise en place d'une inflammation chronique (Li et Flavell. 2008). Par ailleurs, les DCs peuvent sécréter des cytokines particulières en fonction du contexte

infectieux. En effet, elles sécrètent des molécules interféron de type I (IFN- α et β) spécifiquement en réponse à une infection virale (Manuse et al. 2010 ; Zhou et al. 2012 ; Fekete et al. 2018).

Lors de la réponse immunitaire adaptative, la sécrétion de cytokines permet aux DCs de polariser les lymphocytes T afin d'orienter la réponse immunitaire T vers une réponse de type Th1, Th2, Th17, ou encore Treg (Figure 20). La polarisation des LT constitue le « signal 3 » nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative spécifique par les DCs (Kapsenberg. 2003 ; Blanco et al. 2008). Je détaillerai cette partie ci-après (II.4.b) Activation et polarisation des lymphocytes T).

(2) Sécrétion de cytokines et autophagie

De manière intéressante, l'autophagie et la sécrétion de cytokines dans les DCs sont positivement et négativement corrélées (Figure 18).

Lors de la réponse anti-virale médiée par les pDCs humaines, la sécrétion de cytokines et particulièrement d'interféron, est contrôlée par autophagie. En effet, l'inhibition d'autophagie dans ces cellules après une infection par les virus EBV, SV5 et VIH réduit la production d'IFN- α induite par la stimulation des TLR-7 et TLR-9 (Blanchet et al. 2010 ; Manuse et al. 2010 ; Zhou et al. 2012 ; Severa et al. 2013). A l'inverse, l'infection par le virus KSHV entraîne une inhibition d'autophagie dans des MoDCs humaines. Ce blocage est associé à une augmentation de la sécrétion d'IL-10, IL-6 et IL-23 et contrôlé par le facteur de transcription STAT3 issu de la reconnaissance du virus par le récepteur CLR DC-SIGN (Santarelli et al. 2014).

Par ailleurs, lors de la réponse anti-bactérienne médiée par les MoDCs humaines, l'autophagie régule la sécrétion des cytokines. En effet, l'infection par *M. tuberculosis* entraîne une inhibition de l'autophagie qui a pour conséquence, notamment, une diminution de la production d'IL-6 et IL-10 (Min et al. 2010). Par opposition, une étude, menée *in vitro*, montre que l'utilisation de l'inhibiteur autophagique chloroquine entraîne une augmentation de la sécrétion d'IL-6 chez les MoDCs humaines et d'IL-23 chez les MoLC (pour Monocytes-derived Langerhans Cells) humaines, associée à une diminution de sécrétion d'IL-12 et probablement régulée par la MAPK p38 (Said et al. 2014).

Pour conclure, il semblerait que l'autophagie soit un processus essentiel lors de la maturation des DCs humaines, en réponse à une infection. Ce processus contrôle l'acquisition de nouvelles fonctions immunitaires au sein des DC matures (Figure 18). Cependant, les mécanismes moléculaires qui permettent à l'autophagie de réguler la maturation des DCs humaines ne sont pas bien décrits à ce jour.

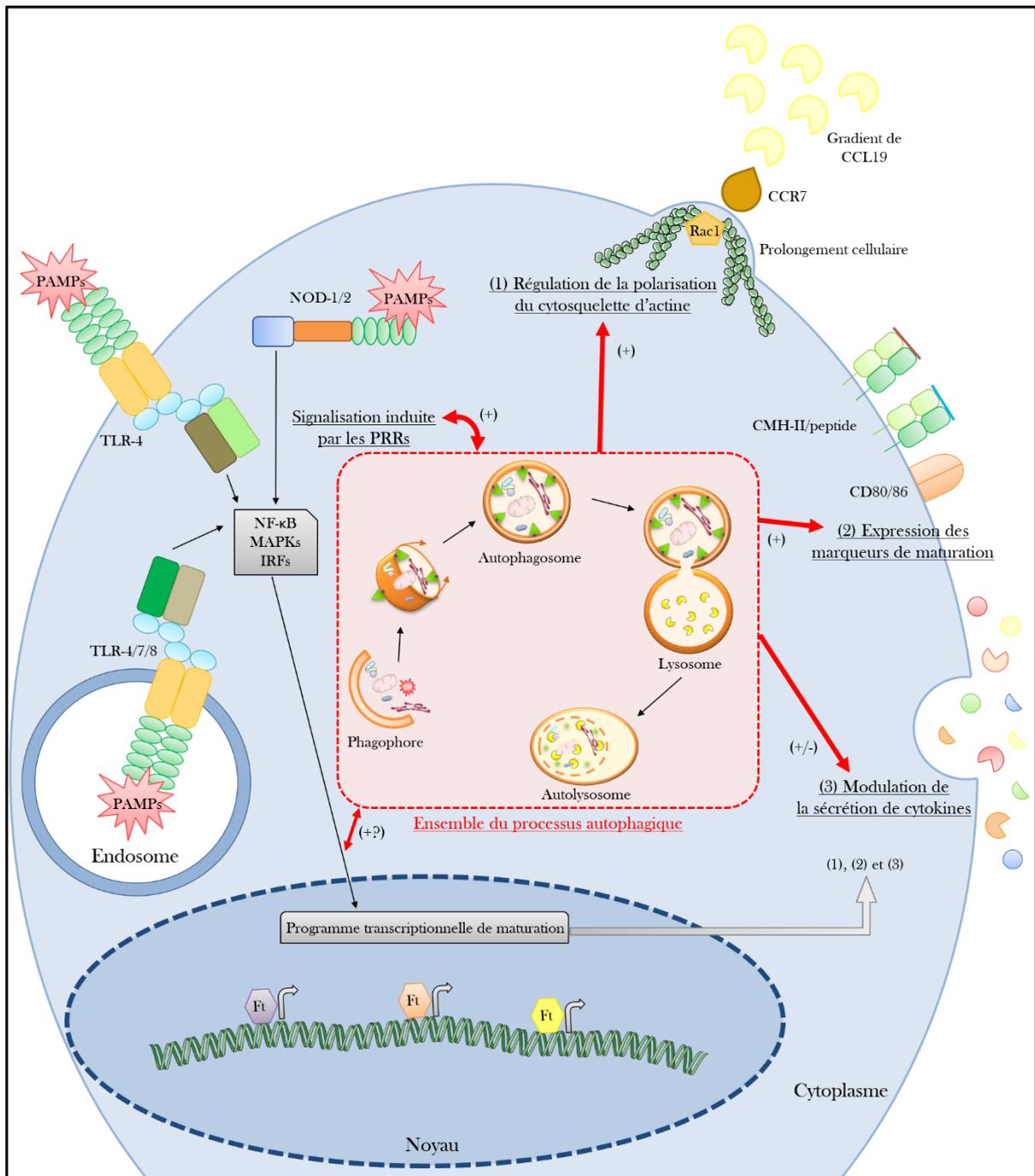


Figure 18 : Contribution de l'autophagie au cours de la maturation des cellules dendritiques

Le processus autophagique intervient au sein des DCs pour favoriser la transduction du signal d'activation des TLRs et NLRs, permettant la maturation de celles-ci. De plus, l'autophagie contribue à l'acquisition de nouvelles fonctions biologiques, développées au cours du processus de maturation (1), (2) et (3), permettant ainsi aux DCs d'obtenir « un profil complet » de maturation.

4. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative

Les DCs ont la capacité unique de moduler à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative. L'immunité adaptative se met en place, généralement, lorsque l'immunité innée n'est pas suffisante pour résoudre une infection. Elle fait intervenir des lymphocytes T effecteurs capables d'éliminer spécifiquement l'élément de danger. La réponse T est basée sur deux types

de lymphocyte T : les lymphocytes T exprimant le co-récepteur CD4 (ou LT CD4+) et les lymphocytes T exprimant le co-récepteur CD8 (ou LT CD8+). C'est lors de la présentation antigénique, qu'un réseau complexe de ligands/récepteurs se met en place entre la DC et le LT, formant ainsi une synapse immunologique. C'est au niveau de cette synapse qu'un LT naïf va recevoir tous les signaux nécessaires à son activation et sa différenciation en LT effecteurs, afin d'initier la réponse immunitaire adaptative (Mellman et Steinman. 2001; Solano-Gálvez et al. 2018).

On distingue trois signaux essentiels délivrés par la DC pour activer pleinement un LT : « le signal 1 » est donné par la liaison du complexe CMH/peptide (DC) avec le TCR (LT), associé à une interaction entre le CMH-I ou CMH-II (DC) avec le CD8 ou CD4 respectivement (LT) ; « le signal 2 » est donné par les molécules de co-stimulation, où des récepteurs interagissent avec leur ligand, telle que la liaison entre les récepteurs CD80/CD86 (DC) et le ligand CD28 (LT) ; enfin « le signal 3 » est donné par les cytokines sécrétées par la DC qui vont permettre de polariser le LT, c'est-à-dire « d'orienter le devenir » de cette cellule vers une réponse spécifique de l'antigène présenté (Verboogen et al. 2016). (Figures 19 et 20)

a) Présentation des antigènes

C'est après avoir détecté et internalisé des antigènes que la iDC va rentrer dans un processus de maturation afin de devenir une mDC (voir partie II.3. Maturation des cellules dendritiques). Pendant cette étape cruciale de la biologie de la DC, les antigènes ainsi capturés sont préparés sous forme de peptides antigéniques, ils sont ensuite chargés au niveau des molécules du CMH formant ainsi un complexe CMH/peptide. Ce complexe sera reconnu par un lymphocyte T naïf spécifique, via le TCR associé à un co-récepteur le CD3. La séquence peptidique présentée par la molécule du CMH est aussi appelée épitope et correspond à une séquence particulière reconnue par le TCR au niveau de son paratope. L'épitope et le paratope sont complémentaires et variables, ainsi seul un LT spécifique sera capable de reconnaître le complexe CMH/peptide. On parle alors de réponse immunitaire spécifique de l'antigène ainsi présenté. La liaison CMH/peptide - TCR est le premier signal d'activation des LT afin d'induire une réponse immunitaire adaptative spécifique (Solano-Gálvez et al. 2018).

Grâce à leur grande capacité à réaliser la fonction de présentation antigénique, les DCs sont considérées comme des CPAs professionnelles (Schmid et al. 2007).

(1) Les molécules du CMH

Les molécules du CMH sont des molécules transmembranaires, synthétisées dans le réticulum endoplasmique (ou RE), puis généralement localisées au niveau de la membrane du RE, mais aussi au niveau des compartiments endo/lysosomaux et phago/lysosomaux. Il existe

deux molécules du CMH codées par les gènes HLA : le CMH de classe I (ou CMH-I) et le CMH de classe II (ou CMH-II). (Figure 19)

(a) Les molécules du CMH-I

Le CMH-I se compose de quatre sous-unités : 3 sous-unités α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) qui forment la chaîne lourde, ainsi qu'une sous-unité β ($\beta 2$ -microglobulin ou $\beta 2m$) qui forme la chaîne légère. Les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la chaîne lourde forment un sillon peptidique au niveau duquel sera fixé un peptide antigénique court, d'environ 8 à 10 acides aminés. La sous-unité $\alpha 3$ permet un ancrage à la membrane du RE. La chaîne légère permet la stabilisation du complexe CMH/peptide (Wieczorek et al. 2017). Lors de la synthèse des sous-unités qui forme le CMH-I, les sous-unités α sont stabilisées par la calnexine, qui est remplacé ensuite par la sous-unité $\beta 2m$. Le CMH-I ainsi formé est associé à la tapasine et la calréticuline pour maintenir sa structure. (Figure 19) Il existe 3 gènes qui codent pour les sous-unités du CMH-I, les gènes HLA-A, B et C.

Le CMH-I est présent à la surface de toutes les cellules nucléées. Il est intéressant de noter que dans les DCs, des structures appelées DALIS (pour Dendritic cell Aggregosome-Like Structures), sont riches en molécules du CMH-I et régulent leur translocation à la membrane plasmique (Lelouard et al. 2002 ; Pierre. 2005). On parle de présentation d'antigènes « classiques » lorsque des antigènes intracellulaires, comme des protéines virales ou bactériennes, sont présentées par le CMH-I (Hulpke et Tampé. 2013 ; Döring et al. 2019). La présentation dite croisée (ou cross-presentation en anglais) fait référence à la présentation d'antigènes extracellulaires, comme des cellules infectées, ou des cellules tumorales, par le CMH-I (Mellman et Steinman. 2001 ; Montfoort et al. 2014 ; Wieczorek et al. 2017). Le CMH-I interagit avec le CD8 exprimé à la surface des LT.

(b) Les molécules du CMH-II

Le CMH-II se compose aussi de quatre sous-unités : 2 sous-unités α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et 2 sous-unités β ($\beta 1$ et $\beta 2$). Les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment un sillon peptidique au niveau duquel sera fixé un peptide antigénique long, d'environ 12 à 24 acides aminés. Les sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 2$ permettent un ancrage à la membrane du RE (Wieczorek et al. 2017). Il existe 3 gènes qui codent pour les sous-unités du CMH-II, les gènes HLA-DP, DQ et DR. Après sa synthèse, le CMH-II est localisé au niveau de la membrane du RE où elle est directement associée à une protéine accessoire, ou chaîne invariante, Ii au niveau des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$, formant un complexe CMH-II/Ii (Roche et Cresswell. 1990). Cette protéine prévient la fixation de peptides mal-conformés, présents dans le RE, au niveau du sillon peptidique. Ii régule aussi le transport des

molécules du CMH-II dans les différents compartiments vésiculaires avant d'être exocyté à la membrane plasmique (Wieczorek et al. 2017). (Figure 19)

Le CMH-II est exprimé par toutes les cellules capables de faire de la présentation antigénique, ou CPA, comme les macrophages, les monocytes, les lymphocytes B, ou encore les cellules dendritiques. Il permet de présenter majoritairement des antigènes extracellulaires (Mellman et Steinman. 2001 ; Wieczorek et al. 2017 ; Hilligan et Ronchese. 2020). De manière intéressante, en absence de signal de danger, les iDCs présentent à leur surface quelques complexes CMH-II/peptide, dont les peptides sont issus du « soi » et permettent d'induire de la tolérance immunitaire. Le CMH-II interagit avec le CD4 exprimé à la surface des LT.

(2) Présentation des antigènes par le CMH-I

(a) Présentation classique des antigènes intracellulaires

Dans les DCs, les antigènes intracellulaires sont ubiquitinylés pour être adressés et digérés par le protéasome. A l'issue de cette dégradation, des peptides linéaires sont libérés dans le cytosol, puis transloqués à travers la membrane du RE par un transporteur TAP (pour Transporter associated with Antigen Processing), de manière dépendante de l'ATP. TAP est composé de deux sous-unités TAP-1 et TAP-2, qui contrôlent la taille des peptides transloqués (Koopmann et al. 1996 ; Döring et al. 2019). Si les peptides sont trop longs, ils ne pourront alors pas se fixer au niveau de la molécule du CMH-I. Ils sont donc pris en charge par l'aminopeptidase ERAAP (pour ER Aminopeptidase associated with Antigen Processing) qui les raccourcit en une longueur d'environ 8 à 10 acides aminés (Koopmann et al. 1996 ; Wieczorek et al. 2017). Les peptides, dont la taille est correcte, sont fixés au niveau du sillon peptidique formé par les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du CMH-I. Une fois le complexe CMH-I/peptide formé, celui-ci quitte la membrane du RE par bourgeonnement pour gagner le golgi, où il est ensuite exocyté à la surface de la DC (Hulpke et Tampé. 2013). Une fois à la membrane plasmique, le complexe CMH-I/peptide est reconnu par le TCR et son co-récepteur le CD3 exprimé à la surface des lymphocytes T CD8⁺ naïfs. La fixation entre le TCR et le complexe CMH-I/peptide est renforcé par la fixation du CD8 avec la sous-unité $\alpha 3$ du CMH-I (Hulpke et Tampé. 2013 ; Döring et al. 2019). La présentation antigénique permet d'activer un lymphocyte T CD8⁺ naïf spécifique et de le différencier en LT CD8 effecteur ou LT cytotoxique spécifique de l'antigène. (Figure 19)

(b) Présentation croisée des antigènes extracellulaires

La présentation croisée correspond à la présentation d'antigènes extracellulaires, telles que les cellules infectées ou encore les cellules tumorales (Jongbloed et al. 2010 ; Joffre et al. 2012 ; Nizzoli et al. 2013 ; Segura et al. 2013), mais aussi certains virus (Heath et Carbone. 2001 ; Di Pucchio et al. 2008), par les molécules du CMH-I afin d'engendrer une réponse T

cytotoxique. Les DCs sont les seules CPA capables de faire de la présentation croisée d'antigènes. On distingue deux voies de trafic des antigènes extracellulaires vers une présentation croisée : la voie cytosolique et la voie vacuolaire. (Figure 19)

On parle de voie cytosolique lorsque les antigènes extracellulaires capturés sont déversés dans le cytosol, puis adressés au protéasome pour y être digérés (Segura et al. 2013). Les peptides ainsi générés sont transloqués vers le RE grâce au transporteur TAP, afin de regagner la voie classique de présentation des antigènes par les molécules du CMH-I (Joffre et al. 2012). Cependant, il est possible que certains peptides soient transloqués dans des phagosomes grâce à des transporteurs spécifiques. Une fois dans ces vésicules, ce sont les aminopeptidases ERAP-1 (pour ER-associated AminoPeptidase 1) et IRAP (pour endosomal InsulinResponsive AminoPeptidase) qui vont permettre le chargement des peptides au niveau du sillon peptidique du CMH-I (Joffre et al. 2012). Cette voie cytosolique est dite « sensible aux inhibiteurs du protéasome », puisque les peptides ainsi générés sont dépendants d'une dégradation par le protéasome. Ainsi, les DCs régulent particulièrement le bon fonctionnement du protéasome, passant notamment par un contrôle du pH (Segura et al. 2013). (Figure 19)

On parle de voie vacuolaire lorsque les antigènes extracellulaires capturés sont transloqués au niveau du compartiment endo/lysosomal, pour y être dégradés. Les peptides ainsi générés sont chargés directement sur les molécules du CMH-I, présentes au niveau de la membrane du compartiment. Contrairement à la voie cytosolique, la présentation croisée passant par la voie vacuolaire est dite « résistante aux inhibiteurs du protéasome ». En revanche, cette voie est sensible aux inhibiteurs de protéases lysosomales (en particulier les inhibiteurs de cathepsines) (Joffre et al. 2012 ; Tang-Huau et al. 2018). (Figure 19)

Il est intéressant de noter que seulement certains sous-types de DCs humaines sont capables de faire de la présentation croisée, à savoir les pDCs, les cellules de Langerhans, les DDC CD1a⁺ et les cDC-1 (voir partie II.5. Les sous-types de cellules dendritiques humaines).

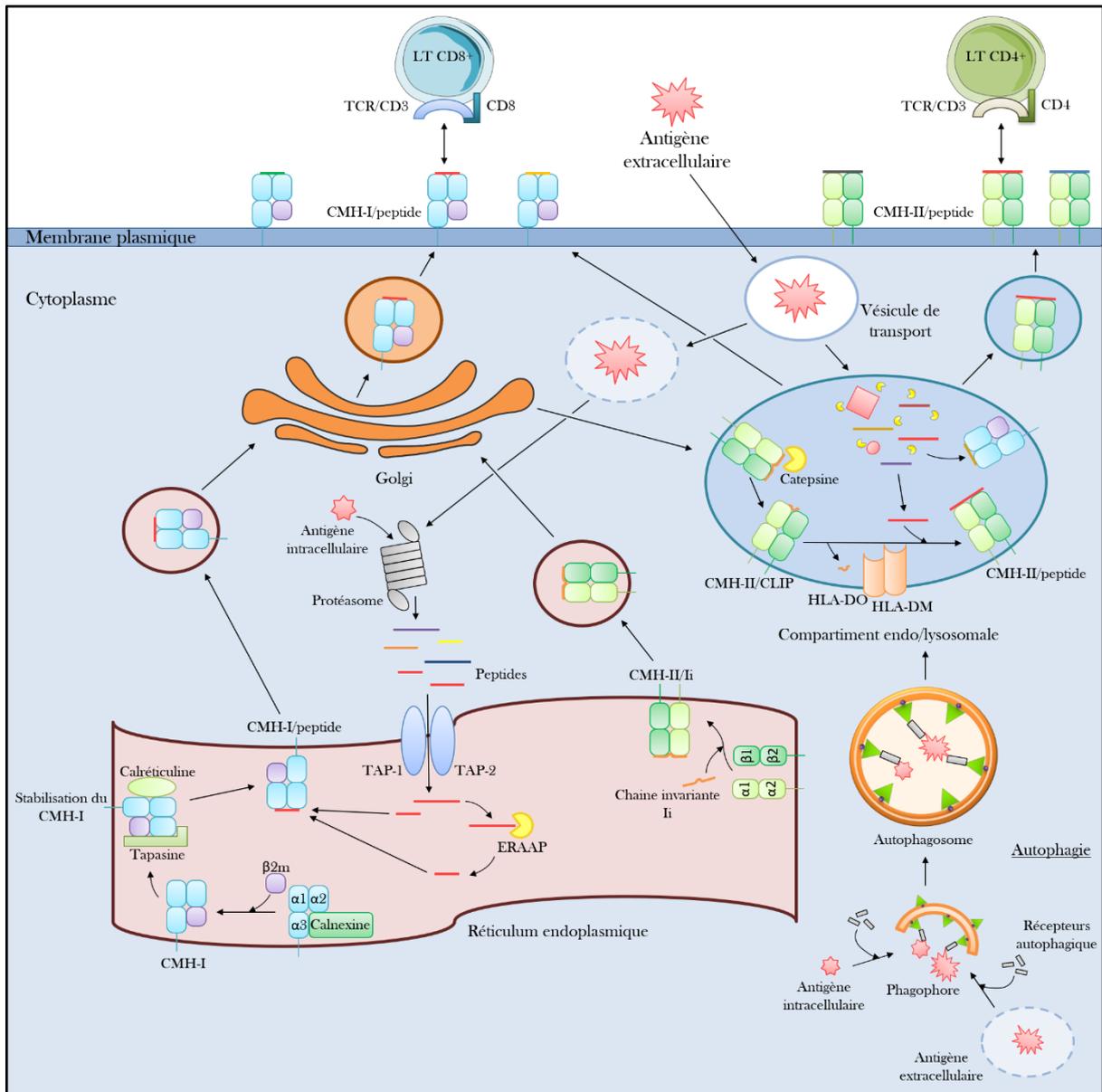


Figure 19 : Apprêtement des antigènes pour la présentation antigénique

Il existe deux molécules du CMH, les CMH-I et CMH-II, dont la synthèse et la stabilisation se fait dans le réticulum endoplasmique (RE). Par la suite, les complexes CMH-II/Ii, ainsi que certaines molécules CMH-I sont acheminés vers le compartiment endo/lysosomal (ou compartiment multivésiculaire), alors que le reste des molécules de CMH-I reste dans le RE. L'apprêtement des peptides antigéniques d'origine intracellulaire se déroule classiquement dans le RE au niveau des molécules du CMH-I, alors que l'apprêtement des peptides antigéniques d'origine extracellulaire se déroule classiquement dans le compartiment endo/lysosomal au niveau des molécules du CMH-II. On parle de présentation croisée lorsque les antigènes extracellulaires sont chargés au niveau du CMH-I dans le RE, de même que certains antigènes intracellulaires peuvent être chargés au niveau du CMH-II dans le compartiment endo/lysosomal. L'autophagie participe à la genèse de nouveaux peptides antigéniques qui seront apprêtés sur les molécules du CMH dans le compartiment endo/lysosomal.

(3) Présentation des antigènes par le CMH-II

(a) Présentation classique des antigènes extracellulaires

Le complexe CMH-II/Ii formé dans le RE est endocyté de manière clathrine-dépendante et transloqué vers les endosomes tardifs, ou bien le compartiment endo/lysosomale, où sont localisés des peptides antigéniques issus de la dégradation des antigènes extracellulaires. Au sein de ces vésicules, la chaîne variante Ii est clivée par des cathepsines (cathepsine S, L et F), ne laissant qu'un fragment de quelques acides aminés, appelée peptide CLIP (pour Class II-associated I chain Peptides). CLIP est ensuite échangé avec un peptide antigénique de plus haute affinité, d'environ 12 à 24 acides aminés, par la molécule HLA-DM formant ainsi le complexe CMH-II/peptide. Il est intéressant de noter que l'activité de la molécule HLA-DM semble être régulée par HLA-DO (Weber et al. 1996 ; Denzin et al. 2005 ; Roche et Furuta. 2015). La fusion entre la membrane plasmique et la membrane des endosomes tardifs, ou du compartiment endo/lysosomale, permet de localiser le complexe CMH-II/peptide à la surface des DCs. Une fois à la membrane plasmique, le complexe CMH-II/peptide est reconnu par le TCR et son co-récepteur le CD3 exprimé à la surface des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. La fixation entre le TCR et le complexe CMH-II/peptide est renforcé par la fixation du CD4 avec la sous-unité β 2 du CMH-II. La présentation antigénique permet ainsi d'activer un lymphocyte T CD4⁺ naïf spécifique et de le différencier en LT CD4 effecteur spécifique de l'antigène. (Figure 19)

(b) Présentation des antigènes intracellulaires

Bien qu'il soit généralement décrit que le rôle des molécules du CMH-II est de présenter des antigènes d'origine extracellulaire, il existe quelques travaux qui montrent la présentation d'antigènes d'origine intracellulaire dans des DCs humaines (Dörfel et al. 2005 ; Romao et al. 2013 ; Coulon et al. 2016 ; Münz. 2016). Ces antigènes peuvent être d'origine virale, comme des particules du virus VIH (Coulon et al. 2016), ou bien d'origine endogène, comme des antigènes tumoraux (Dörfel et al. 2005), ou encore d'origine fongique, comme le champignon *C.albicans* (Romao et al. 2013). Cependant, les voies qui permettent aux DC humaines de présenter ces antigènes sont mal décrites à ce jour.

(4) Rôle de l'autophagie dans la présentation antigénique

Le processus autophagique est un processus catabolique utilisant la machinerie du lysosome afin de dégrader des composants cytosoliques, tels que des pathogènes par xénophagie. A l'issue de cette dégradation de nombreux peptides antigéniques peuvent ainsi être générés et connectés au réseau de présentation des antigènes. Ainsi l'autophagie participe à la diversification des antigènes produit dans la DC ce qui facilite l'élaboration de diverses réponses immunitaires adaptatives (Valečka et al. 2018). (Figure 19)

(a) Rôle de l'autophagie dans la présentation des antigènes par le CMH-I

Au regard de ces fonctions, l'autophagie permet, entre autres, d'éliminer des agrégats protéiques, par agréphagie. Dans les DCs humaines, ces agrégats s'accumulent et forment notamment des DALIS (Lelouard et al. 2002 ; Pierre. 2005 ; Montagna et al. 2017). Ces agrégats cytoplasmiques sont alors poly-ubiquitinylés avant d'être sélectivement dégradés par autophagie. En effet, il a été montré que le récepteur autophagique p62 est concentré au niveau des DALIS (Mintern et al. 2015). Le ciblage de ces structures par autophagie, augmente la diversité des antigènes ainsi générés, puis présentés par les molécules du CMH-I (Pierre. 2005 ; Montagna et al. 2017).

L'autophagie peut promouvoir directement la présentation d'antigènes viraux par les molécules du CMH-I, et de manière indépendante du transporteur TAP (Tey et Khanna. 2012 ; Münz. 2016). En effet, Tey et Khanna montrent que des peptides viraux néosynthétisés dans des MoDCs humaines sont transportés spécifiquement vers les autophagosomes et dégradés via les protéases lysosomales (incluant les cathepsines A et G). Les peptides ainsi générés sont chargés sur les molécules du CMH-I et présentés à la surface des DCs (Tey et Khanna. 2012). De plus une autre étude suggère l'importance de l'autophagie dans la présentation croisée d'antigènes viraux, activant efficacement la réponse T CD8+ (Uhl et al. 2009). C'est en 2015 que l'équipe de Mintern démontre finalement que la présentation croisée dans des DCs humaines, mais aussi murines, peut être dépendante de l'autophagie selon la nature de l'antigène. En effet, ils démontrent qu'un défaut d'autophagie, via la délétion d'ATG7, diminue la présentation croisée d'antigènes solubles uniquement (Mintern et al. 2015).

En conclusion, l'autophagie participe à la présentation antigénique classique par les molécules du CMH-I, étant particulièrement impliquée dans la présentation d'antigènes viraux. En revanche, c'est la nature des antigènes détectés qui semble réguler l'implication de l'autophagie dans la présentation croisée.

(b) Rôle de l'autophagie dans la présentation des antigènes par le CMH-II

La machinerie autophagique est impliquée dans la présentation d'antigènes via le CMH-II grâce au processus de phagocytose associé à la protéine LC3. En effet, l'équipe de Romao a montré que des phagosomes associés à LC3, dans des MoDCs humaines, sont concentrés en antigènes d'origine fongique, facilitant leur apprêtage et la formation des complexes CMH-II/peptide (Romao et al. 2013).

Au regard de ces fonctions de dégradation l'autophagie participe directement à la préparation des peptides antigéniques afin d'être présentés par les molécules du CMH-II. En

effet, l'équipe de Dörfel montre l'implication de l'autophagie dans la présentation d'antigènes tumoraux via les molécules du CMH-II par des DC humaines. L'utilisation d'inhibiteurs autophagiques, telles que la 3-MA ou la wortmannin, réduisent la présentation de l'antigène tumoral MUC1 au LT CD4+ (Dörfel et al. 2005). De plus, divers antigènes issus de pathogènes peuvent être présentés par les molécules du CMH-II issues d'une dégradation par xénophagie. En effet, le ciblage de particules virales au niveau d'autophagosomes favorise leur présentation via le CMH-II dans des MoDCs humaines (Schmid et al. 2007 ; Coulon et al. 2016). Pour finir, les équipes de Cooney et Strisciuglio démontrent l'importance du récepteur NOD-2 et de la protéine autophagique ATG16L1 dans la réponse antibactérienne. La reconnaissance de peptides bactériens par NOD-2 induit l'activation d'autophagie dans des MoDCs humaines. Cette autophagie induite est dépendante des protéines autophagiques ATG5, ATG7 et ATG16L1. De plus, elle permet d'apprêter et de présenter les antigènes bactériens via le CMH-II (Cooney et al. 2010 ; Strisciuglio et al. 2013). Par ailleurs, ces études montrent qu'un blocage de l'autophagie entraîne un défaut de préparation des antigènes, et en conséquence, une perturbation de la présentation antigénique dans ces cellules. De plus, les gènes qui codent pour NOD-2 et ATG16L1 sont des gènes de susceptibilité à la maladie de Crohn. Chez les patients porteurs de ces mutations, les DCs analysées présentent une réduction de leur capacité de présentation des antigènes par le CMH-II, associé à un défaut de trafic des antigènes bactériens (voir partie III. Maladie de Crohn et polymorphismes autophagiques).

Pour conclure, il est évident que l'autophagie participe à la présentation antigénique par les molécules du CMH-II, en favorisant un apport riche en peptides antigéniques au niveau des compartiments phago/lysosomaux riches en CMH-II. On peut facilement envisager d'utiliser l'autophagie afin de faciliter et d'optimiser la présentation d'antigènes nouveaux pour stimuler une réponse immunitaire adaptative contre ces néo-antigènes, à des fins de lutte anti-tumorale, ou anti-microbienne.

b) Activation et polarisation des lymphocytes T

Les DCs expriment des marqueurs de surface capables de moduler l'activation des lymphocytes T naïfs, appelés molécules de co-stimulation. Ces molécules donneront le « signal 2 » nécessaire à l'activation du LT. De plus, les DCs sécrètent de nombreuses cytokines qui pourront polariser les LT afin d'orienter la réponse immunitaire. La détection de ces médiateurs chimiques par les LT correspond au « signal 3 » donné par la DC (Verboogen et al. 2016). Une fois pleinement activé, le LT va subir une expansion clonale afin de multiplier le nombre de LT capables de reconnaître le peptide antigénique (Adams et al. 2020). (Figure 20)

(1) Les molécules de costimulation

Les molécules de costimulation sont des molécules de surface qui fonctionnent par contacts cellulaires directs : liaison entre un récepteur et son ligand. Cette liaison entraîne une transduction de signal activateur ou inhibiteur à la cellule T. Les DCs expriment deux grandes familles de molécules de co-stimulation : la famille des B7 et la famille des récepteurs du TNF (Hubo et al. 2013).

(a) La famille des B7

Les molécules de la famille des B7 sont des protéines qui sont pour la plupart transmembranaires, ou simplement reliées à la membrane plasmique par un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Elles sont composées de deux domaines extracellulaires d'immunoglobulines IgV et IgC, qui permettent les interactions protéine-protéine. La famille des B7 se compose de nombreux membres, dont les 7 principaux sont : B7.1 (ou CD80), B7.2 (ou CD86), B7.H2 (ou ICOS-L), B7.H1 (ou PD-L1), B7-DC (ou PD-L2), B7-H3 et B7-H4 (Collins et al. 2005 ; Hubo et al. 2013).

Les récepteurs CD80 et CD86 sont les molécules de co-stimulation les plus décrites à ce jour, mais aussi les plus importantes pour induire une activation du LT. Elles peuvent interagir soit avec le CD28, donnant ainsi un signal d'activation au LT, soit avec le CTLA-4 (pour Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4) donnant alors un signal inhibiteur au LT (Collins et al. 2005). Il est intéressant de noter que l'interaction CD80/86 avec CD28 stimule la sécrétion de cytokines dans les LT, dont l'IL-2, afin de favoriser leur prolifération (Hubo et al. 2013).

Le ligand ICOS-L est reconnu par le récepteur ICOS (pour Inducible T-cell COStimulator) qui est exprimé par le LT, et dont la stimulation régule la prolifération et la survie de la cellule T. La liaison entre ICOS-L et ICOS favorise aussi l'activation et la différenciation du LT vers une réponse de type T régulatrice, associé à une production de cytokines immunosuppressives l'IL-10 (Jonuleit et al. 2000 ; Ito et al. 2007).

Les ligands PD-L1 et PD-L2 (pour Programed cell Death-Ligand 1/2) sont reconnus par le récepteur PD-1 qui est exprimé par les LT. La stimulation du récepteur PD-1 permet de réguler négativement les LT. La liaison de PD-1 avec l'un de ces ligands transduit un signal de mort par apoptose dans le LT (Chemnitz et al. 2004 ; Keir et al. 2008).

Le ligand B7-H3 est reconnu par un récepteur encore inconnu au niveau du LT et dont les fonctions sont encore mal connues, bien qu'il semblerait que la liaison du ligand à ce récepteur transduise des signaux à la fois immunostimulateurs et immunosuppresseurs dans le LT (Chapoval et al. 2001).

Le ligand B7-H4 est le seul membre de la famille B7 à posséder une liaison à la membrane plasmique des DCs via un glycosylphosphatidylinositol (GPI). BTLA (pour B and T Lymphocyte Attenuator) a été proposé comme récepteur exprimé par les LT de ce ligand. L'interaction entre B7-H4 et BTLA semble transduire un signal immunosuppresseur dans le LT, inhibant la sécrétion de cytokines et la prolifération de la cellule T (Sica et al. 2003 ; MacGregor et Ohashi. 2017).

(b) La famille des récepteurs du TNF

Nous avons déjà défini la famille des récepteurs aux TNFs dans le paragraphe 2.c.(1.1.2.). Pour rappel, c'est une vaste famille de récepteurs transmembranaires. Deux membres sont principalement décrits pour leur fonctions immunostimulatrices lors de la présentation antigénique : CD40 et OX40L (ou TNFRSF4) (Hubo et al. 2013).

Le récepteur CD40 reconnaît le CD40L exprimé par les LT. La fixation du ligand à son récepteur stimule le lymphocyte et induit la sécrétion de cytokines, dont l'IL-2, qui favorise la prolifération du LT (Cella et al. 1996 ; McLellan et al. 1996 ; Hubo et al. 2013).

Le ligand OX40L est reconnu par le récepteur OX40 au niveau du LT, transduisant des signaux de survie et d'activation au LT. De manière intéressante, ce ligand est capable d'induire une réponse tolérogène (activation de LT régulateur) ou immunogène (activation de LT de type Th1 ou Th2) (Ohshima et al. 1997 ; Hubo et al. 2013).

(2) Différenciation et polarisation des lymphocytes T

Le troisième signal d'activation des LT est donné par des cytokines pro- ou anti-inflammatoires qui sont sécrétées par la DC après maturation (voir partie II.3.d. Sécrétion de médiateurs chimiques immunitaires). La reconnaissance de ces médiateurs chimiques induit une amplification du signal d'activation donné par « les signaux 1 et 2 », aboutissant à la différenciation de la cellule T naïve en cellule T effectrice, associé à une prolifération du LT activé et une amélioration de sa survie (Steinman et Hemmi. 2006 ; Hilligan et Ronchese. 2020) (Figure 20). Lors de la présentation antigénique, les DC peuvent activer deux types de lymphocytes T : les LT CD4+ naïfs, ou les LT CD8+ naïfs.

(a) Génération de lymphocytes T auxiliaires et régulateurs

On distingue deux types de lymphocytes T CD4+ effecteurs : les LT auxiliaires (ou LT helper, LTh) et les LT régulateurs (ou LTreg). La fonction globale des LT auxiliaires est de recruter et d'activer des cellules de l'immunité innée, comme les macrophages ou encore les lymphocytes NK (pour Natural Killer, ou NK), et adaptative, comme les lymphocytes B ou LT CD8+. Les LT régulateurs, quant à eux, ont des fonctions immunosuppressives. Chaque groupe

de LT CD4⁺ est composé de différents membres ayant diverses fonctions immunitaires qui leur sont propres (**Lanzavecchia et Sallusto. 2001 ; Hilligan et Ronchese. 2020**). C'est lors de la présentation antigénique que la DC va sécréter un panel de cytokines qui oriente la différenciation du LT CD4⁺ vers un profil particulier de LTh ou encore de LTreg (**Lanzavecchia et Sallusto. 2001 ; Steinman et Hemmi. 2006**). Il est intéressant de noter que c'est la nature de l'antigène qui détermine la composition du panel de cytokines sécrétées par la DC. (**Figure 20**)

(i) Les lymphocytes T auxiliaires

La réponse Th1 est induite par la sécrétion d'IL-12, IL-27, CXCL-9, CXCL-10 et IFN- α par la DC, qui active les facteurs de transcription STAT-4 et Tbet (**Mullen et al. 2001 ; Leal Rojas et al. 2017**). Les LT différenciés en Th1 participent à la réponse anti-infectieuse et anti-tumorale. Pour cela, elles vont notamment sécréter une grande quantité d'IFN- α , mais aussi recruter et activer des macrophages, les NK et les LT CD8⁺ au site infectieux. On parle alors de réponse immunitaire à médiation cellulaire (**Kadowaki. 2007 ; Leal Rojas et al. 2017**). Il est intéressant de noter que d'autres cellules immunitaires peuvent influencer les DCs lors de l'activation de réponses T de type Th1. En effet, c'est le cas des NKs qui interagissent avec les DCs pour potentialiser la réponse Th1, entre autres via la sécrétion d'INF- γ (**Hilligan et Ronchese .2020**). (**Figure 20**)

Les LT se différencient en Th2 en réponse à la sécrétion de CCL17 et CCL22 associé au signal OX40/OX40L par la DC, qui active les facteurs de transcription STAT-6 et GATA-3 (**Tanaka et al. 2000**). La réponse Th2 est une réponse à médiation humorale, induisant la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B en réponse à une infection parasitaire ou à de l'allergie (**Kadowaki. 2007**). De la même manière que pour la réponse Th1, les DCs peuvent être potentialisées afin de générer une réponse T de type Th2 grâce à diverses cytokines issue de leur environnement, telle que la TSLP (pour Thymic Stromal LymphoPoietin) produit par diverses cellules, ou encore l'IL-4 produit par les basophiles ou d'autres LT Th1/Th2 préalablement activés (**Hilligan et Ronchese .2020**). (**Figure 20**)

Il est intéressant de noter que les réponses Th1 et Th2 sont antagonistes (**Delespesse et al. 1997 ; Spellberg et Edwards. 2001**) et régulées notamment par le temps de contact entre la DC et le LT.

La réponse Th17 est induite en réponse à la sécrétion d'IL-6, IL-23 et TGF- β par la DC, qui active les facteurs de transcription STAT-3 et ROR γ t (**Guglani et Khader. 2010**). La réponse Th17 prend place en réponse aux infections de pathogènes extracellulaires, telles que des

bactéries ou des champignons. Pour cela, les LT de type Th17 vont sécréter de l'IL-17, mais aussi recruter et activer des neutrophiles et des macrophages (Kadowaki. 2007 ; Guglani et Khader. 2010 ; Leal Rojas et al. 2017). Il a été décrit que certains fibroblastes peuvent stimuler les DCs à produire de l'IL-23 favorisant la polarisation des LT vers un profil Th17 (Hilligan et Ronchese .2020). (Figure 20)

Les LT se différencient en Tfh (pour follicular helper) en réponse à la sécrétion d'IL-6 associé au signal ICOS/ICOSL par la DC, qui active le facteur de transcription BCL-6 (Schmitt et al. 2014). Les Tfh sont localisés au niveau des OLS dans la zone B et favorisent la formation du centre germinatif (activation des lymphocytes B) (Leal Rojas et al. 2017 ; Qin et al. 2018). (Figure 20)

(ii) Les lymphocytes T régulateurs

Il existe différents sous-types de LT régulateurs : les nTregs (pour T régulateurs naturels) sont développés et localisés dans le thymus, et les iTregs (pour T régulateurs induits) sont localisés dans la périphérie. Les nTregs sont caractérisés par l'expression du marqueur CD25 et du facteur de transcription FOXP3. La différenciation des iTregs est dépendante de la sécrétion de TGF- β , IL-2 et d'IL-10 par les DCs. On distingue les Tregs qui sont « au repos », exprimant le marqueur CD45RA et faiblement le facteur FOXP3, des Tregs « activés » qui expriment faiblement CD45RA et fortement FOXP3 (Miyara et al. 2009). Ces lymphocytes ont des fonctions immuno-régulatrices, qui passent notamment par la sécrétion d'IL-10, et qui permettent de maintenir de la tolérance immunitaire, mais aussi de réduire l'inflammation au sein d'un tissu (Kushwah et Hu 2011 ; Josefowicz et al. 2012).

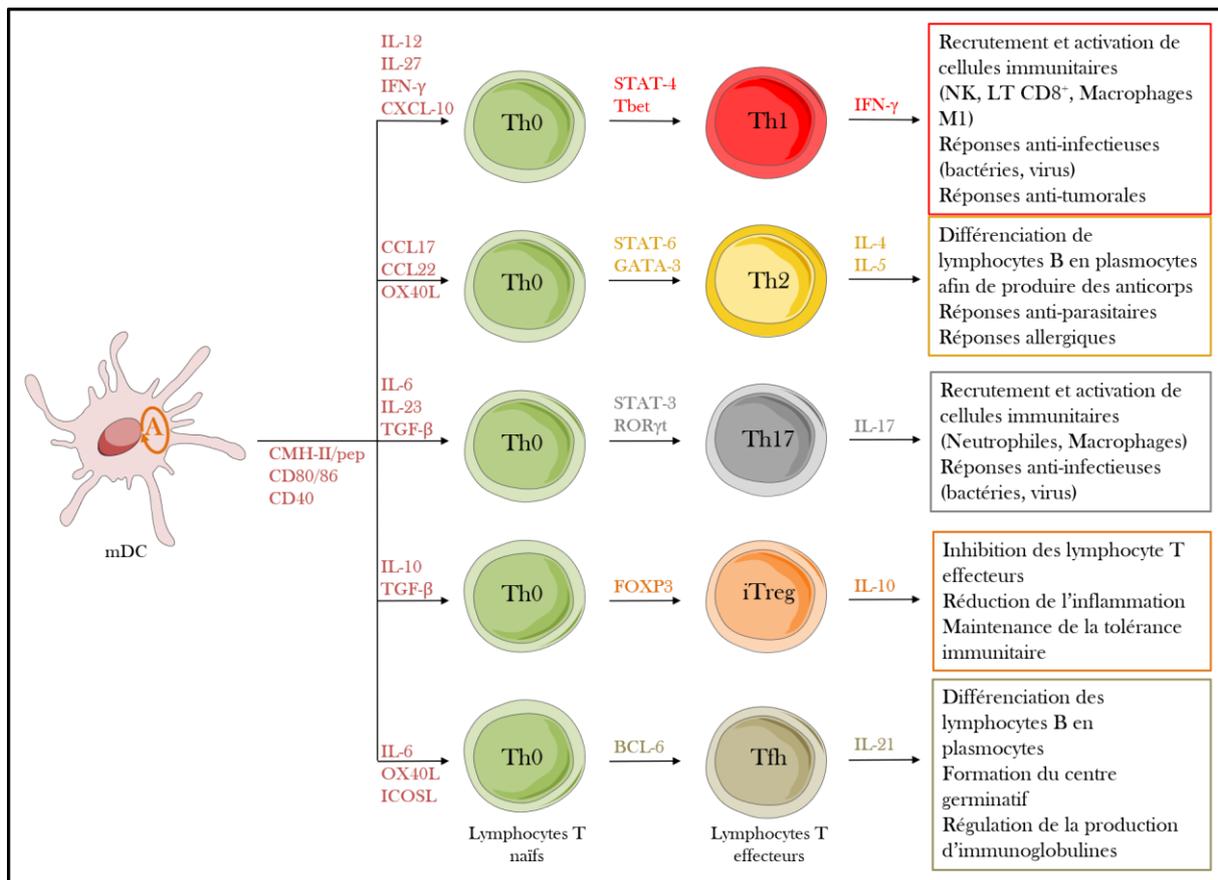


Figure 20 : Activation et polarisation des lymphocytes T CD4+

La fonction principale des DCs matures est d'engendrer une réponse immunitaire adaptative spécifique de l'antigène. C'est lors de la présentation antigénique que les DCs vont alors activer et polariser les lymphocytes T (LTs) CD4+ naïfs en LTs CD4+ effecteurs. Pour cela, un complexe CMH-II/peptide sera reconnu par un TCR/CD3 spécifique exprimé par un LT, activant alors ce lymphocyte. Ce signal est associé à l'interaction entre des molécules de costimulations activatrices, telles que le CD80/86 de la DC et le CD26 du LT, permettant d'activer pleinement le LT. La sécrétion d'un panel de cytokines spécifiques par la DC, permet de polariser le LT naïf vers un type de LT effecteur. A son tour le LT effecteur produit des cytokines spécifiques ayant des fonctionnalités particulières, comme l'IFN- δ impliqué dans la lutte antimicrobienne. L'autophagie (A) dans la DC régule à la fois la stabilisation de la synapse immunologique et la sécrétion de cytokines contrôlant, ainsi, l'orientation de la réponse immunitaire adaptative spécifiquement dirigé contre un antigène.

(b) Génération de lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T CD8+ effecteurs (ou LT cytotoxiques) sont des cellules spécialisées dans l'élimination directe des cellules exprimant un complexe CMH-I/peptide pour lequel ils sont spécifiques, comme des cellules infectées, ou encore cellules tumorales (Michiels et al. 2006 ; Bachem et al. 2010 ; Pufnock et al. 2011 ; Demers et al. 2013). Pour ce faire, lors de la présentation antigénique médié par la DC, celle-ci va présenter un complexe CMH-I/peptide qui sera reconnu par le TCR/CD3 associé au CD8 par le LT CD8+ naïf. Ce signal est associé aux signaux de co-stimulation apportés tout d'abord par l'interaction entre le CD80/CD86 et le CD28, puis CD40L-CD40, par la DC (Michiels et al. 2006 ; Pufnock et al. 2011). Il est intéressant

de noter que les LT auxiliaires participent à l'activation des LT CD8⁺. En effet, le LTh peut stimuler d'avantage la DC via l'interaction entre le CD40L et le CD40, ainsi que le LT CD8⁺ lui-même (Bevan. 2004). Pour pleinement activer ce LT, la DC va sécréter des cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-12 et des molécules interférons de type I (IFN- α et β) (Michiels et al. 2006 ; Pufnock et al. 2011 ; Lemoine et al. 2010). Les signaux donnés par ces médiateurs chimiques vont permettre une amplification du signal d'activation donné par la DC et une prolifération des LT CD8⁺ spécifique de l'antigène présenté. Une fois activé, le LT cytotoxique peut déclencher de l'apoptose dans la cellule cible via l'utilisation de différentes voies : la sécrétion de cytokines pro-apoptotiques comme le TNF- α , la sécrétion de perforine et granzymes, et enfin l'activation de la voie FAS via l'expression du ligand FASL (Henkart. 1994 ; Demers et al. 2013).

(3) Régulation de l'activation et de la polarisation des LT par autophagie dans les DCs

De nombreuses études démontrent le rôle de l'autophagie dans les différentes fonctions de la DC humaine, en particulier dans la réponse immunitaire innée. L'autophagie intervient dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative, en régulant tout d'abord le processus de maturation dans la DC afin qu'elle acquière la capacité à activer et polariser les LT naïfs en LT effecteurs spécifiques. Un défaut d'autophagie dans les DCs conduit à un défaut de détection des signaux de danger et de capture des antigènes, de maturation (voir partie II.2.a/b et II.3.b/c/d), mais aussi de présentation d'antigènes aux LT et de sécrétion de cytokines. Par conséquent, cela affecte l'activation, la différenciation et la polarisation des LT par les DC. Plusieurs études montrent en effet qu'un défaut de présentation d'antigène est associé à un défaut d'activation des LT CD4⁺ (Dörfel et al. 2005 ; Schmid et al. 2007 ; Cooney et al. 2010 ; Coulon et al. 2016). De manière intéressante, une étude démontre que la mutation des récepteurs NOD dans des DC humaines réduit leur capacité de reconnaissance de la bactérie *S. enterica*, associé à un défaut d'activation d'autophagie (Cooney et al. 2010a). Dans cette étude, les DCs mutées pour les récepteurs NOD, mais aussi pour la protéine autophagique ATG16L1 sont incapables d'engendrer une réponse T CD4⁺. De plus, d'autres équipes montrent une réduction de l'activation de LT co-cultivés avec des DC humaines préalablement traitées avec un inhibiteur autophagique pharmacologique, la 3-MA et chargées en peptides antigéniques d'origine virale (Coulon et al. 2016) ou tumorale (Dörfel et al. 2005). L'inhibition d'autophagie dans ces DCs humaines est associée à un défaut de présentation des antigènes, qui a pour conséquence un défaut d'activation des LT CD4⁺ (Dörfel et al. 2005 ; Schmid et al. 2007 ; Coulon et al. 2016). Il

semblerait donc que l'autophagie soit nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire adaptative en contexte inflammatoire.

Par ailleurs, des études se sont intéressées à l'importance de l'autophagie dans un contexte non-inflammatoire. Il est décrit qu'à l'état basal, les DCs peuvent sécréter de l'IL-10 pour maintenir la tolérance immunitaire au sein des tissus, favorisant notamment l'activation de LT régulateurs. Or, l'inhibition du processus autophagique par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, ou via la mutation de la protéine ATG16L1, dans des DCs humaines, est associée à une réduction de leur sécrétion d'IL-10 et de cytokines anti-inflammatoires. Par conséquent, cela engendre une augmentation de la prolifération des LT (ayant un profil inflammatoire) co-cultivés avec ces DCs (**Strisciuglio et al. 2013**). L'autophagie semble donc nécessaire à la maintenance de la tolérance immunitaire par les DC, à l'état basal dans les tissus. Pour finir, il a été montré que l'autophagie régule la polarisation des LT via le contrôle de la formation et de la stabilisation de la synapse immunologique. En effet, lors du contact cellulaire entre la DC et le LT, un dense réseau d'actine se met en place afin de contrôler cette interaction. Ce réseau est régulé par le processus autophagique qui contrôle la formation du filament d'actine de manière dépendante des voies de signalisation mTOR et AMPK (**Wildenberg et al. 2012 ; 2017**). La mutation de la protéine ATG16L1 ou IRGM dans des DCs humaines entraîne un défaut d'autophagie dans ces cellules. Ce défaut est associé à une réduction de la dynamique de formation des filaments d'actine et prolonge l'attachement entre la DC et le LT (**Wildenberg et al. 2012 ; 2017**). La polarisation du LT étant notamment régulé par le temps d'interaction avec la DC, les chercheurs de cette étude ont observé, par conséquent, une augmentation de l'activation et de la polarisation des LT vers un profil Th17 (**Wildenberg et al. 2012**). De façon complémentaire, il a été montré que l'autophagie dans les DC humaines régule la sécrétion de cytokines nécessaire à la polarisation des LT (voir partie II.3.d. Capture des antigènes).

L'ensemble de ces études démontrent donc bien l'importance de l'autophagie dans les fonctions des mDCs, leur permettant de pleinement activer, différencier et polariser les LT pour générer une réponse immunitaire adaptative spécifique.

Au-delà de son rôle dans le catabolisme cellulaire, l'autophagie apparaît comme étant un processus majeur pour soutenir et réguler les fonctions spécifiques des cellules dendritiques, quel que soit leur état de maturation. (**Figure 21**)

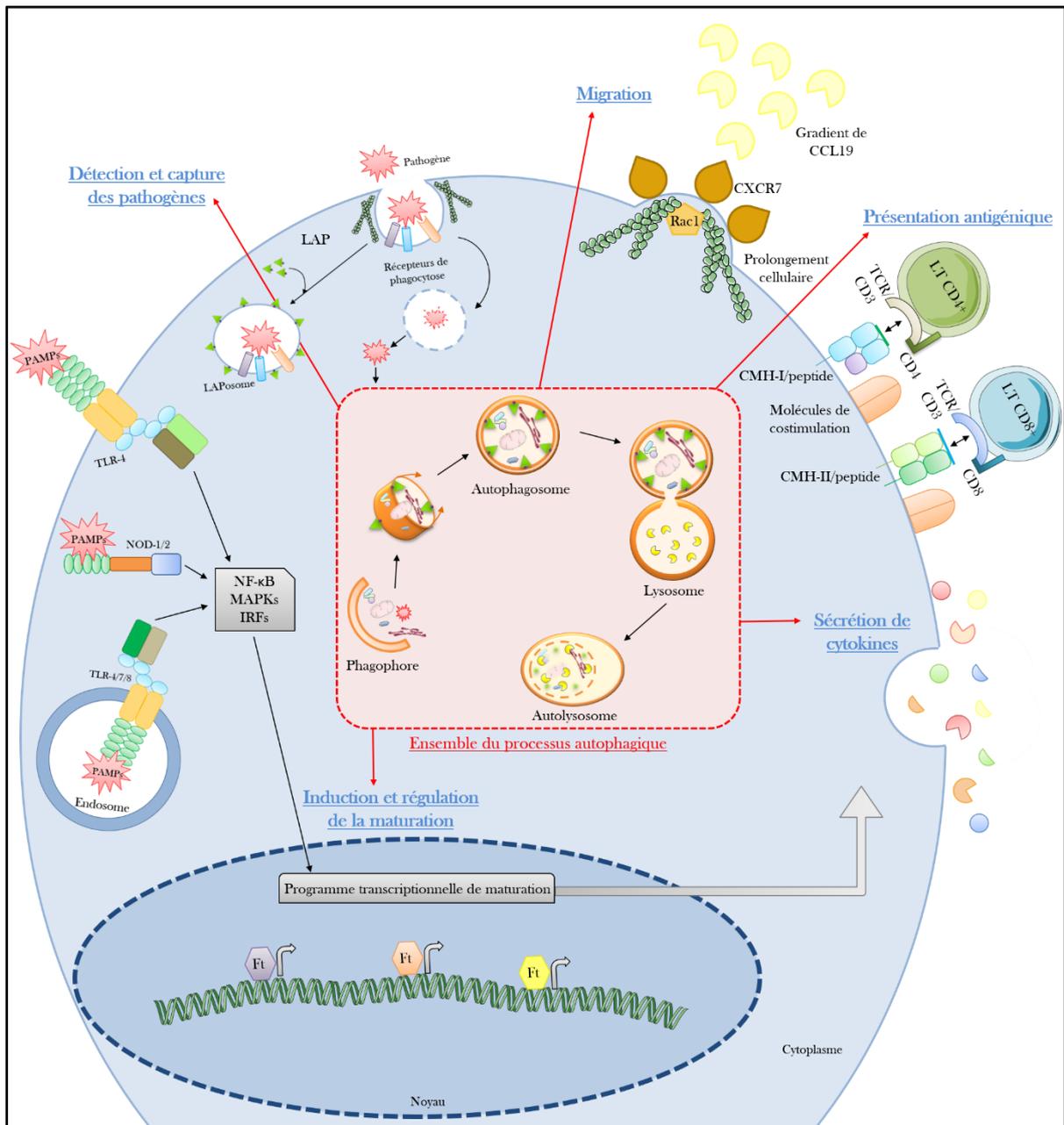


Figure 21 : Modulation de la biologie et des fonctions de la cellule dendritique par autophagie
L'autophagie participe à la régulation des différentes fonctions de la cellule dendritique, quel que soit son état de maturation. Au sein de la DC immature, l'autophagie participe à la détection des signaux de danger et la capture des pathogènes. Lors de l'induction de la maturation, le processus autophagique régule l'acquisition des nouvelles fonctions biologique de la cellule, telles que la sécrétion de cytokines, ou la migration. Dans la DC mature, l'autophagie régule l'activation et la polarisation des LTs, lors de la présentation antigénique.

5. Les sous-types des cellules dendritiques humaines

Dans la littérature, on distingue deux types de cellules dendritiques humaines, les DCs résidentes au sein des tissus et les DCs migratoires que l'on retrouve aussi bien dans le sang périphérique que dans les tissus (Merad et al. 2013) ; notons que la migration de toutes les DCs vers les organes lymphoïdes secondaires est CCR7-dépendante.

Il existe différentes manières de classer les DCs, ainsi j'ai choisi de répartir selon trois catégories : les DCs conventionnelles (ou cDCs), les DCs plasmacytoïdes (ou pDCs) et les cellules de Langerhans (ou LCs). Un paragraphe sera tout particulièrement consacré à la description des cellules dendritiques en contexte inflammatoire où seront notamment décrites les MoDCs. Pour finir, je m'attarderai sur la description des cellules dendritiques intestinales, pour faire le lien avec la partie III « Maladie de Crohn et polymorphismes autophagiques ». ([Figure 22](#))

a) Les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs)

Les DCs conventionnelles proviennent majoritairement du précurseur pré-cDCs issu du progéniteur commun des cellules dendritiques (ou CDP pour Common Dendritic cells Progenitor) généré dans moelle osseuse ; elles migrent ensuite dans le sang et peuvent coloniser différents tissus. Cependant, il existe une minorité de DCs qui proviennent de monocytes comme les cellules dendritiques du derme CD14⁺ (ou DDCs CD14⁺ pour Dermal Dendritic Cells). Les cDCs sont caractérisées par l'expression des marqueurs de surface CD11c, CD1a, CD13 et CD33, alors qu'elles n'expriment pas le marqueur CD123 ([Breton et al. 2015 ; 2016](#)). Ce sont les cellules les plus efficaces pour présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs, on parle alors de CPA professionnelles.

On distingue deux sous-groupes de cDC qui diffèrent en fonction de l'expression de facteurs de transcription qui dirigent leur développement et leurs fonctions : les cDC1 (IRF8, BATF3 et ID2) et les cDC2 (IRF4 et ZEB2) ([Mittag et al. 2011 ; Breton et al. 2015](#)).

(1) Les cDC1

Les cDC1 se localisent dans le sang périphérique, où elles ne représentent qu'une minorité des DCs présentes ([Segura et al. 2012](#)), mais aussi, et plus abondamment, dans les tissus lymphoïdes (comme les ganglions lymphatiques ou la rate) et non-lymphoïdes (ou tissus périphériques, comme la peau, les intestins, le foie ou les poumons) ([Haniffa et al. 2012](#)). Elles sont caractérisées par l'expression du marqueur de surface CD141 (ou BDCA-3 pour Blood Dendritic Cell Antigen-3), mais aussi les récepteurs TLR-1/2/3/6/8/10, XCR1 et Clec9A, et la molécule d'adhésion CADM1 ([Huysamen et al. 2008 ; Bachem et al. 2010 ; Crozat et al. 2010 ; Jongbloed et al. 2010 ; Hémond et al. 2013](#)). Il est important de noter que ces cellules expriment fortement le TLR3, et par conséquent, répondent particulièrement bien à une stimulation par de l'ARN viral double brin. Cette stimulation est associée à une sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, comme CXCL10, IL-6, IL-8 et IFN- β ([Jongbloed et al. 2010 ; Haniffa et al. 2012 ; Hémond et al. 2013](#)). Les cDC1 sont spécialisées dans la présentation-croisée, permettant la présentation d'antigènes extracellulaires aux lymphocytes T CD8⁺ ([Bachem et al. 2010 ; Jongbloed et al. 2010 ; Haniffa et al. 2012](#)). En effet, on retrouve au niveau des

lymphocytes T CD8⁺ la molécule XCL1, ligand du récepteur XCR1. Il a été montré que les DCs exprimant XCR1 sont plus efficace dans la présentation croisée des antigènes (**Kroczek et Henn. 2012**). De façon intéressante le récepteur Clec9A leur confère la capacité unique de présenter des antigènes issus de cellules mortes aux cDC1 (**Sancho et al. 2009**). Les cDC1 sont aussi capables d'induire d'autres types de réponses immunitaires, comme la réponse immunitaire T de type Th1 (**Segura et al. 2012**). Par ailleurs, des études portées sur les DCs humaines de la peau et de l'intestin ont montré que les cDC1 pouvaient jouer un rôle dans l'éducation des lymphocytes T CD4⁺ en T régulateur (Treg) au sein des tissus (**Chu et al. 2012 ; Watchmaker et al. 2014**). De plus, Watchmaker *et coll.* ont caractérisé une autre population de DCs proche des cDC1 du sang, localisés dans la lamina propria, exprimant positivement le marqueur CD103 (marqueur intestinal) et négativement le régulateur SIRP α , ayant la capacité de produire de l'IL-17 pour induire une réponse Th17.

(2) Les cDC2

Les cDC2 représentent la majorité des DCs du sang périphérique, et sont en plus grand nombre dans les tissus lymphoïdes et périphériques que les cDC1. Elles sont caractérisées par l'expression du marqueur de surface CD1c (ou BDCA-1), mais aussi le régulateur SIRP α et les récepteurs TLR-1 à 10 (sauf le TLR-9), ainsi que de nombreux récepteurs de type lectines, comme Clec6A ou Dectin-2 (**Haniffa et al. 2009 ; Hémont et al. 2013**). Grâce à l'expression de ces différents récepteurs, elles sont capables de reconnaître un large panel d'antigènes tant intracellulaires qu'extracellulaires. À la suite de leur stimulation, les cDC2 vont sécréter de nombreuses cytokines comme le TNF- α , TGF- β , IL-8, IL-10 IL-12 ou IL-23, favorisant l'activation de réponse immunitaire T CD4⁺ Th1/Th2/Th17 et T CD8⁺ (**Morelli et al. 2005 ; Haniffa et al. 2012 ; Hémont et al. 2013 ; Nizzoli et al. 2013 ; 2016 ; Sittig et al. 2016**).

Il existe une population particulière de cDC2 que l'on retrouve au niveau du derme et que l'on nomme cellules dendritiques du derme ou dermales (ou DDC) (**Nestle et al. 1993**). On distingue 2 sous-groupes de DDC ; la majorité des DDCs sont caractérisées par l'expression spécifique du marqueur CD1a, alors qu'une minorité exprime le marqueur CD14 (**Angel et al. 2007 ; 2009 ; Haniffa et al. 2009 ; Segura et al. 2012**). Les DDCs CD1a⁺ sont spécialisées dans l'activation de réponse immunitaire T de type Th1 (**Haniffa et al. 2009 ; Segura et al. 2012**) et favorisent la prolifération de lymphocytes T allogéniques (**Klechevsky et al. 2008 ; Haniffa et al. 2009**). En revanche la fonctionnalité des DDCs CD14⁺ restent à ce jour controversé. En effet, d'après les travaux de Klechevsky *et coll.*, ces DCs sont spécialisées dans l'activation de lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Tfh, ainsi que dans l'immunité humorale (**Klechevsky et al. 2008**). Par ailleurs, les travaux de McGovern *et coll.* montrent que les DDCs CD14⁺ sont

particulièrement efficaces pour activer des LT CD4⁺ mémoires et non les LT CD4⁺ naïfs, contredisant alors les travaux précédents, et suggérant un rôle dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium cutané (McGovern et al. 2014).

b) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)

C'est en 1958 qu'on observa pour la première fois des pDCs par le pathologiste Karl Lennert. Cependant, ce n'est que dans les années 1990s qu'elles firent leur entrée dans la famille des cellules dendritiques grâce aux travaux de O'Doherty et Grouard (O'Doherty et al. 1994 ; Grouard et al. 1997). Les pDCs sont issues directement du progéniteur commun des cellules dendritiques (ou CDP). Elles représentent environ 50% des DCs du sang (MacDonald et al. 2002) et se localisent au sein des tissus enflammés (Cella et al. 1999). Elles sont caractérisées par la présence d'un noyau excentrique, et d'un réticulum endoplasmique volumineux dans le cytoplasme, leur permettant une production importante d'interféron. Par contraste avec les cDCs, les pDCs n'expriment pas les marqueurs CD11c, CD13 et CD33, mais expriment fortement les marqueurs CD45RA, CD123 (ou IL-3R), CD303 (ou BDCA-2), CD304 (ou BDCA-4) et à des niveaux variables les marqueurs CD2, CD7 et CD1c (BDCA-1) (Dzionek et al. 2000 ; Mathan et al. 2013). Les pDCs sont spécialisées dans la sécrétion d'interféron de type I, en réponse à la détection d'antigènes viraux, notamment permise par l'expression des TLR-7 et 9 qui reconnaissent des acides nucléiques viraux (Ganguly et al. 2009 ; Cella et al. 1999 ; Siegal et al. 1999). Cette production d'IFN-I est accompagnée d'une sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. De plus les pDCs sont aussi capables de faire de la cross-présentation pour favoriser des réponses anti-tumorales (Tel et al. 2013 ; 2013b), mais aussi d'induire de la tolérance immunitaire (Gilliet et Liu. 2002 ; Moseman et al. 2004 ; Ito et al. 2007).

c) Les cellules de langerhans (LCs)

Les cellules de Langerhans ont été observées pour la premières fois par le Dr Paul Langerhans en 1868, à partir d'échantillons de peau humaine. Elles sont localisées spécifiquement dans l'épiderme et les épithéliums stratifiés. Elles ne représentent que 2 à 4 % des cellules présentes dans l'épiderme et sont en étroite connexion avec les kératinocytes grâce à leur prolongement cytoplasmique. Elles sont caractérisées par la présence de granules de Birbeck, des organites intracytoplasmiques « en forme de raquettes de tennis » (Valladeau. 2006). De plus, les LCs expriment fortement une lectine de type II, appelée langerine (ou CD207), impliquée dans la capture d'antigènes (Valladeau et al. 2000 ; 2000b ; 2006), mais aussi les marqueurs CD1a, CD13 et CD33, ainsi que de nombreuses molécules d'adhérence, telle que la E-cadhérine ou EpCAM (ou Epithelial Cell Adhesion Molecule) (Valladeau et Saeland. 2005). Ces cellules ont des capacités d'auto-renouvellement en condition basale et sont renouvelées

grâce aux précurseurs circulants présents dans le sang périphérique après inflammation du tissu (Merad et al. 2002). Les LCs expriment différents types de récepteurs à leur surface leur permettant de détecter et de capturer certains types d'antigènes, notamment grâce à l'expression des TLR-2/3/6 (Flacher et al. 2006 ; Aar et al. 2007). En effet, selon la nature de l'antigène les LCs peuvent activer des lymphocytes T résidents ou migrer dans les organes lymphoïdes secondaires afin d'initier une réponse immunitaire T (Seneschal et al. 2012 ; Villablanca et Mora. 2008). Ainsi les LCs démontrent une grande plasticité en termes de réponse immunitaire. Elles sont capables d'induire des réponses immunitaires contre les virus et les pathogènes intracellulaires via l'activation de réponse Th1/Th2 (Furio et al. 2010), Th17 (Mathers et al. 2009) et Th22 (Fujita et al. 2009). Par ailleurs, elles sont essentielles au maintien de l'homéostasie tissulaire en activant des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Seneschal et al. 2012 ; Aar et al. 2013) permettant une tolérance immunitaire face aux bactéries commensales, mais aussi des LT Th1/Th17 afin de lutter contre l'infection de microorganismes pathogènes.

d) Les cellules dendritiques inflammatoires

Les nombreuses études portées sur les maladies inflammatoires, comme le psoriasis (Wollenberg et al. 2002 ; Zaba et al. 2009), l'eczéma (Wollenberg et al. 1996) ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin (Zigmond et al. 2012 ; Leal et Däbritz. 2015 ; Smrekar et al. 2018), ont permis d'identifier des cellules myéloïdes inflammatoires. Parmi ces cellules, on trouve des cellules dendritiques particulières présentes uniquement en contexte inflammatoire (Segura et al. 2013b ; Segura et Amigorena 2013).

(1) Les DCs inflammatoires « classiques »

Au sein de tissus endommagés ou infectieux, un sous-groupe particulier de cellules dendritiques a été décrit, n'apparaissant qu'au niveau du site inflammatoire, et qui sont alors appelées DCs inflammatoires. De manière intéressante, on peut noter les DCs inflammatoires expriment le facteur de transcription de la lignée des DCs ZBTB46 ; bien que leur signature génique soit très proche de celle des monocytes (Segura et al. 2013b ; Segura et Amigorena. 2013). Ces DCs orientent spécifiquement la réponse immunitaire T de type Th17 au niveau du site enflammé, avec une sécrétion forte d'IL-6/23/1b et TGF- β . Cependant, elles sont aussi capables d'induire des réponses de type Th1 et Th2.

Les DCs inflammatoires ont été identifiées pour la première fois dans les années 1990 grâce aux travaux de Wollenberg *et coll.* avec la découverte de cellules dendritiques de l'épiderme inflammatoire (ou IDECs pour Inflammatory Dendritic Epidermal Cells) au sein de lésions cutanées (dermatite atopique et d'eczéma). Les IDECs présentent des similitudes avec les cellules de Langerhans, comme l'expression positive du marqueur de surface CD1a, mais différent via

l'expression négative de langérine, l'expression positive du récepteur FcεRI et l'absence de granules de Birbeck (Wollenberg et al. 1996). Ces DCs expriment spécifiquement le récepteur du mannose, le CD206 (ou MR pour Mannose Receptor), leur permettant de capturer des antigènes mannosylés par endocytose (Wollenberg et al. 2002). De plus, elles expriment les marqueurs typiques de DCs, comme le CD11c, le CD11b ou HLA-DR.

Segura *et coll.* ont montré qu'il existait une autre population de DCs inflammatoires retrouvées dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Ces DCs sont caractérisées par l'expression du marqueur de monocytes le CD14, mais aussi les marqueurs de cDC2 CD1c (ou BDCA-1), les récepteurs CD206 et FcεRI et le régulateur SIRPα (Segura et al. 2013b).

Pour finir une dernière population de DCs inflammatoires a été identifiées chez des patients atteints de psoriasis, où l'analyse de biopsies de peau ont montré la présence de cellules dendritiques inflammatoires Slan⁺(pour 6-sulfo LacNAc) localisées au niveau du derme enflammé (Hänsel et al. 2011). Ces cellules produisent une grande quantité de TNF-α et IL-12, et sont particulièrement efficaces pour engendrer des réponses T de type Th17/Th1.

(2) Les cellules dendritiques-dérivées de monocytes (MoDCs)

Au cours d'une infection induite chez la souris par le parasite *Leishmania*, en 2007 l'équipe de Leon a mis en évidence la présence de cellules dendritiques inflammatoires dérivant de monocytes particulier, exprimant le marqueur Ly6C, au site enflammé. Par la suite ces cellules ont été nommées cellules dendritiques-dérivées de monocytes (León et al. 2007). Ces cellules présentent des capacités de migration et d'activation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ similaire aux autres DCs. Ce type de cellules dendritiques est retrouvé chez l'homme uniquement en contexte inflammatoire. En effet, Segura *et coll.* suggèrent que certaines DCs inflammatoires humaines présentent dans les tissus enflammés dérivent de monocytes plutôt que de précurseurs de DCs (Segura et al. 2013b). De manière complémentaire Achachi *et coll.* ont montré qu'après exposition de peaux humaines aux UV, les LCs qui reconstituaient l'épiderme enflammé provenait de monocytes circulants (Achachi et al. 2015). Par ailleurs, il est possible de générer des MoDCs humaines *in vitro* à partir de monocytes et grâce à un cocktail de cytokines, dont les plus classiquement utilisées sont le GM-CSF (pour Granulocyte-Macrophages Colony-Stimulating Factor) et l'IL-4 (Sallusto et Lanzavecchia. 1994 ; Robbins et al. 2008). Ces cellules présentent un profil transcriptomique proche de celui des DCs inflammatoires identifiées *in vivo*. De plus, leur capacité de maturation sont similaires puisqu'une stimulation des TLRs permet d'augmenter l'expression des marqueurs CD80/86/83, mais aussi d'induire une augmentation du CMH-II à la surface des cellules. Cette stimulation est associée à une production de cytokines

pro-inflammatoires (León et al. 2005 ; Segura et al. 2013b). Ainsi les MoDCs humaines générées *in vitro* sont couramment utilisées pour mieux comprendre la biologie de la cellule dendritique. C'est pourquoi, pour réaliser ces travaux de thèse, des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains ont été générées et utilisées comme modèle de cellules dendritiques.

e) Exemple de diversité de cellules dendritiques dans un tissu de revêtement : DCs intestinales

Cette partie fait le lien avec ma partie III. Maladie de Crohn et polymorphismes autophagiques, où je vais décrire l'ensemble des cellules dendritiques intestinales et leurs fonctions majeures.

Les DCs intestinales sont localisées dans les tissus lymphoïdes intestinaux qui sont groupés selon le terme GALT (pour Gut-Associated Lymphoid Tissues), comprenant les plaques de Peyers (ou PPs pour Peyer's Patches) et les tissus lymphoïdes isolés et solidaires (ou SILT pour Solidary Isolated Lymphoid Tissues), mais aussi de manière éparse dans la *lamina propria*. Elles font ainsi parties intégrantes de la seconde ligne de défense de la muqueuse intestinale contre les microorganismes pathogènes. Ces DCs sont indispensables au maintien de l'homéostasie intestinale, participant à la fois à la tolérance immunitaire et à la réponse inflammatoire. La particularité de ces cellules est leur capacité à quitter la *lamina propria* pour migrer vers les organes lymphoïdes secondaires de l'intestin, les ganglions mésentériques ou les plaques de Peyers, riches en lymphocytes T naïfs, pour les activer et engendrer une réponse immunitaire T spécifique. Watchmaker *et coll.* ont identifié trois populations de cDCs CD11c⁻ majeures au sein de la *lamina propria* d'échantillons intestinaux humains, classées selon l'expression de deux marqueurs : le CD103 et Sirp α (ou CD172a) (Watchmaker et al. 2014). Le CD103 est une intégrine qui lie la E-cadhérine des cellules épithéliales, alors que Sirp α est le récepteur du ligand CD47 dont l'engagement induit une inhibition de la phagocytose dans la DC. Ainsi on distingue : les DCs 103⁺Sirp α ⁺, les DCs 103⁺Sirp α ⁻ et le DCs 103⁻Sirp α ⁺.

La population majeure de DCs intestinales est appelée humain double positive (ou hDP), exprimant à la fois CD103 et Sirp α (ou huDC 103⁺Sirp α ⁺). Ces DCs ont un profil transcriptomique similaire aux cDC-2 du sang (CD11c⁺). Ces DCs expriment fortement les marqueurs HLA-DR (CMH-II), CD83, CD86 et CD40, et faiblement le CD80. De manière intéressante, ces DCs expriment fortement les récepteurs aux chimiokines CCR6 et CCR7, ainsi que l'intégrine α 4 β 7 et de manière intermédiaire CXCR3, des marqueurs associés aux capacités de migration vers les OLS. L'étude de l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la tolérance immunitaire a révélé que les hDP DCs expriment préférentiellement ces gènes, leur conférant « de meilleures capacités » d'induction de tolérance en comparaison avec les deux autres

populations de DCs intestinales. De manière complémentaires, ces DCs montrent une plus grande capacité à activer des LTregs FOXP3+ que les autres sous-types de DCs. Par ailleurs, les hDP DCs sont capables d'induire efficacement des réponses T Th17 (Watchmaker et al. 2014).

La population intermédiaire est appelée human simple positive (ou hSP), exprimant seulement le CD103 (ou huDC 103+Sirpα-). Ces DCs ont un profil transcriptomique similaire aux cDC-1 du sang (CD141+). Ces DCs expriment fortement les marqueurs HLA-DR (CMH-II) et CD40, de manière intermédiaire le marqueur CD83, et faiblement le marqueur CD86 et CD80. De plus elles expriment fortement les récepteurs aux chimiokines CCR6, CCR7 et CXCR3, ainsi que l'intégrine α4β7. Les hSP DCs sont capables d'induire efficacement des réponses T de type Th17, mais ne semble pas être capables d'induire des réponses Tregs (Watchmaker et al. 2014).

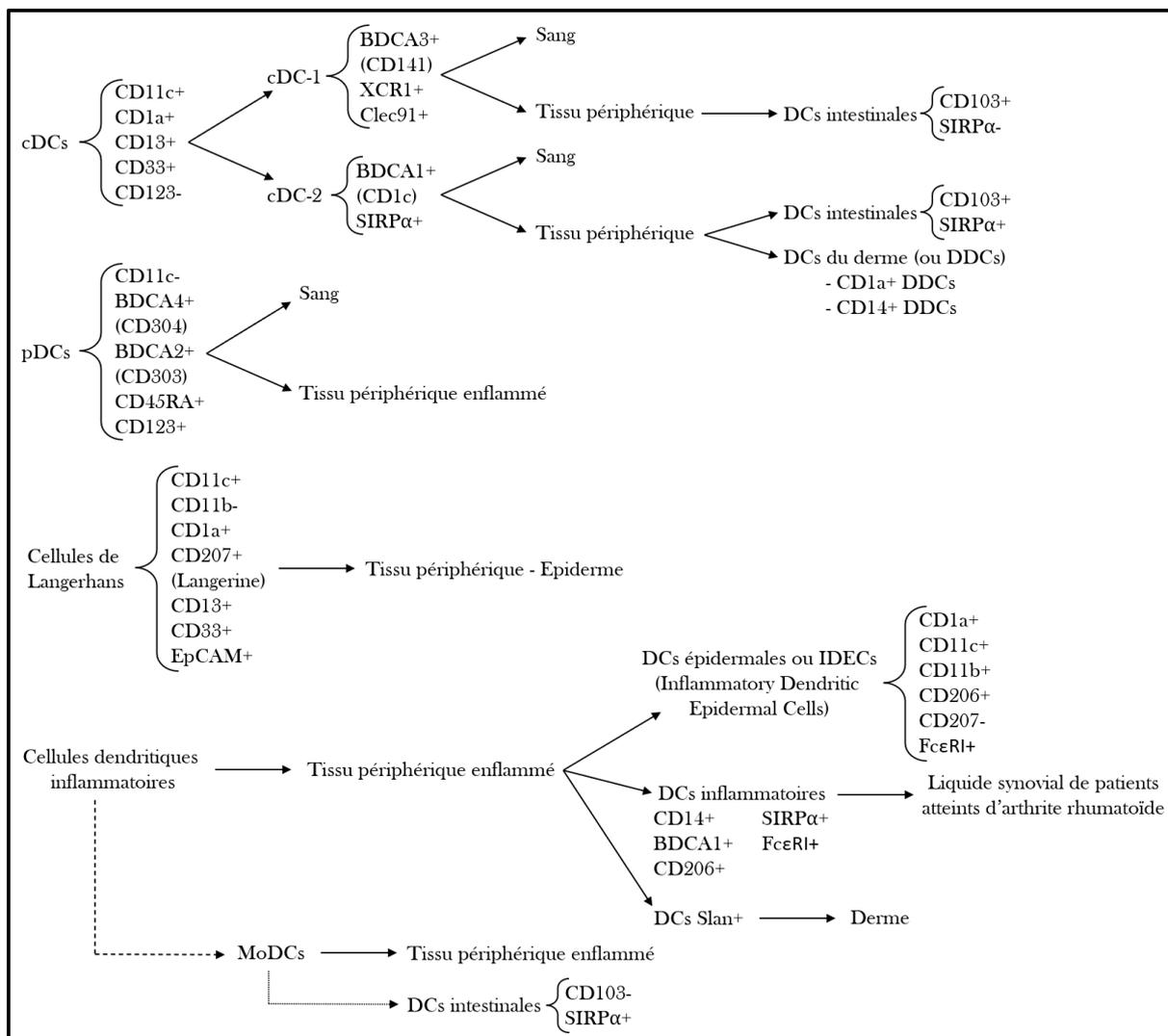


Figure 22 : Diversité des cellules dendritiques humaines

Il existe quatre grands types de cellules dendritiques humaines, qui sont les DC conventionnelles (cDCs), les DCs plasmacytoïdes (pDCs), les cellules de Langerhans (LCs) et les DCs inflammatoires générées ou recrutées en contexte inflammatoires au sein des tissus.

La population minoritaire de DCs intestinales exprime seulement le marqueur Sirp α (ou huDC 103-Sirp α ⁺). Cette population, dont le profil transcriptomique est similaire au MoDCs, est retrouvé plus abondamment dans les tissus enflammés. Ces DCs expriment fortement le marqueur HLA-DR (CMH-II), de manière intermédiaire les marqueurs CD86 et CD40, et faiblement le marqueur CD83 et CD80. De plus, elles expriment fortement les récepteurs aux chimiokines CX3CR1, ainsi que l'intégrine α 4 β 7, de manière intermédiaire CCR7, et faiblement le CCR6. Contrairement aux autres populations de DCs intestinales, les huDCs 103-Sirp α ⁺ sont très efficaces pour engendrer des réponses T de type Th1, associées à une forte production d'IFN- γ (Watchmaker et al. 2014).

III. Maladie de Crohn et polymorphismes autophagiques

1. Définition et épidémiologie

La maladie de Crohn (ou MC) est une maladie immunitaire qui fait partie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI). Elle est caractérisée par une inflammation chronique du tube digestif qui apparaissent sous formes de poussées temporisées par des intervalles plus ou moins variables de rémissions. Contrairement aux autres MICI, la MC peut s'étendre sur tout le tube digestif, avec une prévalence pour l'iléon (Roda et al. 2020). C'est une maladie dont l'incidence en Europe se situe entre 0,7 et 9,8 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants, soit environ 1 millions de patients. Elle touche préférentiellement les femmes entre 20 et 40 ans, bien que l'âge moyen tout sexe confondu soit autour de 48 ans. Cette maladie tient son nom du gastro-entérologue Burrill B. Crohn.

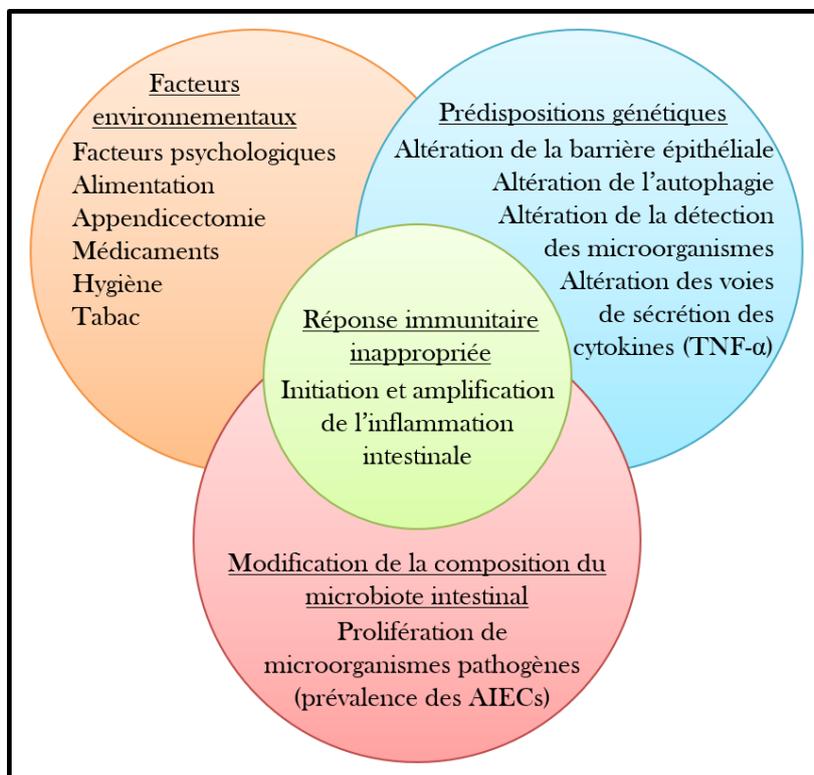


Figure 23 : Facteurs de risques associés à la maladie de Crohn (MC)

Les facteurs de risque principaux de la maladie de Crohn sont les facteurs génétiques et environnementaux. Ils sont fortement associés à la dysbiose intestinale qui correspond à la modification de la composition du microbiote intestinal. L'ensemble de ces trois facteurs conduit à une dérégulation de la réponse immunitaire, aboutissant à la mise en place d'une réponse inflammatoire chronique, caractéristique de la maladie.

Les MICI sont décrites comme des maladies complexes qui résultent de l'association entre plusieurs facteurs, dont des facteurs environnementaux et des mutations au niveau de gènes de susceptibilité, on parle notamment de maladie « multifactorielle » (Figure 23). Il existe de nombreux facteurs environnementaux qui sont associés au développement de la MC, tels que le

tabagisme, l'appendicectomie, les facteurs liés à l'alimentation, la prise médicamenteuse, les agents infectieux, les conditions d'hygiène et les facteurs psychologiques (Dutta et Chacko. 2016 ; Carreras-Torres et al. 2020 ; Roda et al. 2020). Ces différents facteurs participent au dysfonctionnement du système immunitaire, responsable de l'inflammation chez les patients. Les facteurs génétiques ont aussi un impact très important dans la MC. En effet, différentes études ont mis en évidence des gènes de prédispositions pour la MC, avec un taux d'héritabilité d'environ 40% chez les jumeaux monozygotes (Halfvarson et al. 2003). De plus, une étude sur le génome humain a mis en évidence environ 240 loci dont la mutation est associée à un risque de développer une MICI (Lange et al. 2017). La cartographie plus fine de cette étude a permis d'identifier des polymorphismes nucléotidiques spécifiquement associés à ces maladies, présents sur un seul nucléotide (ou SNPs pour Single-Nucleotide Polymorphisms) (Huang et al. 2017). Il est intéressant de noter que de nombreux polymorphismes ont été identifiés dans des gènes associés à l'autophagie, un processus essentiel au maintien de l'homéostasie et des fonctions de l'intestin (Lees et al. 2011). Je détaillerai particulièrement ces polymorphismes dans la 3ème partie de cette partie.

2. Physiopathologie de la maladie de Crohn

La barrière intestinale joue un rôle crucial dans le développement de la MC, puisqu'elle constitue la première barrière de défense face au microbiote intestinal (Figure 24). Deux évènements successifs peuvent expliquer l'apparition de lésions intestinales inflammatoires chez les patients : l'altération de l'épithélium intestinal et la modification de la biodiversité de la flore microbienne, appelée dysbiose (Huttenhower et al. 2014). L'association de ces deux évènements avec un dysfonctionnement du système immunitaire conduit au développement et au maintien de la maladie de Crohn caractérisée par une inflammation chronique de l'intestin (Figure 25).

Pour bien comprendre la physiopathologie de cette maladie, je décrirai dans un premier temps la biologie de la muqueuse intestinale en condition basale, puis pathologique. J'ai volontairement privilégié de discuter du rôle des cellules dendritiques intestinales dans l'homéostasie de l'épithélium, ainsi que dans la physiopathologie de la maladie.

a) Biologie intestinale

La barrière intestinale est continuée d'un biofilm bactérien, d'une couche de mucus et de la muqueuse intestinale, formant ainsi une barrière à la fois physique et chimique. Dans la maladie de Crohn, chacun de ces éléments est altéré (Figure 24).

(1) La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale est composée d'un épithélium intestinal et d'une lamina propria. L'épithélium intestinal est constitué majoritairement de diverses cellules épithéliales et de cellules

immunitaires, alors que la lamina propria est composée principalement de cellules immunitaires. L'une des fonctions de cette muqueuse est de maintenir l'homéostasie du tissu intestinal, basé notamment sur la maintenance de la tolérance envers la flore commensale et l'élimination des microorganismes pathogènes (Zouiten-Mekki et al. 2013).

(a) Les cellules épithéliales

Parmi les cellules épithéliales qui composent l'épithélium intestinal, on distingue principalement : les cellules épithéliales de l'intestin (ou IECs pour Intestinal Epithelial Cells, appelées aussi entérocytes), les cellules souches intestinales, les cellules de Paneth, ou encore les cellules de Goblet (Zouiten-Mekki et al. 2013). Les cellules souches intestinales permettent un renouvellement des différentes cellules qui composent l'épithélium. Les cellules entérocytes constituent la majorité des cellules de l'épithélium, dont certaines ont des fonctions spécialisées. Elles sont reliées entre elles par un complexe jonctionnel, composé de jonctions serrées, de jonctions d'ancrages et de jonctions communicantes, formant ainsi une barrière imperméable (Laukoetter et al. 2006). Les cellules de Goblet sécrètent du mucus, qui est composé majoritairement de mucine (codée par les gènes MUC). Ce mucus fait partie intégrante à la fois de la barrière physique, jouant le rôle de filtre et limitant l'infiltration des microorganismes, mais aussi de la barrière chimique du fait de sa richesse en IgA et molécules antimicrobiennes (Knoop et Newberry. 2018). Pour finir, les cellules de Paneth, quant à elles, sont spécialisées dans la sécrétion de peptides antimicrobiens (ou défensines) et de lysozymes qui participent à la lutte antimicrobienne non spécifiques (Ayabe et al. 2000 ; Bevins et Salzman. 2011). (Figure 24)

Les cellules de l'épithélium intestinal participent à l'homéostasie du tissu intestinal en sécrétant des cytokines à la fois pro- et anti-inflammatoires. Ainsi, ces cellules participent à la réponse pro-inflammatoire dirigée contre les microorganismes pathogènes via la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 ou encore d'IL-8 (Zouiten-Mekki et al. 2013), mais aussi à la réponse anti-inflammatoire via la sécrétion de TGF- β ou d'IL-25. En effet, il est décrit que le TGF- β favorise un environnement immunosuppresseur afin de contrôler l'inflammation du tissu, alors que l'IL-25 conditionne les DCs intestinales pour qu'elles sécrètent de l'IL-10 afin d'activer des LT régulateurs permettant de réguler l'inflammation du tissu (MacDonald et al. 2011). (Figure 24)

(b) Les cellules immunitaires

La fonction majeure des cellules immunitaires présentes au niveau de la muqueuse intestinale est de maintenir l'homéostasie du tissu (MacDonald et al. 2011). Parmi ces cellules immunitaires on distingue : les neutrophiles, les macrophages et les cellules lymphoïdes innées (ou ILCs pour Innate Lymphoid cells) qui assurent les défenses immunitaires innées, et les

cellules dendritiques impliquées à la fois dans la réponse immunitaire innée, mais aussi dans la réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T et B (MacDonald et al. 2011 ; Zouiten-Mekki et al. 2013). Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires recrutées dans l'épithélium intestinal afin de participer à l'élimination de bactéries infectieuses. Elles sont notamment capables de sécréter une grande quantité d'IL-22, une cytokine qui participe à la fois à la défense antimicrobienne et à la restauration du tissu intestinal enflammé (Zindl et al. 2013). Les macrophages sont des phagocytes capables à la fois d'éliminer efficacement les microorganismes pathogènes infiltrant l'épithélium intestinal, mais aussi de maintenir l'homéostasie du tissu via la sécrétion d'IL-10 ou de TGF- β , afin contrôler l'inflammation du tissu (Maloy et Powrie. 2011; Li et al. 2014). Les ILCs sont peu présentes dans l'épithélium intestinal malgré leur rôle important au sein du tissu lorsque celui-ci est enflammé. En effet, ces cellules favorisent la sécrétion de mucus ou encore peptides anti-microbiens par les cellules épithéliales, via la production d'IL-22 (Sonnenberg et Artis. 2015). Il est intéressant de noter que ce sont les DCs intestinales qui stimulent la production d'IL-22 par les ILCs, via la sécrétion d'IL-23 en réponse à différents signaux de dangers détectés dans l'épithélium. Ces DCs intestinales sont particulièrement essentielles à l'homéostasie du tissu intestinal, via leurs capacités détecter et capture des antigènes, mais aussi à orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type tolérogène ou immunogène en fonction de la nature de l'antigène détecté (MacDonald et al. 2011). Il est intéressant de noter qu'il existe trois types de DCs intestinales prépondérantes, ayant diverses fonctions (voir partie II.5.e. Exemple de diversité de cellules dendritiques dans un tissu de revêtement : DCs intestinales) : les huDCs 103+Sirp α^+ , les huDCs 103+Sirp α^- et les huDCs 103-Sirp α^+ (Watchmaker et al. 2014). L'épithélium étant en contact permanent avec le microbiote intestinal, qui constitue une source importante d'antigènes microbiens, les DCs jouent donc un rôle majeur dans la maintenance de l'intégrité du tissu. (Figure 24)

(i) Mise en place d'une réponse immunitaire tolérogène

La réponse immunitaire tolérogène prend place après la reconnaissance et la capture d'antigènes issus de la flore commensale. Lorsque les DCs localisées la *lamina propria* vont détecter ces antigènes, elles vont alors s'activer et murer, afin de pouvoir migrer vers les organes lymphoïdes secondaires locaux, qui sont les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, où sont localisés de nombreux LT CD4⁺ naïfs. Lors de la présentation antigénique, les DCs vont activer des LT naïfs spécifiques de l'antigène présenté. De plus, la sécrétion de TGF- β et d'IL-10 par les DCs leur permet de polariser les LT activés en LT régulateurs (LT regs) (Mowat. 2003 ; MacDonald et al. 2011 ; Shen et al. 2012 ; Watchmaker et al. 2014). Il est intéressant de noter

que ce sont les huDCs $103^+ \text{Sirp}\alpha^+$ qui vont majoritairement engendrer des réponses T régulatrices au niveau de l'épithélium intestinale (**Watchmaker et al. 2014**). Les LT regs vont permettre de réguler la réponse inflammatoire, passant par l'inhibition de la différenciation des LT de type Th1, Th2 et Th17, via la sécrétion d'IL-10. Ainsi, ces lymphocytes bloquent la réponse immunitaire immunogène spécifiquement dirigée contre la flore commensale, afin de maintenir une tolérance envers le microbiote intestinal (**Mowat. 2003 ; MacDonald et al. 2011**). Les LT regs participent aussi à l'activation de lymphocytes B afin qu'ils sécrètent une grande quantité d'immunoglobulines de type IgA, délocalisées ensuite au niveau du mucus. Ces IgA ont notamment des propriétés anti-inflammatoires, en contrôlant la colonisation de microorganismes dans l'épithélium (**Maloy et Powrie. 2011**). (**Figure 24**)

D'autres cellules de l'immunité innée participent à la mise en place de la réponse tolérogène, comme les macrophages anti-inflammatoires (ou M2 pour Macrophage de type 2). Ces cellules vont pouvoir sécréter de l'IL-10 et du TGF- β en réponse à la détection d'antigènes issus du microbiote intestinal, favorisant un environnement immunosuppresseur (**Maloy et Powrie. 2011 ; Li et al. 2014**). En effet, le TGF- β va notamment inhiber l'activation des macrophages pro-inflammatoires (ou M1 pour Macrophage de type 1), bloquant notamment leur capacité de phagocytose, permettant de protéger la flore commensale (**Maloy et Powrie. 2011**). (**Figure 24**)

(ii) Mise en place d'une réponse immunitaire immunogène

De manière similaire à la mise en place d'une réponse immunitaire tolérogène, la mise en place d'une réponse immunogène passe par la détection des signaux de danger et la capture d'antigènes issu de microorganismes pathogènes par les DCs intestinales, favorisant leur activation et leur maturation. Contrairement aux bactéries commensales, les microorganismes pathogènes sont spécifiquement reconnus par les PRRs présents à la surface des DCs via leurs motifs particuliers, les PAMPs. Ainsi, lors de la présentation antigénique, les DCs seront conditionnées pour sécréter des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-4, l'IL-6, l'IL-12, ou encore l'IL-23, afin d'activer et polariser les LT CD4^+ naïfs en LT de type Th1, Th2 ou Th17 spécifiques de l'antigène. Ces différents LT effecteurs vont à leur tour sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-17 et l'IFN- γ , participant à la lutte antimicrobienne (**Maloy et Powrie. 2011**). Il est intéressant de noter que ce sont les huDCs $103^+ \text{Sirp}\alpha^+$ et les huDCs $103^+ \text{Sirp}\alpha^-$ qui sont responsables de l'activation de réponses T de type Th17 et les huDCs $103^- \text{Sirp}\alpha^+$ qui engendrent des réponses T de type Th1 (**Watchmaker et al. 2014**). L'IL-17, sécrété par les LT Th17, joue un rôle important dans la défense antimicrobienne, favorisant notamment le recrutement des neutrophiles, mais aussi la production de peptides antimicrobiens

par les cellules de Paneth, ou encore la transcytose des IgA dans la lumière intestinale (Cao et al. 2012 ; Cypowj et al. 2012). Les DCs participent aussi à l'activation des ILCs via la sécrétion d'IL-23, qui stimule leur production d'IL-22. L'IL-22, sécrété par les ILCs, stimule les défenses antimicrobiennes de l'épithélium intestinale, via la production de mucus par les cellules de Goblet et de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth (Sonnenberg et Artis. 2015). (Figure 24)

Les PAMPs sont aussi détectés par d'autres cellules de l'immunité innée, comme les macrophages, qui vont alors s'activer et se différencier en macrophage de type M1, producteurs de grande quantité de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α . Les cytokines produites par les macrophages peuvent permettre de recruter d'autres cellules immunitaires comme les neutrophiles ou les ILCs, qui vont à leur tour s'activer et sécréter des cytokines pro-inflammatoires pour lutter contre l'infection.

C'est l'association entre la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire adaptative spécifique qui permet d'éliminer efficacement les pathogènes infectieux. Dans un deuxième temps, différents événements pourront par la suite contrôler et diminuer l'inflammation du tissu intestinal, tel que le recrutement et l'activation de lymphocytes B sécrèteur d'IgA, une immunoglobuline qui permet de protéger la muqueuse intestinale en contrôlant notamment la colonisation des bactéries pathogéniques (Mowat. 2003). La sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, telles que le TGF- β et l'IL-10, tant par les cellules immunitaires que les cellules épithéliales, participe aussi à la régulation de la réponse inflammatoire (Maloy et Powrie. 2011 ; Li et al. 2014).

(2) Microbiote intestinal

Le biofilm bactérien est une couche protectrice constituée d'un amas de cellules bactériennes enrobé d'une matrice et attaché à la surface de l'épithélium. Le microbiote intestinal est constitué de l'ensemble des bactéries commensales associé à d'autres microorganismes (Morgan et al. 2012b). Il est composé d'environ 10^{14} microorganismes et plus de 1500 espèces de bactéries, telles que les Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria. Le groupe des Firmicutes est constitué de bactéries Gram⁺ qui représentent entre 60 et 80% de la flore intestinale, le groupe des Bacteroidetes représente quant à lui entre 15 et 30% et enfin les groupes des Actinobacteria et Proteobacteria représentent moins de 10% des bactéries intestinales (Cheng et al. 2013). Ces bactéries vivent en symbiose avec les cellules épithéliales et font partie intégrante de la défense antimicrobienne en bloquant notamment la colonisation de microorganismes pathogènes, mais aussi en modulant la sécrétion de cytokines par les cellules environnantes.

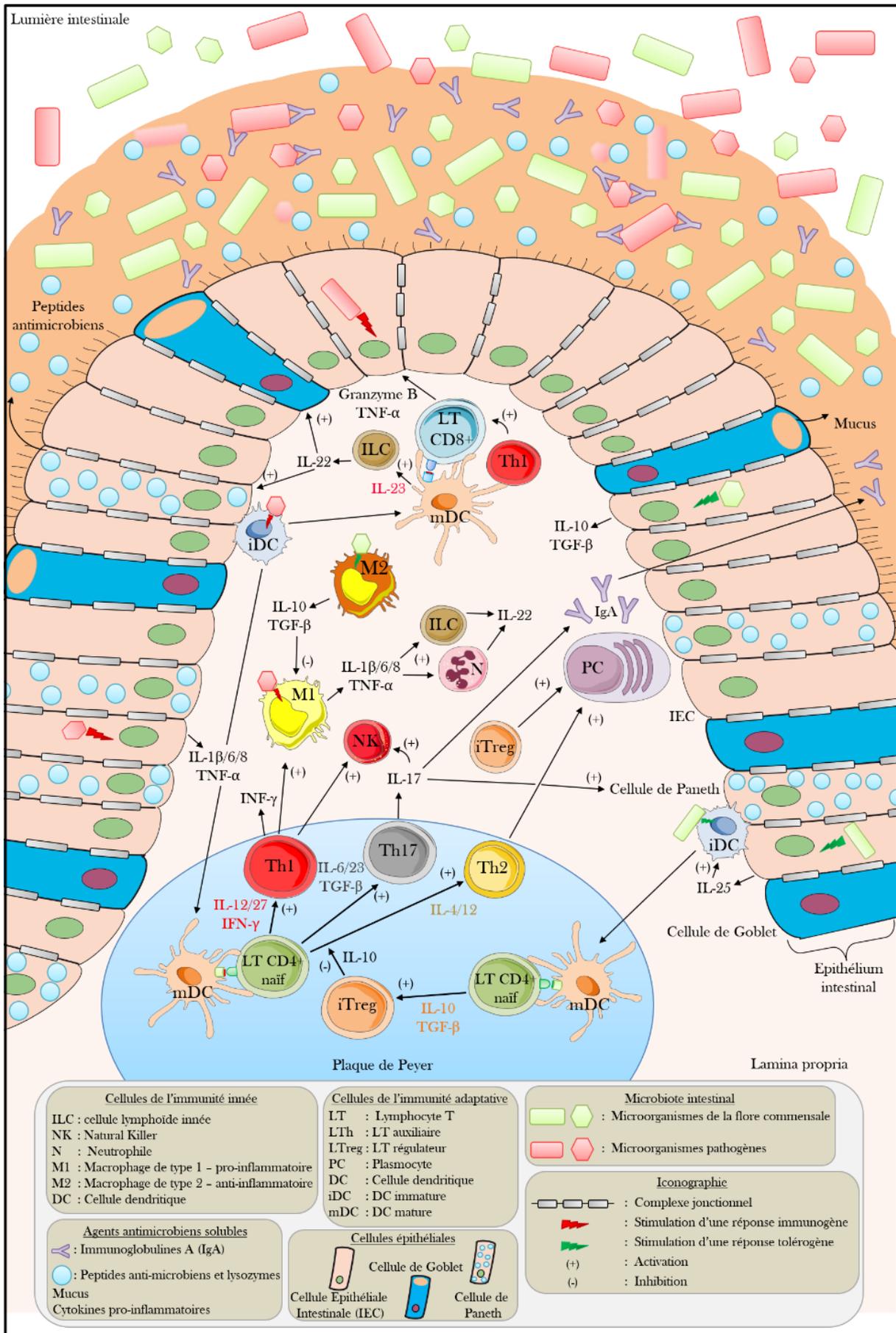


Figure 24 : Immunobiologie intestinale d'un patient sain

L'intestin est une zone en contact directe et permanente avec de multiples microorganismes qui constitue la flore intestinale. La barrière intestinale a pour fonction de protéger l'intestin de diverses infections, ainsi elle est constituée d'une barrière physique et chimique. La barrière physique est composée de trois éléments qui sont le biofilm bactérien constitué de bactéries commensales, le mucus qui filtre les microorganismes, et la muqueuse intestinale composée de diverses cellules épithéliales et immunitaires. La barrière chimique est constituée de quatre éléments majeurs qui sont les IgA, les lysozymes et les peptides antimicrobiens sécrétés dans le mucus afin de contrôler la prolifération des microorganismes pathogènes, ainsi que diverses cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules de la muqueuse intestinale. Ces différentes barrières maintiennent l'homéostasie du tissu intestinal, en régulant, notamment, l'équilibre entre la tolérance immunitaire envers la flore commensale (légende verte) et l'élimination des microorganismes pathogènes (légende rouge).

En effet, l'équipe de Sokol a montré que les Firmicutes sont capables de bloquer l'activation de la voie NF- κ B et la production d'IL-8 par les cellules de l'épithélium afin de maintenir la tolérance envers la flore intestinale (Sokol et al. 2008). Comme ces bactéries possèdent des propriétés anti-inflammatoires, elles sont dites « protectrices » et participent à l'homéostasie du tissu intestinal. (Figure 24)

b) Altérations de la muqueuse intestinale et mise en place de la réponse inflammatoire

La physiopathologie complète de la maladie de Crohn reste encore mal comprise, bien qu'il semblerait que ce soit l'association de plusieurs événements qui conduisent à son développement. De nombreuses polymorphismes génétiques ont été identifiées dans des gènes associés à la fonction de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de cette maladie. En effet, certaines de ces mutations ont été retrouvées dans des gènes associés à la fonction et la viabilité des cellules épithéliales intestinales, mais aussi associés à la réponse immunitaire innée ou adaptative. Les facteurs génétiques combinés aux facteurs environnementaux, entraînent de nombreuses altérations de la barrière intestinale, qui conduit à un déséquilibre de la flore. Ce déséquilibre est au profit de bactéries pathogéniques qui vont alors adhérer et coloniser l'épithélium intestinal. Pour répondre à ces infections une réponse inflammatoire se met en place au sein du tissu. C'est finalement la dérégulation du système immunitaire qui conduit à une inflammation chronique intestinale (Roda et al. 2020). (Figure 25)

(1) Altérations de la barrière intestinale

De nombreuses altérations de la barrière intestinale sont décrites comme étant associées à la MC, puisqu'elles favorisent l'invasion de microorganismes pathogènes.

Le mucus est décrit comme l'une des premières défenses de cette barrière et dont l'altération est associée au développement de MICI (Moehle et al. 2006). Le mucus est sécrété par les cellules de Goblet et composé principalement de mucine, dont la MUC2. Moehle *et coll.* ont étudié l'expression d'ARN messagers codant pour différentes MUC au sein de biopsies

intestinales de patients atteints de la MC. Ils ont démontré une diminution de l'expression de ces messagers, en particulier pour l'ARNm codant pour MUC2. Cette modification de l'expression de MUC2 est particulièrement associée au développement de la MC (Moehle et al. 2006). Ces anomalies de composition du mucus pourraient favoriser la fixation de pathogènes opportunistes au niveau de l'épithélium intestinal. (Figure 25)

Il est décrit que l'intégrité de l'épithélium intestinal diminue chez les patients atteints de la MC. Tout d'abord, la cohésion entre les cellules épithéliales assurée par les complexes jonctionnels est altérée. En effet, plusieurs études montrent une diminution de l'expression des protéines impliquées dans ces complexes, telles que les occludines et les cadhérines (Schulzke et al. 2009 ; Chelakkot et al. 2018). De plus, l'imperméabilité de la barrière intestinale est aussi altérée par l'augmentation de la mort des cellules épithéliales par apoptose (Schulzke et al. 2006 ; 2009). Pour finir, les fonctions des cellules de Paneth sont altérées chez les patients. Plusieurs études rapportent en effet que ces cellules présentent un défaut de sécrétion de peptides antimicrobiens (Wehkamp et al. 2004 ; Harris et al. 2006), mais aussi de lysozymes (Cadwell et al. 2010), diminuant leur capacité à lutter contre les microorganismes pathogènes. Ces différentes altérations favorisent l'entrée de bactéries opportunistes au sein de l'épithélium et c'est en réponse à ces infiltrations, qu'un excès de cytokines pro-inflammatoires est sécrété dans le tissu épithélial. (Figure 25)

(2) La dysbiose

L'augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal permet à diverses bactéries pathogéniques de s'infiltrer dans l'épithélium, créant ainsi un déséquilibre entre bactéries commensales et pathogéniques, on parle alors de dysbiose (Morgan et al. 2012b ; Rahmouni et al. 2016). La dysbiose semble être un élément déterminant dans la physiopathologie de la maladie de Crohn. En effet, au cours de ce processus deux événements sont particulièrement rapportés : la diminution de la biodiversité des bactéries au niveau de la barrière intestinale, en particulier la baisse des bactéries « protectrices » telles que les Firmicutes (Sokol et al. 2008), et l'augmentation de différentes populations de bactéries pathogéniques, telles que les Bactéroïdes et les Entérobactéries (Lapaquette et al. 2010 ; 2012 ; Sadabad et al. 2015). Il est intéressant de noter que ce sont les entérobactéries de types *Escherichia Coli* adhérentes et invasives (ou AIECs pour Adherent and Invasive Escherichia Coli) qui sont retrouvées de façon prépondérante au niveau de l'iléon des patients atteints de la MC (Darfeuille-Michaud et al. 2004 ; Lapaquette et al. 2010 ; 2012). Ces AIECs sont notamment capables d'infecter et de proliférer au sein des macrophages présent dans la muqueuse (Glasser et al. 2001 ; Lapaquette, et al. 2012 ; Buisson et al. 2019), mais aussi des cellules épithéliales (Darfeuille-Michaud et al. 2004 ; Lapaquette et al. 2010 ;

Nguyen et al. 2014 ; Larabi et al. 2020b). Ce défaut de contrôle des bactéries est notamment en lien direct avec un défaut d'autophagie au sein de ces cellules. De manière intéressante, Nguyen *et coll.* ont montré que les AIECs étaient capable d'induire l'inhibition de la xénophagie dans des cellules épithéliales infectées. En effet, ces bactéries entraînent une augmentation de l'expression de deux microARNs (ou miR), le miR30C et le miR130A dans les cellules infectées, qui bloquent l'expression des protéines autophagiques ATG5 et ATG16L1. Par conséquent, cela inhibe le processus autophagique dans les cellules épithéliales étudiées, favorisant la prolifération des AIECs. L'équipe a démontré que l'augmentation de l'expression de ces microARNs passe par l'activation de la voie NF- κ B, en particulier la sous-unité p65, stimuler à la suite de l'infection (**Nguyen et al. 2014**). De plus, il a été montré récemment que des exosomes contenant ces deux microARNs sont sécrétés par les cellules infectées par des AIECs, puis intégrés par les cellules environnantes, propageant ainsi l'inhibition du processus autophagique au profit de la prolifération des bactéries (**Larabi et al. 2020b**). (**Figure 25**)

Finalement, les bactéries capables de pénétrer dans l'épithélium intestinal, puis de proliférer vont initier le déclenchement d'une réponse inflammatoire au sein de la muqueuse. Il est fort probable que la dysbiose soit l'un des facteurs clé de l'initiation, mais aussi de la persistance de la maladie (**Larabi et al. 2020**).

c) Mise en place d'une réponse inflammatoire chronique

Les MICI sont caractérisées par une dérégulation du système immunitaire qui touche aussi bien l'immunité innée que l'immunité adaptative. Ces anomalies perturbent l'équilibre entre tolérance et inflammation au sein du tissu intestinal, au profit d'une réponse inflammatoire disproportionnée. Chez les patients atteints de la MC, il y a une persistance de cette inflammation au niveau de la muqueuse intestinale, on parle alors d'inflammation chronique.

(1) Dérégulation de la réponse immunitaire innée

L'affaiblissement de la barrière intestinale et la dysbiose favorisent les contacts entre le microbiote intestinal et les cellules de l'immunité innées. De nombreuses mutations génétiques associées à la réponse immunitaires innées favorisent la prolifération de microorganismes pathogènes, qui est l'origine de l'initiation et de l'amplification de la réponse inflammatoire.

(a) Défaillance des systèmes de détection des microorganismes

Dans la maladie de Crohn, plusieurs mutations génétiques identifiées sont associées à des gènes codant pour des récepteurs de l'immunité inné (**Harris et al. 2006**), des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des microorganismes pathogènes. Par conséquent, ces mutations peuvent réduire leurs détections au niveau de la barrière intestinale. En effet, un

polymorphisme du gène codant pour le récepteur TLR-4 a été identifié chez les patients atteints de la MC. Il est notamment associé à une baisse d'expression du récepteur, qui a pour conséquence une augmentation de la prolifération de bactéries Gram⁺ (Franchimont et al. 2004). Par ailleurs, les DCs intestinales sont particulièrement sensibles à ces mutations qui affectent leurs capacités de détection de PAMPs. En effet, certains polymorphismes des gènes codant pour les récepteurs NOD (NOD-1 et NOD-2) ont été identifiés comme étant associés à un défaut de détection et d'élimination des bactéries pathogéniques par les DCs humaines, favorisant une augmentation de leur prolifération au sein du tissu intestinal (Cooney et al. 2010a). (Figure 25)

D'autres cellules, comme les cellules épithéliales présentent aussi des défauts d'élimination de bactéries pathogéniques associés à un défaut d'expression de PRRs. En effet, Wehkamp *et coll.* ont étudié des cellules de Paneth extraites de tissus de patients atteints de la MC et exprimant l'un des polymorphismes du récepteur NOD-2. Ils ont montré qu'à la suite d'une stimulation de ce récepteur, les cellules mutées exprimaient moins de défensines en comparaison des cellules non-mutées. En effet, le polymorphisme étudié bloque la signalisation induite par la stimulation du récepteur, qui passe par le facteur de transcription NF- κ B, qui contrôle l'expression des peptides antimicrobiens (Wehkamp et al. 2004 ; Voss et al. 2006). Cette réduction de production de défensines participe à la prolifération de bactéries pathogènes. (Figure 25)

(b) Initiation et amplification de la réponse inflammatoire par les cellules de l'immunité innée

De nombreuses mutations associées aux PRRs peuvent initier et amplifier la réponse inflammatoire (Harris et al. 2006). Il a été décrit que dans la MC, les DCs intestinales sont particulièrement activées au niveau de sites intestinaux inflammatoires (Mowat. 2003). En effet, les DCs humaines étudiées expriment fortement le marqueur CD40, associé à l'activation et la maturation des DCs, mais aussi les récepteurs TLR-2 et TLR-4, associé à une augmentation de la détection des bactéries pathogéniques. L'étude montre que ces DCs sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, en particulier de l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-23, capables d'engendrer des réponses T de type Th1 et Th17 (Hart et al. 2005). La « suractivation » de ces DCs favorise donc la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire de grande ampleur. (Figure 25)

De manière complémentaire, il a été montré que lorsque l'un des polymorphismes de NOD-2, induisant un défaut fonctionnel du récepteur, est exprimé dans des splénocytes de souris, cette expression augmente la signalisation induite par le TLR-2. En effet, ce polymorphisme bloque la régulation négative de la signalisation du TLR par le récepteur NOD. Ce phénotype est associé à une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B et de la production de cytokines pro-

inflammatoires, telles que l'IL-12, l'IL-18 et le TNF- α , en réponse à une stimulation du TLR-2 (Watanabe et al. 2004). De plus, des études faites sur la prévalence d'infections par des AIECs au sein de l'épithélium de patients atteints de la MC, ont montrés que ces infections étaient associées à la mise en place d'une réponse inflammatoire importante par les cellules de l'immunité innée. En effet, les équipes des Dr. Buisson et Lapaquette ont montrés que des macrophages infectés par des AIECs sécrètent une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β (Buisson et al. 2019), l'IL-6 (Lapaquette et al. 2012), mais aussi le TNF- α (Lapaquette et al. 2012 ; Buisson et al. 2019), en réponse à l'infection. Pour finir, des polymorphismes de la voie du TNF- α ont été mis en évidence chez les patients atteints de la MC, dont certains induisent une augmentation de la sécrétion de TNF- α par des cellules immunitaires ou encore des cellules épithéliales (Wilson et al. 1997 ; Sashio et al. 2002). De manière complémentaire, des mutations ont été retrouvées dans des gènes codant pour les récepteurs du TNF, dont certaines sont associées à une augmentation locale de l'inflammation dans le tissu intestinal, médié par une « suractivation » de la signalisation induite par la stimulation du récepteur (Sashio et al. 2002 ; Qasem et al. 2019). Il est intéressant de noter que le TNF- α est l'une des cytokines pro-inflammatoire centrales de la physiopathologie de la maladie (Maloy et Powrie. 2011 ; Neurath. 2014). En effet, elle est produite par de nombreuses cellules au sein de l'épithélium, comme les macrophages, les LTs, les DCs ou encore les fibroblastes (Neurath 2014a). Les conséquences de sa sécrétion sont multiples, à savoir : elle engendre la mort des cellules de Paneth ou encore des IECs ce qui facilite la dysbiose intestinale, elle favorise aussi la survie des LT effecteurs et des macrophages pro-inflammatoires (de type M1) ce qui amplifie la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le tissu, et elle permet d'augmenter l'angiogenèse et la vascularisation du tissu afin de recruter d'avantage de cellules immunitaires au site enflammé, ce qui dans l'ensemble augmente l'inflammation au sein de l'épithélium intestinal (Neurath 2014a). De ce fait, de nombreux traitements anti-TNF ont été développés pour contrôler l'inflammation, notamment chez les patients exprimant un ou plusieurs polymorphisme(s) de la voie du TNF (Qasem et al. 2019). (Figure 25)

(2) Dérégulation de la réponse immunitaire adaptative

Dans la maladie de Crohn on constate un déséquilibre entre la quantité de LT effecteurs et LT régulateurs. En effet, les différents évènements décrit ci-dessus favorisent la « suractivation » des APCs, en particulier des DCs intestinales, qui vont alors engendrer des réponses immunitaires adaptatives spécifiques de l'antigène pour lutter contre l'infiltration massive des microorganismes pathogènes. L'activation de réponses T effectrices participe à la fois à l'initiation

et à l'amplification des réponses inflammatoires chez les patients, à l'origine du développement et de la persistance de la maladie. (Figure 25)

(a) Mise en place de la réponse T cytotoxique : initiation de la formation des lésions intestinales

Les docteurs Boschetti et Nancey, deux gastroentérologues qui font partie de notre équipe, ont montré que les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs spécifiques de l'antigène font partie des cellules qui initient la mise en place de l'inflammation (Nancey et al. 2006 ; Boschetti et al. 2016). En effet, ces LT CD8⁺ cytotoxiques sont recrutés et activés par les DCs intestinales au sein du tissu infecté, et vont alors sécréter une grande quantité de granzyme B, délétère pour les cellules épithéliales, mais aussi de TNF- α , d'IL-23 et d'IL-17. Les fonctions du TNF- α ont été décrites ci-dessus comme étant à la fois initiatrices et amplificatrices de la réponse inflammatoires. L'IL-23 participe quant à elle à la polarisation de LT de type Th17, des LT effecteurs producteurs d'IL-17. Pour finir il a été montré que ces LT CD8⁺ cytotoxiques sont responsable de la formation et du maintien des lésions du tissu intestinales (Nancey et al. 2006 ; Boschetti et al. 2016). (Figure 25)

(b) Mise en place de la réponse T auxiliaire : mise en place de la chronicité de la maladie

Diverses études rapportent la prévalence des LT CD4⁺ de type Th1 et Th17 au niveau du tissu intestinal enflammé pour une minorité de LT CD4⁺ régulateurs (Gálvez 2014 ; Ahluwalia et al. 2018b).

Les lymphocytes T effecteurs de type Th1 et Th17 sont majoritairement activés par les DCs intestinales, puis recrutés et maintenu aux sites enflammés. Ils vont sécréter de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ , TNF- α et IL-17, et sont principalement responsables de l'amplification de l'inflammation au sein du tissu. La présence de LT Th17 est particulièrement associée aux MICI (Gálvez 2014). Il est décrit que ces cellules ont une activité inflammatoire importante passant par la production d'IL-17 (IL-17A et IL-17F), une cytokine pro-inflammatoire sécrétée en réponse aux infections bactériennes (Fujino et al. 2003). Au regard de ces fonctions dans la réponse anti-infectieuse, l'IL-17 est décrit comme étant essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Cependant, il est aussi fortement délétère dans le cadre de la maladie, puisqu'il favorise, notamment, le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires, comme les macrophages et les neutrophiles, et stimulent leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, l'IL-18 et le TNF- α (Fujino et al. 2003 ; Gálvez. 2014). Dans la physiopathologie de cette maladie, l'IL-17 est à la fois impliqué dans l'amplification et la maintenance de la réponse inflammatoire.

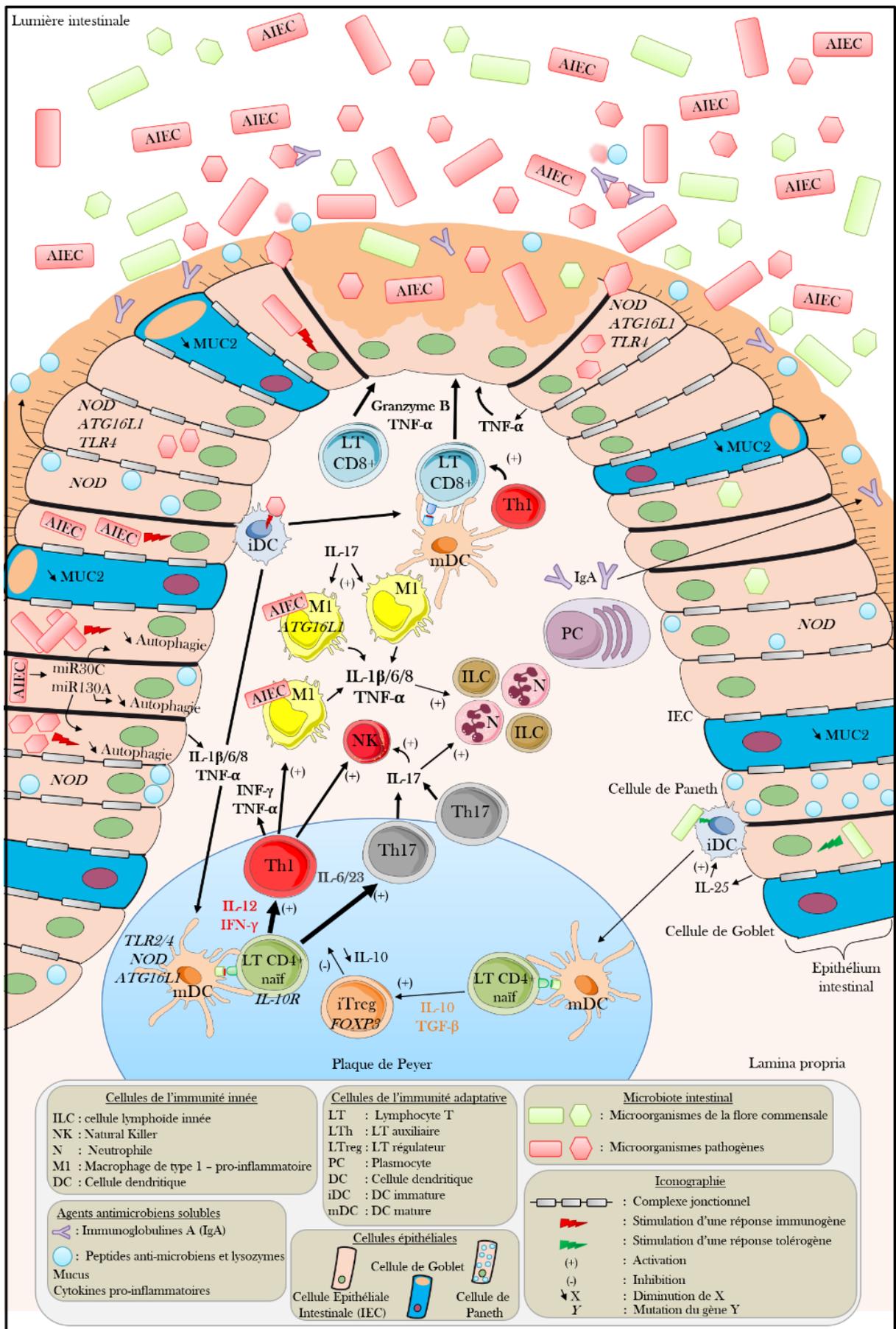


Figure 25 : Immunobiologie intestinale d'un patient atteint de la maladie de Crohn

De nombreuses mutations génétiques ont été identifiées chez les patients atteints de la maladie de Crohn affectant le processus autophagique (comme le gène codant pour ATG16L1), la détection des microorganismes (les gènes codant pour des TLRs, ou NOD), ou encore la sécrétion du mucus (le gène codant pour MUC2). La combinaison de facteurs génétiques et environnementaux altère l'intégrité de la muqueuse intestinale qui conduit à un déséquilibre de la flore, appelée dysbiose. Ce déséquilibre favorise l'invasion et la prolifération massive de microorganismes pathogènes, telle que l'entérobactérie Escherichia Coli adhérente et invasive (ou AIEC). Les diverses infections de la muqueuse intestinale activent des réponses pro-inflammatoires au sein du tissu. Ces réponses sont initiées par les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée (tels que les MI et DCs) qui sont en contact direct avec les pathogènes. La persistance des infections conduit à la mise en place de réponses immunitaires adaptatives spécifiques (médiées par les DCs, LT CD8⁺ cytotoxiques, LT CD4⁺ Th1/17) qui amplifient la réponse inflammatoire globale du tissu. La dérégulation du système immunitaire est initiée par une rupture de tolérance qui favorisent la dérégulation, puis la persistance de l'inflammation, qui conduit à la chronicité de la maladie.

De plus, il est intéressant de noter que plusieurs polymorphismes du récepteur à l'IL-23 sont associés à la MC comme étant bénéfique pour les patients (Duerr et al. 2006). En effet, l'engagement de ce récepteur dans les LT induit leur différenciation et leur polarisation en LT de type Th17, et stimule la production d'IL-17 dépendante des voies de signalisation NF- κ B et STAT3 (Cho et al. 2006). Les variants du gène codant pour l'IL-23R sont associés à une perte de fonction du récepteur, qui conduit à une diminution de l'activation des LT Th17 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le tissu intestinal (Sivanesan et al. 2016). Ces polymorphismes ont donc un effet protecteur contre le développement de la maladie. (Figure 25)

Pour finir, les LT régulateurs sont différenciés et polarisés grâce aux cytokines TGF- β et IL-10 sécrétés par les APC, en particulier par les DCs intestinales (Mowat. 2003). Chez les patients atteints de la MC, des mutations ont été retrouvées dans des gènes codant pour des protéines essentielles à la différenciation des LT en LTregs. En effet, des polymorphismes sur le gène codant pour le facteur de transcription Foxp3 qui permet la différenciation des LT naïfs en LTregs. Ces polymorphismes induisent une diminution de l'expression de Foxp3 chez les patients, avec pour conséquence une diminution de la génération de LTregs. Ils ont donc été associés à une augmentation du risque de développer la maladie (Xia et al. 2019). Par ailleurs, les LTregs ont des fonctions immuno-régulatrices. De ce fait, ils sont capables de réduire l'inflammation dans un tissu via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10. (Figure 25)

La stimulation de l'IL-10R exprimée par certaines cellules immunitaires, dont les LT effecteurs de type Th1, Th2 ou encore Th17, réduit leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Glocker et al. 2009). En 2009, l'équipe de Glocker a identifié différentes mutations de gènes codants pour des récepteurs à l'IL-10, dans des cellules immunitaires de patients atteints de MICI. Ces mutations bloquent la transduction du signal induite par la stimulation du récepteur et dépendante du facteur de transcription STAT3. En absence de ce signal immunosuppresseur, les cellules immunitaires mutées sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α (Glocker et al. 2009). (Figure 25)

Finalement tous ces éléments sont en faveur d'un déséquilibre vers une réponse immunitaire pro-inflammatoire chez les patients atteints de la MC. Cette hyper-inflammation du tissu intestinal est maintenue par la baisse d'immunosuppression, qui tend vers la chronicité de la maladie.

3. Impact des polymorphismes autophagiques dans la maladie de Crohn

L'autophagie est un processus catabolique essentiel à la biologie des cellules de notre organisme. De ce fait, il permet entre autres de maintenir l'homéostasie et les fonctions de la muqueuse intestinale (Lees et al. 2011 ; Iida et al. 2017).

Des études réalisées sur le « génome entier » humain (ou GWAS pour Genome-Wide Association Studies) ont permis de mettre en évidence des polymorphismes de gènes autophagiques, ou associés à l'autophagie, dont l'incidence est fortement associée à un risque fort de développer la maladie de Crohn. Un polymorphisme est une variation de séquence d'un gène donné que l'on retrouve au niveau d'un ou plusieurs allèle(s). Une centaine de ces polymorphismes sont des SNPs, où la mutation est portée par un seul nucléotide. Cette variation peut être homozygote (portée par les deux allèles) ou hétérozygote (portée par un seul allèle) (Hugot et al. 2001 ; Hampe et al. 2007 ; Parkes et al. 2007 ; Rioux et al. 2007).

Pour bien comprendre l'importance de l'autophagie dans cette maladie, nous allons détailler dans cette partie l'impact des polymorphismes autophagiques sur la MC. Les polymorphismes majeurs seront décrits dans un premier temps, puis quelques études seront décrites afin de présenter les autres polymorphismes, moins étudiés à ce jour.

Le premier gène autophagique de prédisposition à la MC mis en évidence est le gène codant pour le récepteur NOD-2 (ou appelé CARD25) (Hugot et al. 2001). Cette protéine est un récepteur de l'immunité innée (voir partie II.2.a(3) Les récepteurs Nod (NLRs)), dont l'activité est associée au processus autophagique, via son interaction avec la protéine autophagique ATG16L1 (Travassos et al. 2010). Par la suite, ce sont les gènes codant pour ATG16L1 et IRGM,

deux protéines de la machinerie autophagique, qui ont été décrits comme gènes de susceptibilité à la MC (**Hampe et al. 2007 ; Parkes et al. 2007 ; Rioux et al. 2007**).

a) **NOD-2**

La protéine NOD-2 fait partie de la famille des NLRs qui sont des récepteurs de l'immunité innée cytosolique, capables de reconnaître des PAMPs intracellulaires, tels que le peptidoglycane présent sur les parois des bactéries. Après détection d'un peptide bactérien, ce récepteur a la particularité de pouvoir recruter le conjugué ATG16L1-ATG5-ATG12 via son interaction avec la protéine autophagique ATG16L1, à la membrane plasmique, ce qui favorise le recrutement de la machinerie autophagique, et la dégradation de l'élément détecté (**Travassos et al. 2010**).

Plusieurs polymorphismes de NOD-2 ont été identifiés sur le chromosome 16, dont trois d'entre eux ont été particulièrement étudiés pour leur forte association à un risque de développer la MC: le SNP rs2066844 R702W qui correspond à la substitution d'une arginine (R ou Arg) avec un tryptophane (W ou Trp) en position 702, le SNP rs2066845 G908R qui correspond à la substitution d'une glycine (G ou Gly) avec une arginine (R ou Arg), et le SNP rs41450053 L1007fsinsC qui correspond à l'insertion d'une cystéine (C ou Cys) au niveau de l'exon 10, après la position 1007 (**Hugot et al. 2001**). Il est intéressant de noter que le SNP L1007fsinsC aboutit à une protéine NOD-2 tronquée (**Hugot et al. 2001**). Ces variations sont localisées au niveau du domaine riche en leucine (ou LRR) du récepteur, altérant ses capacités de détection des PAMPs (**Strober et Watanabe. 2011**).

NOD-2 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie du tissu intestinal, via un contrôle de la réplication des bactéries intracellulaires et la maintenance de la tolérance immunitaire.

(1) **Impact sur le microbiote intestinal**

Au regard de ces fonctions dans l'immunité innée, NOD-2 participe à la lutte antimicrobienne et au contrôle de la prolifération des microorganismes pathogènes. En 2010, Cooney *et coll.* démontrent que la stimulation de DCs humaines avec du MDP (pour Muramyl-dipeptide, un peptide d'origine bactérienne), ou encore les bactéries *E.Coli* ou *S.Enterica*, active le récepteur NOD-2 capable d'induire de la xénophagie envers ces éléments bactériens (**Cooney et al. 2010**). Lorsque ces DCs expriment l'un des trois polymorphismes de NOD-2, R702W ou G908R ou encore L1007fsinsC, et sont infectées avec les divers éléments bactériens présentés ci-dessus, elles sont alors incapables de les reconnaître. Le récepteur n'étant pas stimulé, l'autophagie est alors moins activée, ce qui permet aux bactéries de persister et de se répliquer (**Cooney et al. 2010**). Une étude complémentaire, confirme l'impact du polymorphisme L1007fsinsC sur la modulation de l'activation de la xénophagie. En effet, lorsque

ce SNP est exprimé dans une lignée de cellules épithéliales, cela bloque l'activation du processus autophagique, après infection par la bactérie intracellulaire *Shigella Flexneri* (Travassos et al. 2010). L'étude montre qu'en l'absence de reconnaissance de la bactérie, la protéine autophagique ATG16L1 n'est alors pas recrutée au niveau de la membrane plasmique, où se situe le site d'entrée de la bactérie (Travassos et al. 2010). Pour finir, Homer *et coll.* ont étudié l'impact de ces polymorphismes de NOD-2 dans diverses lignées cellulaires, mais surtout dans des cellules primaires humaines (MoDCs et MDMs). Cette équipe confirme les résultats obtenus dans les deux autres études, où les cellules exprimant l'un des variants de NOD-2 ne sont pas capables d'activer de l'autophagie médiée par le recrutement d'ATG16L1 (Homer et al. 2010). En effet, sans le recrutement d'ATG16L1 il ne peut y avoir de conjugaison de la protéine LC3, qui est essentielle à la formation du phagophore et de l'autophagosome (voir partie I.3.b. L'élongation du phagophore). (Figure 26)

Par conséquent, l'expression des polymorphismes de NOD-2 favorise la dysbiose et l'invasion de bactéries pathogéniques, qui est en faveur du développement de la maladie de Crohn.

(2) Impact sur la réponse immunitaire

En tant que récepteur de l'immunité innée, l'engagement de NOD-2 permet d'activer une réponse immunitaire spécifique, passant par la sécrétion de cytokines ou l'activation de cellules de l'immunité adaptative.

Tout d'abord, Cooney *et coll.* ont démontré que l'activation de DCs humaines passant par la stimulation du récepteur NOD-2, induit la présentation de peptides antigéniques d'origine intracellulaires et issu d'une dégradation par autophagie, via les molécules du CMH-II. La présentation antigénique permet, par la suite, d'activer des LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène (Cooney et al. 2010). L'expression d'un des trois polymorphismes de NOD-2 (présentés ci-dessus) est suffisant à réduire l'expression des molécules de CHM-II à la membrane plasmique dans des DCs infectées par *E.Coli*. En effet, l'absence de détection de la bactérie par le récepteur NOD-2, réduit aussi son ciblage par les protéines autophagiques, médié par l'absence de recrutement d'ATG16L1 (Cooney et al. 2010). Par conséquent, cela réduit aussi les capacités d'activation des LTs naïfs par ces DCs. (Figure 26)

Par ailleurs, le récepteur NOD-2 est capable de réguler négativement la signalisation induite par l'engagement du TLR-2 afin de contrôler l'induction de la réponse inflammatoire (Watanabe et al. 2004). En effet, lors de la stimulation du TLR-2, la transduction du signal induit entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ , IL-12 et IL-18. Il a été montré que l'expression du polymorphisme L1007fsinsC de NOD-2, dans des splénocytes de

souris, altère cette régulation négative par le NLR et favorise la transduction du signal induite par la stimulation du TLR. La transduction du signal est associée à une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B, et par conséquent de la sécrétion d'une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-12, l'IL-18 et le TNF- α (Watanabe et al. 2004).

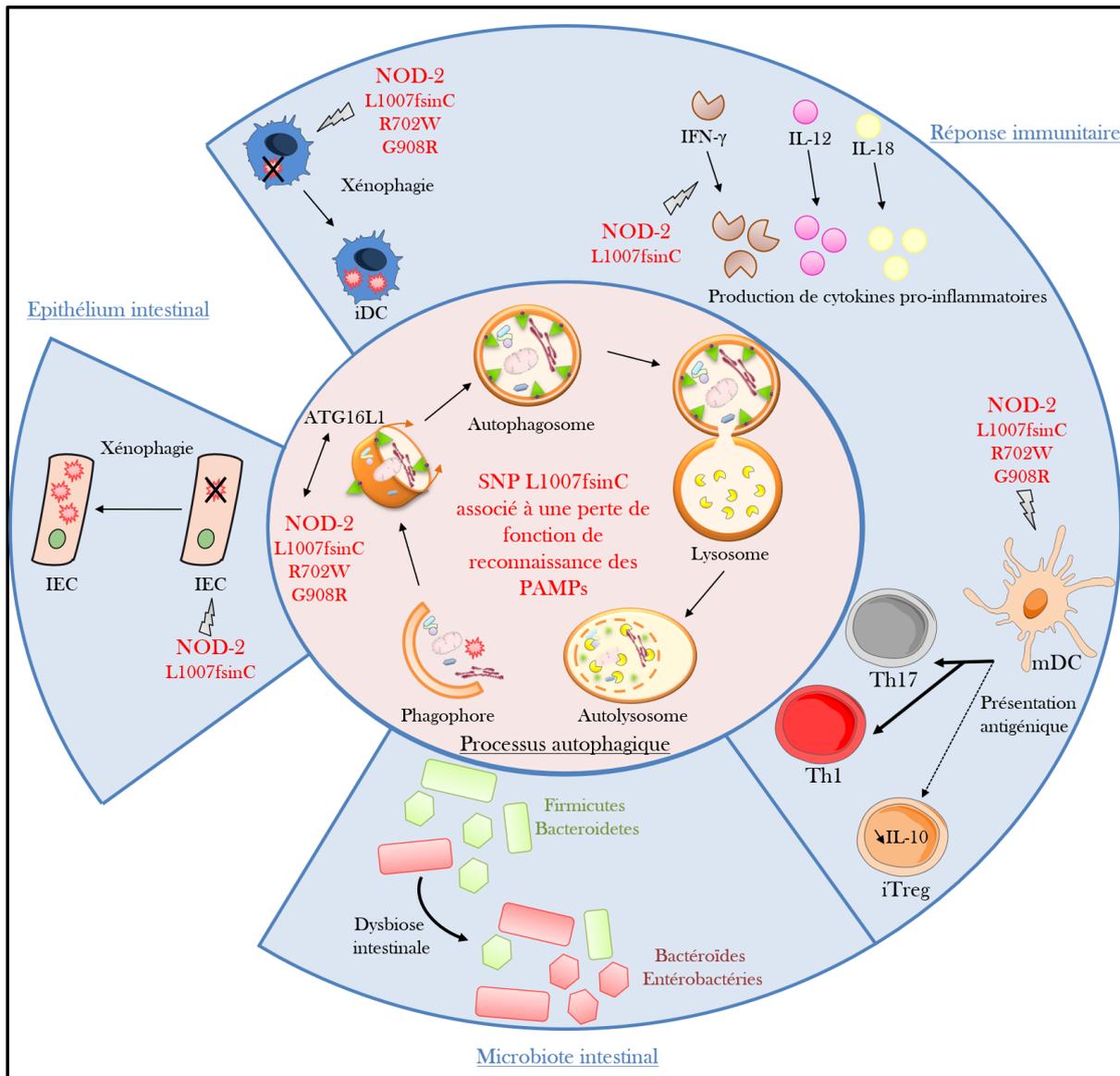


Figure 26 : Impact des polymorphismes de NOD-2

NOD-2 est un récepteur de l'immunité innée, dont la fonction est de détecter des microorganismes intracellulaires. Ce NLR interagit avec le système autophagique en recrutant la protéine ATG16L1 au niveau du site d'entrée du pathogène, afin qu'il soit éliminé par autophagie. Les polymorphismes de *NOD-2* associés à la MC conduisent à un défaut d'autophagie de manière indirecte au sein des cellules de la muqueuse intestinale. Ce défaut est en faveur d'altérations de l'épithélium intestinal, du microbiote, mais aussi de la réponse immunitaire. Ainsi, il a été décrit diverses (1) altérations de la détection et l'élimination des microorganismes pathogènes par les cellules épithéliales intestinales et les cellules dendritiques immatures, qui favorisent (2) la dysbiose intestinale et (3) la mise en place de réponses inflammatoires au sein du tissu intestinal (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, réduction de l'activation des réponses T régulatrices au profit de réponses T de type Th1/Th17).

L'expression de ce polymorphisme est donc en faveur du développement de la MC, via l'induction et/ou la persistance de l'inflammation dans le tissu intestinal. (Figure 26)

Au regard de ces fonctions de récepteur de l'immunité innée, la fonctionnalité de NOD-2 est essentielle au maintien de l'homéostasie du tissu intestinal. Il permet entre autres de contrôler la prolifération des bactéries intracellulaires, par l'intermédiaire de la xénophagie mais aussi via la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique.

b) ATGL16L1

La protéine ATG16L1 (pour Autophagy-related 16 Like 1) est une protéine essentielle du processus autophagique. Elle intervient au cours de l'étape d'élongation du phagophore, dont la fonction est de permettre au conjugué ATG12-ATG5 de se lier à la membrane du phagophore. C'est finalement le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 qui permet de conjuguer le PE à LC3-I pour former LC3-II. La formation du LC3-II est nécessaire à l'élongation du phagophore afin d'aboutir à la formation de l'autophagosome (voir partie I.3.b. L'élongation du phagophore).

Différents polymorphismes d'ATG16L1 ont été identifiés, mais un seul est associé à un risque élevé de développer la maladie de Crohn, le SNP rs2241880 T300A. Ce SNP est le plus étudié chez l'homme à ce jour, et correspond à la substitution d'une thréonine (Thr ou T) par une alanine (Ala ou A) au niveau du gène ATG16L1 en position 300, situé sur le chromosome 2. Ce variant induit une modification du domaine WD-repeat en C-terminal, un domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine. Ce SNP induit une perte de fonction de la protéine ATG16L1, ce qui altère le fonctionnement du processus autophagique (Hampe et al. 2007 ; Rioux et al. 2007).

Chez les patients, le SNP T300A est associé à une altération de l'homéostasie et des fonctions des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, mais aussi de la réponse antimicrobienne passant un défaut d'élimination des microorganismes invasifs, telles que les bactéries intracellulaires (Larabi et al. 2020b).

(1) Impact sur les cellules de l'épithélium intestinal

L'autophagie est un mécanisme essentiel pour le maintien de l'homéostasie, mais aussi des fonctions des cellules de Paneth, présentes au niveau des cryptes intestinales (Larabi et al. 2020). Ce polymorphisme d'ATG16L1 induit un dysfonctionnement des cellules de Paneth, en particulier de leur capacité à médier une réponse antibactérienne. De manière intéressante, l'autophagie intervient pour former des vésicules LC3⁺ riches en lysozymes dans ces cellules. Ces lysozymes ont des fonctions antimicrobiennes et participent à l'élimination des bactéries pathogènes au niveau de la barrière intestinale. Par conséquent, lors d'une infection par

S.Typhimurium, les cellules de Paneth exprimant le SNP T300A d'ATG16L1, ne sont plus capables d'initier le processus autophagique, et donc de sécréter des lysozymes via l'autophagie sécrétoire (Bel et al. 2017). Par conséquent, ces cellules ne sont plus capables d'éliminer les bactéries (Bel et al. 2017). De façon complémentaire, deux études chez la souris ont montré que ce polymorphisme est associé à un défaut structurel et fonctionnel des cellules de Paneth. En effet, ces cellules présentent des compartiments granulaires désorganisés, associés à un défaut d'exocytoses des granules de lysozymes (Cadwell et al. 2010 ; Lassen et al. 2014). Ainsi, le polymorphisme d'ATG16L1 est en faveur de la dysbiose au sein du tissu intestinal, et donc du développement de la MC. (Figure 27)

Par ailleurs, une étude de coupes de colon de souris a montré que l'autophagie joue un rôle important dans la différenciation et la structuration des cellules de Goblet, qui sont altérées lorsque ces souris expriment le polymorphisme ATG16L1 T300A (Lassen et al. 2014). Ainsi, il y a une altération dans la sécrétion de mucus au niveau de la muqueuse intestinale, ce qui est en faveur de la dysbiose. (Figure 27)

(2) Impact sur le microbiote intestinal

L'autophagie est un mécanisme de défense essentiel dans la lutte antimicrobienne, permettant de dégrader directement certaines bactéries intracellulaires (Larabi et al. 2020). Plusieurs études faites chez l'homme montrent qu'un dysfonctionnement de l'autophagie, lié à l'expression du SNP T300A, diminue fortement les capacités d'élimination des microorganismes pathogènes, en particulier les bactéries intracellulaires. Tout d'abord une étude chez la souris a montré que la protéine ATG16L1 exprimée à partir du variant T300A était préférentiellement ciblée et dégradée par les caspases 3 et 7 (Lassen et al. 2014 ; Murthy et al. 2014). Par conséquent, l'autophagie globale est altérée, dont la xénophagie. En effet, ils observent que des DCs isolées de la rate de ces souris et infectées par la bactérie *Shigella flexneri* ne sont pas capables de l'éliminer efficacement par autophagie (Lassen et al. 2014). De plus, une étude réalisée *in vitro* en 2008 démontre un défaut d'élimination de la bactérie *Salmonella Typhimurium* dans des cellules épithéliales humaines exprimant le SNP T300A (Kuballa et al. 2008). Des résultats similaires ont été obtenus dans des DCs humaines extraites de patients ayant la maladie de Crohn et infectées par la bactérie *Salmonella Enterica* (Cooney et al. 2010). Pour finir, une étude réalisée à partir de macrophages dérivés de monocytes de patients Crohn, et exprimant ce SNP, a montré qu'ils avaient un défaut d'élimination des bactéries *Escherichia Coli* adhérentes et invasives (Vazelle et al. 2015). (Figure 27)

Par ailleurs, l'expression de ce polymorphisme altère l'équilibre du microbiote intestinal, favorisant la dysbiose. En effet, le défaut d'autophagie entraîne une sélection et prolifération de

bactéries non-commensales au niveau de la barrière intestinale, tout particulièrement d'entérobactéries (Lapaquette et al. 2010 ; 2012 ; Sadabad et al. 2015 ; Vazeille et al. 2015). En effet, l'équipe de Lapaquette a étudié la prolifération de plusieurs types de bactéries *Escherichia Coli* dans des macrophages et des cellules épithéliales humaines exprimant le variant T300A. L'équipe montre que l'absence d'autophagie favorise particulièrement la réplication et la survie des *Escherichia Coli* adhérentes et invasives (ou AIECs) (Lapaquette et al. 2010 ; 2012). De façon complémentaire, l'expression de ce variant est associé à un changement global de composition du microbiote intestinal chez les patients Crohn, favorisant la prolifération de *Bacteroides* (Sadabad et al. 2015 ; Lavoie et al. 2019), mais aussi de Fusobactéries (Sadabad et al. 2015), ou encore de certains virus (Cadwell et al. 2010). (Figure 27)

(3) Impact sur la réponse immunitaire

(a) Amplification de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, où le tissu intestinal est très enflammé. Le polymorphisme ATG16L1 T300A est associé à la mise en place d'une réponse inflammatoire anormale/dysproportionnée. En effet, l'infection de cellules humaines exprimant le variant T300A, par des AIECs, est associée à une production importante de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-6 (Lapaquette et al. 2012 ; Vazeille et al. 2015), ou encore l'IL-8 (Vazeille et al. 2015). Une forte production de TNF- α est décrite dans la littérature comme étant extrêmement délétère pour les patients Crohn. De ce fait, des biothérapies à base d'anti-TNFs ont été développées (Sashio et al. 2002). Ces thérapies favorisent l'activation de macrophages de type M2, impliqués dans la réponse anti-inflammatoire, de manière dépendante de l'autophagie (Levin et al. 2016). En effet, l'autophagie est essentielle à la différenciation et la survie de ces macrophages, dont la viabilité est fortement impactée lorsqu'ils expriment ce SNP. Ces résultats suggèrent l'importance de l'autophagie dans la réponse aux anti-TNFs. (Figure 27)

De plus, il est décrit que l'autophagie joue un rôle protecteur contre l'inflammation du tissu intestinal, en régulant particulièrement la mise en place de l'inflammasome, un complexe de protéines cytosolique responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-18 et l'IL-1 β (Takahama et al. 2018). Ce complexe est composé d'un récepteur, tel que AIM-2 ou NLR-P3, de l'adaptateur ASC et de la protéase caspase-1. Lorsque l'inflammasome est activé, ASC est ubiquitinylé ce qui permet à p62 de le fixer et de le dégrader par autophagie sélective. De plus, c'est la caspase-1 qui engendre la formation d'IL-1 β et d'IL-18. L'autophagie participe à la régulation de leur formation en éliminant les précurseurs de ces cytokines, les pro-

IL-1 β et pro-IL-18, afin de diminuer l'activation de l'inflammation (Takahama et al. 2018). De ce fait, une étude a montré que des macrophages de souris exprimant le SNP T300A sécrètent plus d'IL-1 β que les macrophages n'exprimant pas ce SNP. Cette sécrétion est associée à une activité plus importante de l'inflammasome, qui n'est alors pas régulé par autophagie. De plus, les souris T300A développent une maladie oculaire que l'on retrouve chez les patients atteints de la MC (Santeford et al. 2016). De façon complémentaire, Lassen *et coll.* ont montré que lorsque l'on infecte des DCs ou des macrophages extraits de tissus intestinaux de souris et exprimant ce SNP, ils sécrètent excessivement de l'IL-1 β (Lassen et al. 2014). (Figure 27)

(b) Impact sur l'orientation et l'activation de la réponse immunitaire adaptative

Comme je l'ai décrit dans la première partie, le développement de l'inflammation chronique chez les patients Crohn repose sur le déséquilibre entre la réponse tolérogène et immunogène. Ces deux types de réponses sont régulés par les APCs, en particulier les DCs intestinales. Afin de générer une réponse immunitaire adaptative, les DCs vont tout d'abord capturer et dégrader des antigènes afin de les présenter sous forme de peptides antigéniques. Cooney *et coll.* ont démontré, en 2010, que des DCs humaines qui expriment le polymorphisme T300A d'ATG16L1 ont un défaut de trafic et de présentation des antigènes bactériens, associé au défaut d'autophagie (Cooney et al. 2010). En effet, l'autophagie participe à la dégradation des antigènes, ainsi qu'à leur présentation aux LT. (Figure 27)

C'est lors de la présentation antigénique que les DCs interagissent avec les LTs afin d'activer la réponse immunitaire tolérogène ou immunogène. Wildenberg *et coll.* ont mis en évidence l'importance de l'autophagie dans la mise en place et la stabilisation de la synapse immunologique (Wildenberg et al. 2012). L'analyse de DCs de patients, ayant un défaut d'autophagie via l'expression du polymorphisme T300A d'ATG16L1, co-cultivé avec des LTs a montré un prolongement de l'interaction entre ces deux cellules. Ce prolongement est associé à un maintien de la synapse immunologique via l'absence d'autophagie dans les DCs (Wildenberg et al. 2012). De plus, l'équipe a observé une augmentation de l'activation et la polarisation de LT de type Th17 (Wildenberg et al. 2012). Une étude complémentaire a montré une augmentation de la proportion de LT de type Th1 et Th17 à la fois dans l'iléon et le colon de souris exprimant le variant T300A (Lavoie et al. 2019). Cet enrichissement est directement associé à la dysbiose et à la colonisation de Bacteroidetes dans l'intestin de ces souris, en condition inflammatoire via l'utilisation d'un traitement de DSS (pour Dextran Sulfate Sodium), qui provoque de la colite au niveau de la muqueuse intestinale. Ainsi le défaut d'autophagie dans les DCs humaines pourrait favoriser particulièrement la génération de LT Th1/Th17, ce qui est en faveur du développement

de la maladie. Par ailleurs, Chu *et coll.* ont observé une réduction des capacités d'activation et de différenciation de LTregs par des MoDCs humaines, générés à partir de monocytes de patients exprimant le SNP T300A, et infectés avec la bactérie commensale *B.Fragilis* (Chu *et al.* 2016). Il est intéressant de noter que dans des DCs qui n'expriment pas ce variant, cette bactérie utilise la voie de la phagocytose-associée à LC3 (ou LAP) afin de délivrer des fragments capsulaires bactériens dans les DCs, qui seront alors dégradés de manière dépendante de la protéine ATG16L1, mais indépendante de l'autophagie canonique. Cela permet finalement d'induire une réponse toléro-gène envers la bactérie, via l'activation de LTregs. (Figure 27)

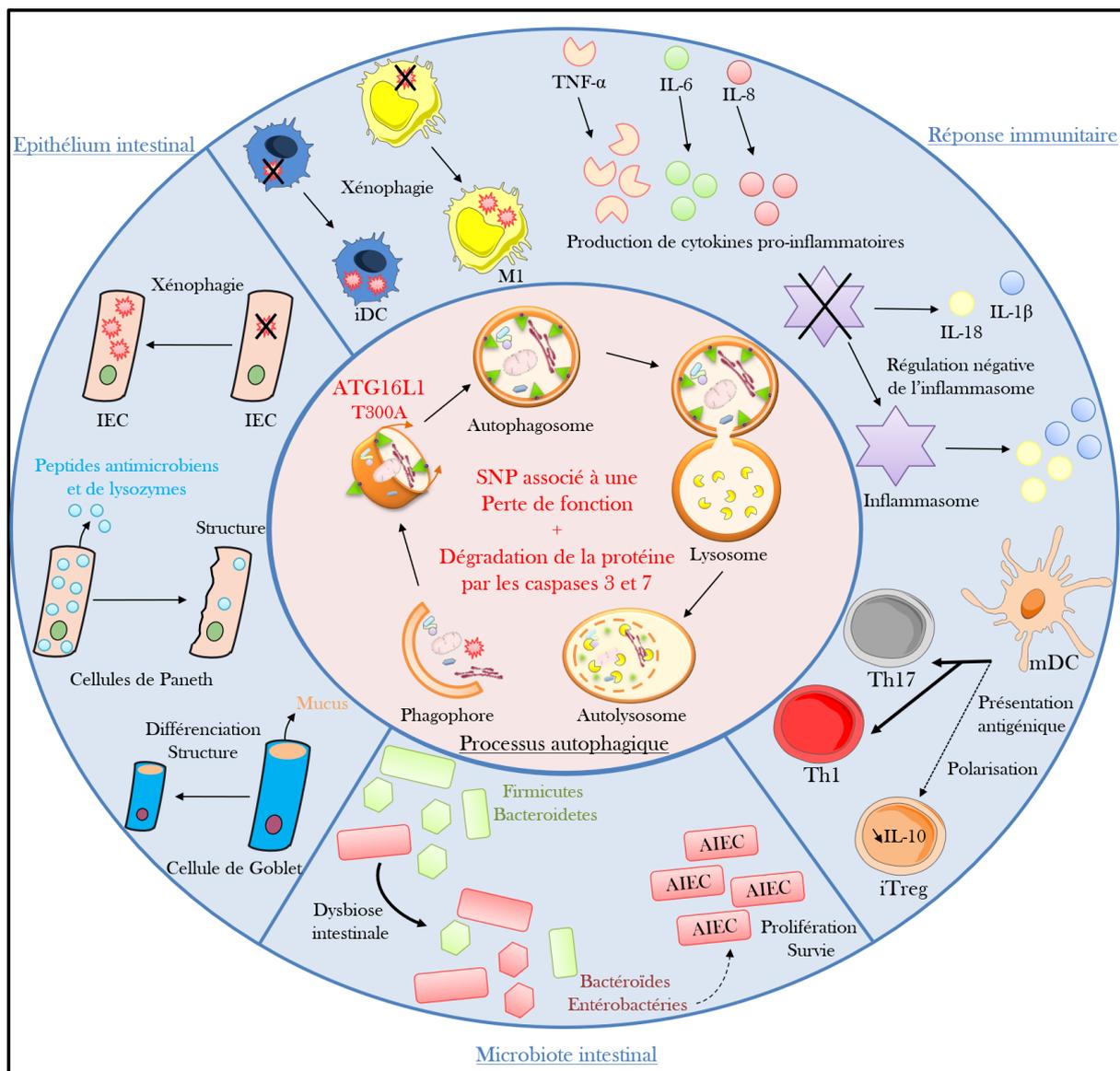


Figure 27 : Impact du polymorphisme T300A de ATG16L1

ATG16L1 est une protéine autophagique essentielle, qui intervient lors de l'élongation du phagosome. Le polymorphisme T300A d'*ATG16L1* est associé à une augmentation du risque de développer la MC, et conduit à un défaut d'autophagie de manière directe au sein des cellules de la muqueuse intestinale. Ce défaut est en faveur d'altérations de l'épithélium intestinal, du microbiote et de la réponse immunitaire.

Diverses études rapportent (1) des altérations de la structure et des fonctions des cellules épithéliales, ainsi que des (2) altérations de la détection et l'élimination des microorganismes pathogènes par les IECs et les cellules immunitaires (iDCs, MI). Ces modifications favorisent (3) la dysbiose intestinale (prolifération préférentielle des AIECs) et (4) la mise en place de réponses inflammatoires au sein du tissu intestinal (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, dérégulation de l'inflammasome, réduction de l'activation des réponses T régulatrices au profit de réponses T de type Th1/Th17).

Par conséquent, le dysfonctionnement de la protéine ATG16L1, médié par l'expression du variant T300A, conduit à l'activation de LT en majorité de type Th17 (Chu et al. 2016). De plus, la faible proportion de LTregs générés sécrète moins d'IL-10, une cytokine immunosuppressive (Chu et al. 2016). Le polymorphisme ATG16L1 T300A est donc associé à une réduction de l'induction de tolérance immunitaire envers les bactéries commensales de l'intestin.

Toutes ces études soulignent le rôle protecteur d'ATG16L1, via ses fonctions dans le processus autophagique, permettant de réguler l'homéostasie intestinale, et dont l'altération est en faveur du développement de la maladie et de la mise en place d'une réponse inflammatoire chronique.

c) IRGM

IRGM (pour Immunity-related guanosine triphosphatase family M) est une protéine de liaison au GTP, qui participe à la réponse immunitaire innée contre les pathogènes intracellulaires en favorisant notamment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire, tel que l'IFN-I, et en activant le processus autophagique. En effet, elle est capable d'interagir avec des protéines virales afin d'induire leur dégradation par autophagie (Singh et al. 2006 ; Grégoire et al. 2011). Notre équipe a notamment mis en évidence des interactions entre IRGM et diverses protéines autophagiques, telles que ATG5, ATG10 et MAP1LC3C (ou LC3C) (Grégoire et al. 2011).

Plusieurs polymorphismes du gène codant pour IRGM ont été mis en évidence comme étant associés à un risque de développer la MC, dont les SNPs rs13361189 et rs10065172 (Parkes et al. 2007 ; McCarroll et al. 2008 ; Palomino-Morales et al. 2009). Les SNPs rs13361189 (4299T>C) et rs10065172 (313T>C) sont des polymorphismes silencieux, situés au niveau du chromosome 5, et qui sont associés à une délétion de 20kb en amont du promoteur de IRGM (Parkes et al. 2007 ; McCarroll et al. 2008 ; Brest et al. 2011). Il est intéressant de noter que ces SNPs ne semblent pas affecter les fonctions de la protéine.

Au regard de ces fonctions dans le processus autophagique, IRGM semble jouer un rôle important dans l'élimination de pathogènes intracellulaires, telles que les bactéries AIECs ou

encore *Salmonella Typhimurium* (McCarroll et al. 2008 ; Brest et al. 2011). De manière intéressante le polymorphisme C313T d'IRGM est associé à une réduction de la xénophagie dans les lignées de cellules épithéliales analysées. A l'état basal l'expression d'IRGM est régulé négativement par un microARN, le miR-196 (miR-196A et miR-196-B), qui fixe la séquence d'ARNm d'IRGM afin qu'elle soit dégradée par le complexe RISC (Brest et al. 2011).

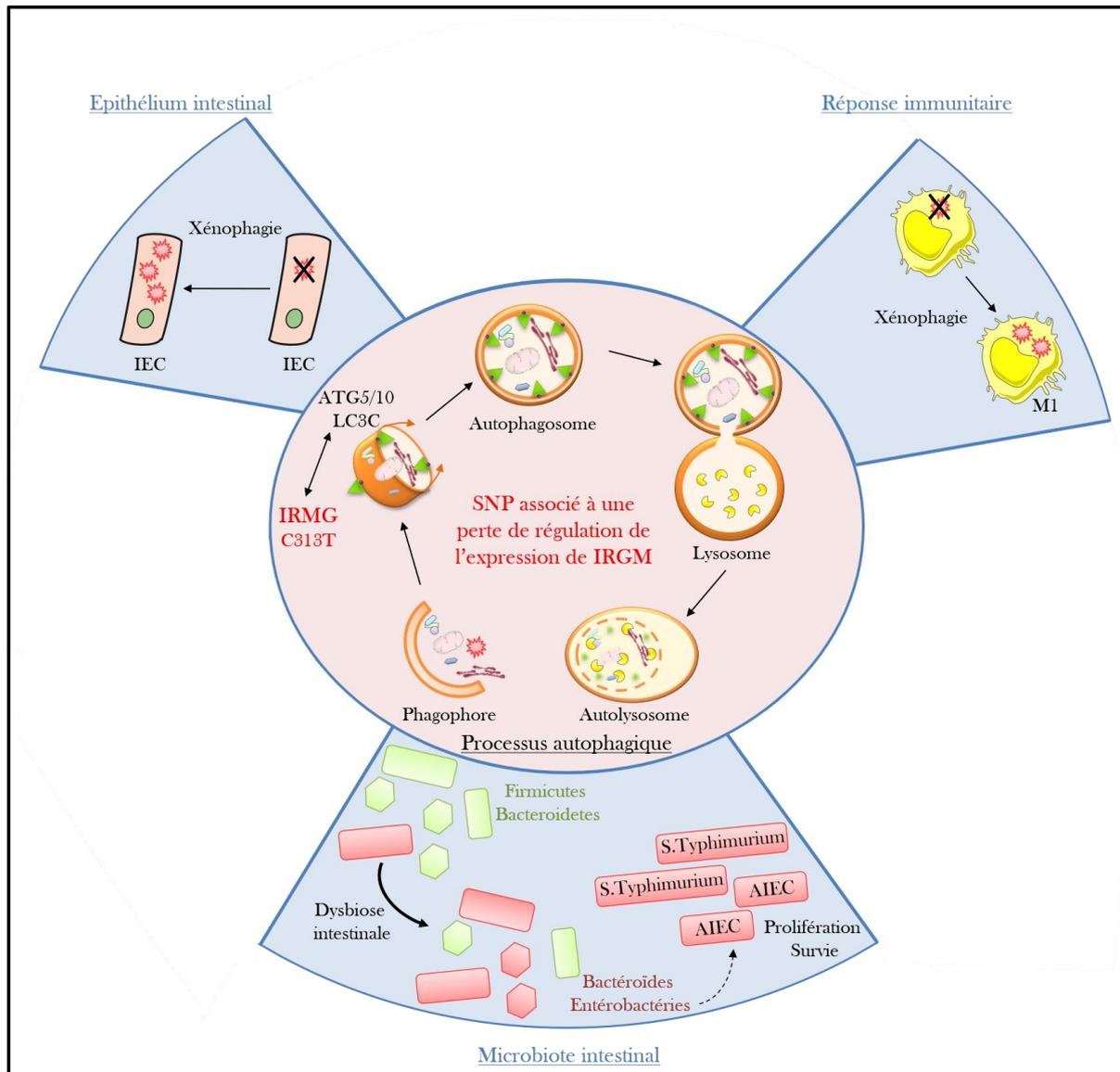


Figure 28 : Impact du polymorphisme C313T de IRGM

IRGM est une protéine de liaison au GTP, qui intervient lors de la réponse antimicrobienne en interagissant à la fois avec des microorganismes et avec des protéines autophagiques favorisant leur élimination. Le polymorphisme C313T d'*IRGM* est associé à la MC, et conduit à un défaut d'autophagie de manière indirecte au sein des cellules de la muqueuse intestinale. Ce défaut est en faveur d'altérations de l'épithélium intestinal, du microbiote et de la réponse immunitaire. Plusieurs études montrent (1) des altérations de la détection et l'élimination des microorganismes pathogènes par les IECs et les macrophages, qui favorisent (2) la dysbiose intestinale (prolifération préférentielle des AIECs et des *S.typhimurium*), et la mise en place de réponses inflammatoires au sein du tissu intestinal.

Lorsqu'une cellule exprime le SNP C313T, le miR-196 est alors incapable de se fixer à l'ARNm de IRGM/C313T, ce qui perturbe la régulation de l'expression de la protéine (McCarroll et al. 2008 ; Brest et al. 2011). Par conséquent, la surexpression d'IRGM/C313T est associée à un défaut de xénophagie et une augmentation de la prolifération de bactéries opportunistes, telles que *Salmonella Typhimurium* (McCarroll et al. 2008) ou encore les AIECs (Brest et al. 2011). Pour finir, une étude complémentaire et très récente rapporte que le variant C313T de IRGM est associé à une augmentation de la survie des bactéries AIECs dans des macrophages issus de patients Crohn (Buisson et al. 2019). (Figure 28)

On peut donc dire que ce polymorphisme d'IRGM participe à la dysbiose au sein du tissu intestinal, associé à une perte de contrôle de la répllication de bactéries pathogéniques. Tout cela est en faveur de la mise en place d'une réponse inflammatoire chronique chez les patients.

Les différentes études du génome entier (GWAS) chez l'homme ont permis de mettre en évidence d'autres polymorphismes autophagiques associés au risque de développer la MC, tels que des gènes codant pour ULK1, ou encore LRRK2 (Iida et al. 2017). Cependant, leur implication dans le développement de la maladie reste mal inconnue.

d) ULK1

La protéine ULK1 est une sérine/thréonine kinase autophagique impliquée dans l'étape d'initiation de l'autophagie. Elle intervient lors de la formation de l'omégasome, puis du phagophore. Pour cela cette protéine forme un complexe avec d'autres protéines autophagiques, appelé complexe ULK, qui permet, notamment, d'activer le complexe PI3K afin de former du PI3P, essentiel à la formation du phagophore (voir parti I.3.a) L'initiation).

Peu d'études ont été faites sur les polymorphismes de ULK1 identifiés sur le chromosome 12. De plus, les résultats obtenus dans ces différentes études sont contradictoires quant à l'implication réelle de ces SNPs dans la MC. En effet, une première étude Belge rapporte un SNP fortement associé à la maladie, le rs12303764 G>T, localisé au niveau de l'exon 16 de la séquence d'ARN d'ULK1 (Henckaerts et al. 2011). Or, une autre étude en provenance de la Nouvelle-Zélande a permis d'identifier deux autres SNPs associés à un risque de développer la MC, les rs7488085 C>T et rs10902469 C>G (Morgan et al. 2012), et invalide l'étude belge en ne trouvant aucune association entre le développement de la MC et le variant rs12303764 G>T. Les résultats obtenus dans ces deux études sont finalement invalidés dans une troisième étude menée par des coréens (Na et al. 2015).

L'impact des différents polymorphismes sur la fonction ou l'expression de la protéine ULK1 n'a pas encore été clairement identifié. Une étude très récente rapporte cependant que le variant rs12303764 d'ULK1 est associé à une diminution de la survie des bactéries AIECs dans des macrophages issus de patients Crohn (Buisson et al. 2019). Au regard des fonctions de la protéine ULK1 dans l'initiation du processus autophagique, on peut supposer que l'expression de ce polymorphisme est associée à une augmentation de l'autophagie dans les cellules, favorisant l'élimination de bactéries intracellulaires, comme les AIECs. De ce fait, on pourrait considérer le polymorphisme rs12303764 d'ULK1 comme étant un polymorphisme protecteur contre le développement de la maladie. Cependant, il est envisageable qu'un polymorphisme de ULK1 induisant un défaut d'expression ou de fonctionnement de la protéine, soit associé à une inhibition de l'initiation de l'autophagie. Un tel polymorphisme serait alors en faveur du développement de la MC. (Figure 29)

e) **LRRK2**

La protéine LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase 2) est une Ras-GTPase de la famille des protéines ROCO. Elle possède un domaine WD40 qui permet des interactions protéine-protéine, un domaine LRR et deux domaines spécifiques de la famille des ROCO : un domaine ROC (pour Ras Of Complexe proteins) et un domaine COR (pour C-terminal Of Roc). Grâce à son domaine tyrosine kinase, elle est considérée comme une MAPKKK. Cette kinase régule négativement l'autophagie en se fixant à la protéine Beclin-1 afin de l'inhiber. Beclin-1 est ensuite clivée par les caspases 3 et 8, puis poly-ubiquitinylée et dégradée (Takagawa et al. 2018).

Les SNPs rs1175593 G>A et rs11564258 G>A ont été identifiés comme étant associés à un risque de développer la MC, et sont localisés sur le chromosome 12 (Barrett et al. 2008 ; Takagawa et al. 2018). Ces polymorphismes sont associés à une augmentation de l'expression de la protéine dans les cellules étudiées (Gardet et al. 2010 ; Takagawa et al. 2018).

LRRK2 est impliquée dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au sein de leucocytes présents dans la muqueuse intestinale. En effet, Takagawa *et coll.* ont montré que le polymorphisme rs11564258 G>A est associé une augmentation de l'expression de la protéine LRRK2. Pour étudier les fonctions de cette augmentation dans le tissu intestinal, l'équipe a utilisé un modèle de souris sur-exprimant LRRK2 dans des leucocytes et traitées au DSS afin d'induire de la colique (Takagawa et al. 2018). Ils observent que la surexpression de la kinase est associée à une activation de la voie de signalisation NF- κ B, suivi de la sécrétion d'une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires, en particulier le TNF- α (Takagawa et al. 2018). En effet LRRK2 peut interagir avec les protéines TRAF6, TAK1, TAB2 et NEMO de la voie NF- κ B, suractivant

la transduction du signal d'activation de la voie. Cette fonction de **LRRK2** est dépendante d'une stimulation du récepteur CLR CLEC7A/Dectin-1. (**Figure 29**)

Ainsi, on peut envisager d'associer certains polymorphismes de **LRRK2** avec l'amplification de l'inflammation du tissu intestinal médiée par les leucocytes.

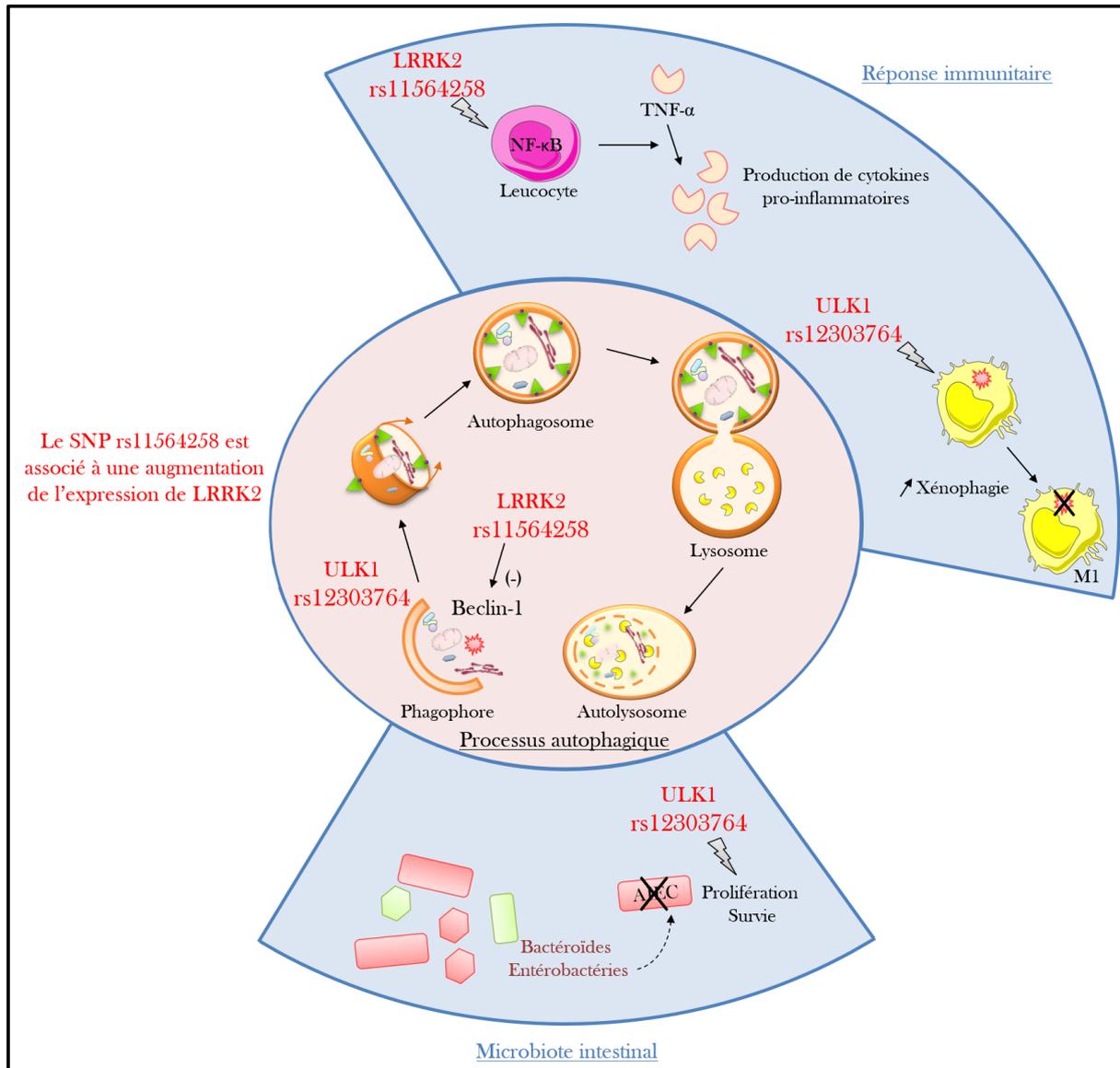


Figure 29 : Impact des polymorphismes ULK1 et LRRK2

ULK1 est une protéine autophagique essentielle, qui intervient lors de l'étape d'initiation de l'autophagie. L'un des polymorphismes de ULK1 associé à la MC conduit à une augmentation de l'autophagie au sein des cellules de la muqueuse intestinale (dont les macrophages), et favorise l'élimination des pathogènes infectieux.

LRRK2 est une Ras-GTPase qui régule négativement l'étape d'initiation de l'autophagie. L'un des polymorphismes de LRRK2 associé à la MC conduit à un défaut d'autophagie au sein des leucocytes de la muqueuse intestinale et augmente leur sécrétion de TNF-α, favorisant l'inflammation du tissu intestinal.

Pour conclure, les polymorphismes autophagiques ont un impact fort sur le développement de la maladie. En effet, lorsqu'ils sont associés à un défaut de fonctionnement de l'autophagie, ils sont en lien direct avec une perturbation de l'homéostasie des cellules épithéliales et des cellules immunitaires favorisant alors l'altération de la muqueuse intestinale, la dysbiose, mais aussi la mise en place et de l'amplification de l'inflammation au sein du tissu. De ce fait, plusieurs traitements expérimentaux, basé sur l'activation de l'autophagie ont été développé et testés dans le cadre de la MC, comme le traitement appelé Sirolimus, qui est un analogue de la molécule pharmacologique rapamycine (Massey et al. 2008 ; Mutalib et al. 2014). Il a été montré que ce traitement combiné à l'infliximab, un anti-TNF, améliore l'état de santé des patients avec une diminution de l'inflammation et des lésions intestinales après 8 semaines de traitement (Massey et al. 2008). De manière complémentaire, une petite étude réalisée chez des enfants atteints de la MC a montré que la combinaison de différents traitements immunosuppresseurs avec le Sirolimus est associé à une amélioration clinique et histologique des patients (Mutalib et al. 2014). Malgré ces résultats encourageants, des études cliniques de grandes ampleurs semblent nécessaire pour prouver les bienfaits de tels traitements dans la MC, pour tout type de patients, mais surtout pour des patients qui présentent des défauts d'autophagie.

Enfin, il semble important de souligner que ces polymorphismes autophagiques sont aussi retrouvés chez des individus sains, ce qui montre que l'expression d'un ou plusieurs de ces polymorphismes n'est pas suffisante pour développer la MC, mais que c'est bien l'association de plusieurs facteurs. De mon point de vue, l'utilisation de combinaisons de plusieurs traitements ciblant différents facteurs impliqués dans le maintien de l'inflammation chroniques chez les patients pourraient être envisager afin d'en cibler plus largement les causes. Ainsi, pour cibler au mieux ces facteurs, la recherche de polymorphismes à risques, dont les SNPs autophagiques, semble essentielle pour tendre vers un traitement plus cibler, et certainement plus efficace pour les patients.

B. Problématique et objectifs de thèse

L'autophagie est un processus du catabolisme cellulaire utilisant la voie du lysosome. Ce processus est partagé par toutes les cellules eucaryotes et permet de maintenir l'homéostasie cellulaire (partie I). Parmi les trois formes d'autophagie, notre équipe s'intéresse particulièrement à la macroautophagie, qui est communément appelée autophagie, et qui se caractérise par la formation d'une vésicule à double membrane, appelée autophagosome. C'est dans les autophagosomes que sont séquestrés les éléments cytosoliques à dégrader (partie I.2.c). L'autophagie se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation du phagophore et la maturation de l'autophagosome. La notion de flux autophagique fait référence à la dynamique du processus autophagique (partie I.3). L'étude de ce flux permet d'évaluer l'activité autophagique dans un type cellulaire donné.

La cellule dendritique (DC) est une cellule clé du système immunitaire, jouant un rôle central dans l'immunité innée et adaptative, et faisant partie de la famille des cellules présentatrices d'antigènes (partie II). A l'état basal, au sein des tissus, la DC est dans un état dit « immature » et joue un rôle de sentinelle grâce à ses capacités de détection et de capture des microorganismes pathogènes. Pour cela, elle exprime à sa surface une multitude de récepteurs, dont des récepteurs de l'immunité innée appelés PRRs (partie II.2.a et b). L'engagement de ces différents récepteurs, via la reconnaissance de microorganismes, active notamment un programme transcriptionnel au sein de la DC qui entre alors dans un processus de maturation (partie II.2.c). Une fois ce processus terminé, la DC a changé d'état pour devenir une DC dite « mature ». Ce changement d'état permet à la DC d'acquérir de nouvelles fonctions, dont la capacité à présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs. C'est lors de la présentation antigénique que la DC va pouvoir initier une réponse immunitaire adaptative, via l'activation, la différenciation et la polarisation de LT naïfs en LT effecteurs (partie II.3). Il a été décrit que l'autophagie est un processus essentiel à plusieurs fonctions de la DC, en particulier pour la présentation antigénique, la production de cytokines, ou encore l'acquisition des nouvelles fonctions biologiques lors de leur maturation.

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, dont l'étiologie fait intervenir des facteurs environnementaux, génétiques, mais aussi microbiologiques et immunitaires. Cependant, la physiopathologie de cette maladie reste encore mal comprise à ce jour (partie III.2). Plusieurs travaux ont rapporté que l'autophagie est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie et des fonctions de la muqueuse intestinale. De manière

intéressante, de nombreux polymorphismes de gènes autophagiques ont été identifiés comme étant des facteurs de risques de développement de la maladie (partie III.3). Parmi ces polymorphismes, on distingue le polymorphisme d'*ATG16L1* (T300A) comme étant le SNP (pour Single Nucleotide Polymorphism) le plus étudié à ce jour (partie III.3. b). Parmi les cellules immunitaires qui composent la muqueuse intestinale, les DCs jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie intestinale, notamment grâce à leurs capacités à converser l'équilibre entre la réponse immunitaire tolérogène et immunogène au sein du tissu. Par ailleurs, diverses études ont montré que l'expression du variant T300A d'*ATG16L1* au sein de DCs intestinales entraîne un défaut d'apprêtement et de présentation des antigènes, associé à une activation prépondérante de LT de type Th17 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Afin de pouvoir mieux comprendre la place de l'autophagie et des DCs dans le contexte de la maladie de Crohn, mon projet de thèse a pour **principale objectif de caractériser la nature/signature du flux autophagique dans des DCs primaires**, qui n'a à ma connaissance jamais été réalisé chez l'homme. Pour cela, j'ai cherché à **mesurer l'évolution du flux autophagique au cours de la maturation des DCs**, afin d'**identifier des paramètres qualitatifs de ce flux**. À la suite de cela, j'ai cherché à **déterminer si le flux autophagique est modulé dans des DCs de patients atteints de la MC**, en particulier lors de la maturation de ces cellules, chez des patients exprimant un polymorphisme du gène autophagique *ATG16L1*. En parallèle, j'ai cherché à **déterminer les conséquences fonctionnelles de cette adaptation de la qualité du flux sur l'activité autophagique des DCs et identifier le mécanisme qui influence cette évolution au cours de la maturation des DCs**.

C. Résultats

I. Article scientifique

Les principaux résultats obtenus durant cette thèse sont décrits dans l'article scientifique ci-dessous, article en cours de préparation. Je tiens à préciser que les résultats présentés Figures 1 à 3 et S1 à S4 ont été générés, par moi-même, ainsi que par Océane Dinet. L'ensemble des résultats présentés Figures 4 et S5 ont été générés par Ornella Cervantes et Malorie Verdet.

Article en préparation

The ATG16L1 T300A polymorphism in Crohn's Disease patients leads to abnormal autophagy flux in dendritic cells

Gaëlle Quiniou¹, Océane Dinet¹, Ornella Cervantes¹, Malorie Verdet¹, Gilles Boschetti¹, Christophe Viret¹, Stéphane Nancey¹, Mathias Faure^{1,2,*} and Aurore Rozières^{1,2}

¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team *Autophagy Infection Immunity*, Université de Lyon, Inserm U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France.

² equal contribution

* Equipe Labellisée par la Fondation pour la Recherche Médicale, FRM

Corresponding author: aurore.roziers@inserm.fr CIRI, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS-L, UCBL1 - 21, Avenue Tony Garnier 69365 Lyon Cedex 07, France. Phone: +33 4 37 28 23 42. Fax: +33 4 37 28 23 77.

Abstract

Crohn's disease is a chronic inflammatory bowel disease, whose pathogenesis is largely determined by an inappropriate immune response towards luminal microbiota in genetically susceptible hosts, affecting in particular genes involved in the autophagy process. The autophagy-related ATG16L1 T300A variant is one of the most frequently associated polymorphisms with susceptibility to Crohn's disease, but the functional consequences of this polymorphism on the dynamic of the autophagy flux remains unknown. Here, we deeply analysed the autophagy flux in human primary dendritic cells which are very potent antigen-presenting cells whose function is critical in Crohn's disease. Detailed analysis of the dynamic properties of the autophagic flux reveal that the maturation process in dendritic cells from healthy subjects is associated with a decrease of the velocity and the intensity on the autophagy flux although the turnover of autophagosome formation was maintained, demonstrating the capacity of resilience of the autophagy flux for a functional autophagy. Strikingly, the expression of the ATG16L1 T300A variant in DCs from patients with Crohn's disease is associated with a disorder of the autophagic flux dynamics in immature dendritic cells, that was not modulated upon maturation. The lack of adaptation of the autophagy flux in ATG16L1 T300A expressing dendritic cells of Crohn's disease patients, during their maturation was not associated with altered phenotypic acquisition of maturation markers but highlighted a very specific autophagic flux signature. Thus, dendritic cells of Crohn's patients expressing the autophagy-related ATG16L1 T300A have an altered autophagy flux, that could affect their function and contribute to the pathogenesis of Crohn's disease.

Keywords: Crohn's disease, Risk variant, Dendritic cells, Maturation, Autophagy flux

Introduction

Dendritic cells (DC) are antigen presenting cells which efficiently link innate to adaptive immune responses (Banchereau et al. 2000). Indeed, DCs have the ability to sense, uptake and degrade pathogens in order to present naive T cells. DCs are not only critical for the induction of immune responses but they also strongly contribute to maintain immune tolerance notably through the activation and maintenance of regulatory T cells (Tregs) (2-3). However, many examples were reported displaying that DCs (my)functioning is associated to pathogenesis of inflammatory diseases such as Crohn disease (4-6). CD is characterised by a chronic inflammation of one or several segments of the gastrointestinal tractus but predominantly the terminal ileum. It is a multifactorial and severe disease which represents a chronic public health problem as its global incidence and prevalence are still increasing (Torres et al. 2017). To date, it is still not curable disease, and more than two-thirds of patients, specifically those with ileal and ileocolonic forms of CD, require intestinal resection, which highlights the need to develop efficient therapeutics (8-10).

The pathophysiology of CD is not fully understood. The current paradigm is that an inappropriate immune response against microbial flora combined with environmental factors in genetically predisposed individuals underlie pathogenesis (10-12). Infiltration and activation of pro-inflammatory immune cells into the intestinal mucosa are responsible for the development of chronic inflammation. T cells, which play a dominant role in cell-mediated immunity, accumulate in inflamed tissues, where their production of inflammatory cytokines contribute to mucosal damages (13-14). Furthermore, this mucosal inflammation is associated with intestinal microbiota dysbiosis, which is especially characterised by an expansion of proteobacteria—such as, adherent–invasive *Escherichia coli* (AIEC)(15-16).

These recent years, genome-wide association studies displayed more than 200 single nucleotide polymorphisms (SNP) predisposing to CD development (17-19). These SNPs are involved in distinct molecular pathways such as those involved in IL-23-related signalling, ER stress signalling, the innate immune sensing receptor NOD-2 or macroautophagy (thereafter referred to as autophagy) (19-18). Autophagy is a highly regulated process which is essential for the maintenance of cellular homeostasis as it constantly degrades obsolete component of the cell, avoiding accumulation of deleterious components. The dynamic of autophagy is known as the autophagic flux. It is initiated by the formation of an isolated membrane, the phagophore, whose extremities elongate thanks to the two ubiquitin-like conjugation systems, LC3 and ATG5—ATG12-ATG16L1. The growing autophagosomal membrane surround, cytosolic cargos which are mostly targeted within autophagosomes by autophagy receptors that bind on one hand cargos and, on the other hand, the autophagosomal membrane-anchored LC3-

II protein. Eventually, autophagosomes fuse with lysosomes leading to the degradation of cytosolic within autolysosomes (Galluzzi et al. 2017). Beyond, its role in healthy cells, autophagy is also crucial in order to degrades pathogens (a process termed xenophagy) (Viret, Rozières, et Faure 2018) and is also critical to the regulation of inflammatory responses as well as to adaptive immune responses for notably by contributing to the generation of antigenic peptides for major histocompatibility complex (MHC)-molecules, a key function of DC (Deretic et Levine 2018).

Interestingly, the most frequent CD risk loci identified among those, which contribute to the regulation of autophagy is autophagy-related 16-like 1 (*ATG16L1*) T300A variant (Salem et al. 2015). It has been shown that the *ATG16L1* T300A variant is associated to different disorders depending on the considered cells expressing it. Within intestinal epithelium, this variant is associated with intestinal barrier disruption as it renders epithelial cells more susceptible to microorganisms induced inflammation and as it impacts the mucosal immune response (Lassen et al. 2014b). In paneth cells, the expression of the T300A variant leads to structural and functional aberrations associated with decreased expression of antimicrobial peptides (Cadwell et al. 2008). In *ATG16L1* T300A macrophages an impaired autophagy-mediated clearance of intracellular bacteria has been reported, what limits bacterial derived-peptide presentation on MHC molecules and increases pro-inflammatory cytokines production (26-27). Strikingly, while autophagy has been reported to support DC functions such as antigen presentation or cytokines secretion specific, the impact of the *ATG16L1* T300 on DC functions particularly in the context of intestinal immune response remains controversial (28-29). Therefore, identifying how DCs regulate immune homeostasis in human intestinal mucosa and, in particular, how predisposing genetic variants such as *ATG16L1* T300A in DCs contribute to the inappropriate immune response that results in disease is critical for improving the knowledge about the pathophysiology of CD (Cader et Kaser 2013). Thus, we asked whether the *ATG16L1* T300A variant modulates the dynamic of autophagic flux what could contribute to altered functions of DCs. In the present study, we characterised the DC autophagic flux signature that we identified through three main biological features the velocity, the intensity, and the turnover capacity. We show that DC maturation leads to a distinct autophagic flux signature characterized by lower velocity and intensity while the turnover capacity remained sustained. Remarkably, the complete characterisation of the autophagic flux allowed us to show for the first time that DCs from CD patients expressing the *ATG16L1*-T300A displayed an altered autophagic flux signature as well as at the basal level than after maturation. Collectively, our data show a defect in the quality of the autophagic flux in DCs from *ATG16L1*-T300A CD patients could be involved in the development of an inappropriate immune response involved in pathogenesis.

Material and methods

Ethics statement

The experiments in this article were performed at Biological Safety Level 2 in accordance with the regulations set forth by the national French committee of genetic (commission de génie génétique). The clinical study including Crohn's disease patients has been approved by an ethics committee in accordance with French regulations (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VII, CPP number #2019-A0149-57) and sponsored by Hospices Civils de Lyon (#69HCL180-0027).

Cells and cell culture

Dendritic cells were differentiated from human blood monocytes (DCs). Briefly, blood samples were got from the EFS (Etablissement français du sang) or from the hospital Lyon Sud Granstoenterology department, to generate immature dendritic cells (iDCs) from individual healthy donors (HD iDC) or Crohn's disease patients (CD iDC, CPP number #2019-A0149-57), respectively. Blood CD14⁺ monocytes were purified from total peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using a dedicated CD14⁺ isolation kit, according to manufacturer recommendations (130-050-201, Miltenyi). Monocytes were then maintained in RPMI1640-Glutamax (61870, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Corning), 1% HEPES (15630106, Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (15070063, Gibco); 20ng/mL GM-CSF (130-093-866, Miltenyi) and 50ng/mL IL-4 (130-093-922, Miltenyi) were added to allow monocyte differentiation in dendritic cells for 7 days. The efficiency of DC differentiation was confirmed systematically from each individual donor by FACS analysis for CD1a expression and CD14 down-regulation. Eventually, iDCs were incubated for the last 12hrs to 48hrs with either 1µg/mL purified LPS (0111:B4, tlr1-3pelps, Invivogen), 3µg/mL R848 (tlr1-r848, Invivogen) or 200ng/mL TNF-α (130-094-014, Miltenyi) in order to induce mature dendritic cells (mDCs). Maturation status was checked by FACS analysis for the intensity of cell surface expression of CD80, CD86, and HLA-DR.

Human Langerhans cells (LCs) and dermal dendritic cells (DDCs) were both extracted *ex vivo* from the skin of individual healthy donors undergoing abdominal plastic surgery. Samples were recovered after informed written consent and used according to the guidelines of the Declaration of Helsinki Principles and approved by the institutional review board of the University Claude Bernard, Lyon, France. Skin samples was freed of fatty tissue, and 3 mm thick slices consisting of epidermis and dermis were cut using a dermatome. Skin slices were maintained 1hr at 37°C in Hanks' balanced saline solution (H8264, Sigma-Aldrich) containing 0,25% dispase II (04942078001, Roche Lifesciences) and 1% gentamycin (G1272, Sigma). Epidermis and dermis were then separated using fine forceps and washed with Hanks' balanced saline solution. Tissues were cultured 48hrs at 37°C in separate dishes containing X-VIVO-15

medium (BW04418Q, Fischer scientific) and 1% gentamycin in humidified atmosphere. Epidermal and dermal sheets were then removed, Langerhans cells were purified by two consecutive centrifugations on Lymphoprep (07801, Stemcell) and Nycoprep (1114551, clinsciences), as previously described (Penel-Sotirakis et al. 2012). The purified cell population was >95% langerin positive cells (not shown). Dermal migratory dendritic cells were further purified using human anti-CD1c-biotin microbeads (130-119-475 Myltenyi) and were >95% CD1c positive cells (not shown).

Antibodies and reagents

Anti-CD80 FITC (MAB104, Immunotech), anti-CD1a PE (clone HL149), anti-CD86 PE-Vio770 (FM95), anti-CD83 APC (HB15) (all from Miltenyi), HLA-DR PE-CF594 (G46-6) and anti-CD54 (555512), anti-langerin FITC (564727) and anti-CD1c PE (561757) (all from BD) were all used for FACS analysis (LSRII and FlowJo 7.6.5, both from BD) of fixed DC (with IOTest3 Fixative solution (A07800, Beckman Coulter)), after exclusion of dead cells (using Fixable Viability Stain 440 UV (566332, BD)). Anti- β -actin (A2066, Sigma), anti-LC3B (L7543, Sigma) and HRP anti-rabbit (A0545, Sigma) were used for protein detection by western blot.

Pharmacological reagents used were 50 μ M chloroquine (C6628, Sigma), 100nM bafilomycin A1 (tlrl-baf1, Invivogen), 20 μ M Spautin-1 (567569- Calbiochem), and 100nM rapamycin (553210, Calbiochem).

Western blot

Cells were lysed with a lysis buffer according to manufacturer's recommendations (8990089901 Pierce), containing additional 4mM protease cocktail inhibitor (04693132001 Roche). Soluble proteins were diluted in 5mM TCEP solution (77720, Thermo) and 1X LDS sample buffer (2045288, Invitrogen), and then boiled 5min. Proteins were then separated on NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (NP0335BOX, Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membrane with Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit (1704271, Bio-Rad). Membranes were blocked for 1h at room temperature in PBS 1X-Tween 0,1%-milk 5%. Primary rabbit polyclonal antibodies, anti- β -actin and anti-LC3B and secondary HRP-linked anti-rabbit were used, and antigen-antibody complexes were visualized by enhanced chemiluminescence using Western lightning Plus-ECL (NEL104001EA, PerkinElmer) with the ImageQuant LAS400 (GE Healthcare). Individual western blot detected band for LC3-I and LC3-II were determined with ImageJ Software (NIH) in order to determine the LC3-II/LC3-I ratio.

Autophagic flux analysis

1.10⁵cells/well iDCs, mDCs, LCs or DDCs were collected (time point -60min) or seeded in 48-well plates in RPMI1640 and collected after half an hour (time point -30min) or one hour (time point 0min) of

culture. One-hour post seeding (corresponding to the time point 0min), cells were incubated with bafilomycin A1 or chloroquine and collected at several time points up to 180min of culture (time point 15min to 180min). Cells were lysed, the LC3-I and LC3-II levels of expression were quantified by western blot, allowing for each time point the determination of the LC3-II/LC3-I ratio (reflecting the conversion of soluble LC3-I in autophagosome-linked LC3-II) and reported on individual curves allowing for the determination of three qualitative parameters of the autophagic flux : J = velocity, slope of the curve; v = intensity, (maximal LC3-II/LC3I ratio after drug treatment (plateau of the curve)); and τ = time of transition or turnover, v/J (the time requires to turnover the intracellular pool of autophagosome to reach the basal level in a steady state condition)(see Figure S1A).

Cytokines production analysis

IL-6 and IL-8 were assayed using ELISA method (Human IL-6 Duoset Elisa and Human IL-8 Duoset Elisa R and D system Minneappolis, USA). Briefly, supernatants of DC were collected after 2 days of culture in complete medium with or without LPS (1 μ g/ml) or R848 (3 μ g/ml) or TNF- α (200ng/mL). All supernatants were analyzed in duplicate using TECAN infinite 200Pro system (Lifesciences Tecan) and results were expressed as the mean amount of cytokine per ml (pg/ml \pm S.D.).

Genotyping

Blood samples were collected in PAXgene[®] Blood DNA Tube and were kept at on ice until processing. DNA was extracted using PAXgene Blood DNA Kit according to manufacturer's recommendations (761133, Qiagen). Genotyping of rs2241880 (ATG16L1 T300A) was performed using Ion Chef robotic platform (Thermofisher) allowing PCR amplification and library construction by ligation. Allelic discrimination was achieved using Ion Torrent PGM sequencer (Thermofisher). All control genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium.

Statistical analysis

Parameters of autophagic flux were compared on pairs of data between iDCs and mDCs with the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Subsequently, principal component analysis (PCA) was performed including as parameters the intensity of cell surface expression of CD80, CD86 and HLA-DR, the nature of the agent used for DC maturation (LPS, R848 and TNF- α) and the velocity, the intensity and the time of transition determined from donor/patient individual autophagic flux, using the R package ade4. Bars represent median and * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Results

Specific autophagic flux signature in human dendritic cells sub-populations

To document autophagic flux in human dendritic cells, we isolated monocytes from peripheral blood from healthy donors and cultured them for seven days with GM-CSF and IL-4 to generate monocyte-derived DCs. At this stage, DCs were immature (iDC) as determined by the fact that they lacked or expressed low levels of MHC class II (HLA-DR), CD86, CD80. As autophagy is a dynamic process, its characterisation requires kinetic analysis. To do, we analysed the autophagosome formation by measuring the conversion of the cytosol-located LC3-I form into the autophagosome-anchored lipidated LC3-II form by western-blot. Moreover, to quantify the autophagy flux, we treated DC with either Bafilomycin A1 or chloroquine, two potent inhibitors of autophagosome recycling, for several period of time. The accumulation of autophagosomes is illustrated by the increase ratio of LC3-II/I whom quantification allowed us to determine three main qualitative parameters : the velocity, the intensity and the transition time which corresponds to the time necessary for the renewal of the pool of autophagosome, also called turnover (Fig S1) (Loos, Toit, et Hofmeyr 2014).

iDCs of 16 healthy donors were first treated with bafilomycin A1, which block autophagosome-lysosome fusion via V-ATPase inhibition (Fig 1A) and we determined that iDCs exhibited an autophagic flux characterised by a velocity with a median of $10,7 \cdot 10^{-3} \pm 5,6 \cdot 10^{-3}$, an intensity with a median of $0,97 \pm 0,63$, and a transition time with a median of 104 ± 30 (Fig 1B). To evaluate whether the qualitative parameters of the autophagy flux depend on the autophagosome-lysosome fusion inhibitor, similar experiments were conducted with the iDCs of six donors treated with another inhibitor autophagosome recycling, chloroquine, which is a lysomotropic agent (Fig 1B). Interestingly, iDCs treated with chloroquine presented similar profiles of autophagic flux parameters of velocity (median $13,4 \cdot 10^{-3} \pm 11,2 \cdot 10^{-3}$), intensity (median $1,6 \pm 1,7$) and transition time (median 84 ± 86). Those results highlight a qualitative evaluation of the autophagic flux characterized by the velocity, the intensity and the turnover, allowing us to determine an autophagic flux signature.

DCs are a heterogeneous population including various sub-populations depending on their environment. Thus, we assessed whether the autophagic flux signature was dependent on the sub-population of DCs studied. In healthy human donors, ex-vivo DC can be obtained from skin individuals having plastic surgery (Fig S1 B-E). Thus, we were able to study two subpopulations of cutaneous DCs: Langerhans cells (LCs) and dermal dendritic cells (DDCs). Autophagic flux was evaluated after bafilomycin A1 treatment from five donors for LCs and two donors for DDCs. We obtained two autophagic flux signature profiles: LCs characterised by high velocity and intensity (median $3,9 \cdot 10^{-3} \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$ and median $2,36 \pm 0,59$, respectively) (FigS1 B, C) and DDCs were characterised by low velocity

and intensity ($1,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ and $0,76 \pm 0,23$, respectively) (Fig S1 D, E). Altogether, these results show that autophagic flux signature of DCs generated from blood monocytes, is indicative of the one of in-situ differentiated of DCs and could be associated with the functional specialisation of each DC subpopulations.

Autophagic flux modulation upon DC maturation

To determine how the autophagic signature evolves according to the functional status of DCs, we evaluated the impact of the maturation process on it. Monocyte-derived DCs were treated at day five for two days with either LPS, a TLR4 ligand, R848 a TLR7/8 ligand or TNF- α to differentiate iDCs in mature-DCs (mDCs) that are characterised by a strong increase of the expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86) and MHC Class II molecules, as well as the ability to secrete cytokines. As expected, we found for each of the maturing agents that we used, a specific maturation profile, as revealed by the level of expression of the maturation markers (CD80, CD86 and HLA-DR) (Fig S2A) as well as by the level of production of the two inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 (Fig supp 2B, C). Autophagic flux was evaluated in these three types of mDCs as described above (Fig Supp 3A, B). Very interestingly, when compared to iDCs, we observed in mDCs a significant decrease in velocity and intensity whatever the modalities of maturation used (Fig 2A, B, C). However, the modulation of both parameters of the autophagic flux did not affected the time necessary for the renewal of the autophagosomal pool that we determined by measuring the transition time (Fig 2A, B, C). Thus, these results indicate that DCs maturation resulted in a strong and significative autophagic flux modulation, that do not modulate the autophagomes' turnover.

To confirm the autophagic flux signature associated to mDCs, a global analysis of data that considered altogether maturation markers CD80, CD86 and HLA-DR as well as the velocity, the intensity and the time of transition of the autophagy flux, was conducted using a principal component analysis (PCA). The analysis confirmed that DCs maturation was characterised by an increase of maturation markers expression and, very interestingly, was associated to a decrease of the velocity and the intensity of the flux (Fig 2D). However, despite the statistical decrease in the velocity and intensity of the flux, mDCs were characterised by the maintenance of the transition time, which suggests the importance for DCs to maintain an operational autophagic flux by maintaining the renewal capacity of the pool of autophagosomes (Fig 2D, Fig S3C). To go further, we performed a detailed PCA analysis at the level of each populations of mDCs, considering maturations markers and autophagic flux quality parameters for each considered mDCs population (either differentiated with LPS, R848 or TNF- α). This analysis showed that the three populations of mDCs generated were different regarding their respective intensity of maturation markers' expression. Interestingly, the qualitative differences of their respective autophagic flux remained moderate for velocity and intensity parameters and very weak

for the time of transition (Fig 2E). Thus, DCs maturation induced through the engagement of two TLRs or TNF receptor shared similar autophagic flux signature.

Active autophagic flux is necessary for the maturation process of DCs

To determine the importance of the autophagic flux in the maturation of DCs, a kinetic analysis of the flux was conducted during DCs maturation. The results showed a progressive adaptation of the flux according to the acquisition of the status of the mature cells (Fig 3A). To assess if active autophagic flux is necessary for the complete acquisition of mature status, DCs maturation was induced with LPS and pre-treated with either Baf A1, a late inhibitor of the autophagy flux, or Spautin-1, which inhibit autophagy induction. Autophagy blockage with these inhibitors was confirmed using western blot quantification of LC3 II/I ratio (data not shown). As shown in figure 3, we found that to block the autophagic flux with either Baf A1 or Spautin-1 interfered with the acquisition of the maturation markers (Fig 3B, C and S4A, B). Interestingly, activation of autophagy with rapamycin, a potent inducer of the autophagic flux, did not modify the basal status of DCs as well as the acquisition of maturation markers in mDCs induced by LPS (Fig 3C and S4C). Altogether, our results display the importance of the quality of the autophagic flux in the acquisition of specific functions of DCs, as evidenced by the lack of acquisition of maturation markers when the flux is blocked.

Altered autophagic flux dynamic in ATG16L1 T300A expressing DCs of CD patients

Prompted by our findings on DCs from healthy donors, we evaluated the autophagic flux properties in DCs from CD patients expressing or not the ATG16L1 T300A variant. Twelve CD patients were included, among which 5 expressed the ATG16L1 T300A variant. Importantly, both categories of CD patients, those expressing the T300A variant and those that did not express this variant, exhibited same clinical characteristics in terms of severity, disease history and treatment (Table1). Monocytes from CD patients were purified and cultured for seven days with GM-CSF and IL-4 to generate monocyte-derived DCs; eventually their maturation was induced by LPS treatment as for DCs differentiated from healthy donors. Importantly, the T300A expressing iDCs showed similar expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86), activation molecule (CD83) and MCH class II molecule (HLA-DR) than iDCs of CD patients that did not express this polymorphic variant, and both categories of DC matured with the same efficiency, as judged by the level of expression of the maturation markers following LPS treatment (Fig 4A, 4B and supp S5A). Thus, the expression of the T300A variant seems not to alter the ability of DCs to mature. We next evaluated the qualitative autophagic flux parameters after BafA1 treatment, as explained above. Very interestingly, we found that DCs from CD patients expressing the T300A variant exhibited a different autophagic flux signatures that those that did not express this variant. In fact, DCs from not expressing T300A patients, like DCs of healthy donors, after maturation

with LPS displayed a significant decrease of the velocity of the flux, as well as its intensity and the maintenance of the turnover capacity. Strikingly, in mDCs from T300A expressing CD patients, the maturation process was not accompanied by a modulation of any of the autophagy flux parameters, when compared to their iDCs counterparts (Fig. 4B and S5B). Indeed, the T300A mDCs had an autophagic flux signature similar to those of the T300A iDCs. Thus, these results indicate that the lack of adaptation of the autophagic flux in DCs from T300A expressing CD patients is due to intrinsic defects, characterised by a reduced velocity and a reduced intensity of the flux. These results highlighted a functional disorder in the autophagic flux associated with the expression of the ATG16L1 T300A variant in DCs of CD patients, that may be associated with a functional defect of DCs and that could contribute to the initiation and/or amplification of the chronic inflammatory response specific to the pathophysiology of CD.

Discussion

Beyond its crucial role in the maintenance of cellular homeostasis, autophagy has emerged as a central element of the immune response due notably to its involvement in the regulation of the secretion of inflammatory cytokines, its ability to degrade intracellular pathogens and its contribution to the generation of antigenic peptide for MHC presentation to T cells. All these immune functions are key activities of the professional antigen-presenting cells that are DCs. DCs, that are found in an immature status in tissues, acquired the ability to change their physiological status upon pathogen detection, or in an inflammatory environment, to become mature in order to stimulate adaptive immunity in secondary lymphoid organs (1-33). We report here for that the maturation of DCs is associated with an adaptation of the quality of autophagic flux, which is characterised by a decrease in its velocity and its intensity. Nevertheless, despite these strong perturbations of the autophagy flux, we found that the turnover capacity of mDC is maintained, demonstrating the resilience of this mechanism during the maturation process suggesting that this function is as crucial in iDCs than in mDCs. Moreover, the acquisition of the status of mature DCs requires an active autophagic flux, at least regarding cell surface maturation markers, illustrating the strong link between autophagy and biological functions of DCs. Last but not least, the fine characterisation of the dynamic of the autophagic flux in the DCs of Crohn's disease patients that we report here offers new insights on the potential role of autophagy in this disease. Indeed, we clearly identify a defect of the dynamic of the autophagic flux in DCs from CD patients expressing the ATG16L1 T300A variant, what could contribute to the pathogenesis.

Dendritic cells are key cells for the control and the regulation of immune responses to specific antigens. DC dysfunctions are associated with inappropriate immune responses and, therefore, represents an important factor in the development of chronic inflammatory pathologies. In DCs, antigen processing via autophagy modulates T cell immunity by promoting both endogenous and exogenous antigen presentation (34-35). Autophagy also contributes to the regulation of cytokine production and cell death in DCs, and several reciprocal links between autophagy and pattern recognition receptors were reported (36-39). Whereas most studies focused on autophagy modulation subsequently to early TLR engagement, in the present study we were interested by characterizing delayed consequences on autophagy of TLRs-induced maturation in DCs. In that context, we identified strong changes of the dynamic of autophagy in mDCs with a decrease in the velocity and in the intensity of the autophagy flux, still with the maintenance of the turnover capacity. Thus, autophagy that can be induced early upon TLR engagement, as reported by others, is still modulated up to two days, in mature DC. Whether this late modulation of the autophagy flux is still under the direct regulation of TLR-signalling or is a physiological adaptation of the biology of mature DCs remain to be explored. However, a specific autophagy flux signature of mDCs compared to iDCs is privileged as it might adapt to distinct metabolic

and functional requirements for each status of the same cell. Indeed, iDCs have a strong potency for phagocytosis, and degradation of antigen is a basic function of these cells. By contrast, mDCs have a reduced capacity to uptake antigens, what contribute to concentrate the presentation of peptide by MHC-II molecules mainly to those derived from primary uptaken microorganisms. To slow down the velocity and the intensity of the catabolic process of autophagy in late mDCs could contribute to limit the diversification of antigenic peptides. However, a functional active autophagy would stay required as suggested by the fact that, whatever the status of the cell is, the turnover of autophagosome formation remains similar; this resilience could be instrumental for maintaining at least DC homeostasis. However, as reported by others, our experiments using inhibitors of the maturation of autophagosomes, confirmed the importance of a complete and productive autophagy flux, at least at the moment of the induction of autophagy, in order to sustain the differentiation of iDCs in mDCs. Of note, all this autophagy-associated characteristic does not only concern TLR-induced maturation but also other trigger of maturation, at least TNF- α , as we have shown in this work.

Interestingly, the well-regulated and balanced parameters of the autophagy flux could be instrumental in the deregulation of the immune response involving DCs, during chronic inflammatory pathologies. In Crohn's disease, GWAS have revealed many SNPs of autophagy-associated genes (Hampe et al. 2007b), but whether autophagy flux is indeed dysregulated in cells of such patients, and whether autophagy dysfunction really contribute to the pathology remains not well understood in patients, due to difficulties to study the autophagic flux in primary untransformed cells. Here, thanks to the calibration of parameters analysis of the autophagy flux, we were able to show that in iDCs of CD patients expressing the ATG16L1 T300A variant exhibit an abnormal autophagic flux dynamic properties with a low velocity and a low intensity, that reflect autophagy flux features of mDCs or healthy donors. Beyond, the autophagy flux of ATG16L1 T300A expressing mDCs remain unchanged when compared to their iDCs counterparts and is similar to the one of HD iDC. This suggests that CD iDC have limited ability to adapt the autophagy flux to inflammatory environment, and already have a catabolic autophagy pathway with mature DC features, what could contribute to the pathophysiology of CD.

Interestingly, our results obtained from primary human cells of CD patients are in line with the fact that the ATG16L1 T300A variant is highly susceptible to caspase-mediated cleavage, what has been shown to reduce autophagy in cellular models (41-42). However, the importance of ATG16L1 in the function of DC is controversial, as it has been shown that mice deficient in Atg16l1 or patient samples expressing the ATG16L1 T300A variants, while important in intestinal epithelial cells are dispensable in DCs (28-43). By contrast, it has been reported increased colonic inflammation and increased IL-1 β and TNF- α secretion in a DSS-induced murine colitis model of mice deficient for Atg16l1 deficiency in CD11c+ DCs (H. Zhang et al. 2020). Here we show that in human primary DCs, the expression of the

ATG16L1 T300A variant is associated with a reduced autophagic flux what could directly impact the functional capacities of DC (41-46).

The results of the present study show that, unlike the DCs of healthy subjects or CD patients not expressing the ATG16L1 T300A variant, DCs exhibit a defect on autophagic flux capacities. Autophagy is an important rheostat that facilitates control of the diversity of presented peptide and cytokine secretion; therefore, changes in the dynamic could be directly linked to the breakdown of tolerance and the induction of the inappropriate inflammatory immune response of this pathology due to changes in degradation capacities but also in antigen presentation.

Figure Legends

Figure 1. Quantitative autophagy flux analysis in human primary dendritic cells.

Immature dendritic cells differentiated from healthy donor blood monocytes (HD iDC) were harvested at the indicated time points for analyzing by western blot LC3 and β -actin expression, prior or after cell incubation with bafilomycin A1 (Baf A1, **A and B**) or chloroquine (CQ, **C and D**). A representative western blot obtained from iDCs of one donor treated with Baf A1 is shown (**A**) as well as iDCs of one donor treated with CQ (**D**), which are both accompanied with the respective graph corresponding to the quantification of the LC3-II:LC3-I ratio determined for each time point (**A**, +/- Baf A1 and **C**, +/- CQ treatments, respectively). **B and D**: the velocity (slope of the curve), the intensity (maximal LC3-II:LC3-I ratio) and the time of transition (turnover to replenish the pool of autophagosomes) parameters were mathematically extracted from individual curves, as explained in M&M and Fig S1A, and were determined from iDCs of 16 donors treated with Baf A1 (**B**), and 6 donors treated with CQ (**D**). For each parameter, the median is indicated with a bar.

Figure 2. Modulation of the autophagy flux in mature dendritic cells.

Immature dendritic cells differentiated from healthy donor blood monocytes (HD iDC) were eventually matured (HD mDC) by a 48hrs culture with LPS (**A**, n=15), R848 (**B**, n=9) or TNF- α (**C**, n=8). The indicated autophagy flux parameters of velocity, intensity and time of transition were mathematically extracted from graphs determined following the quantification of the LC3-II:LC3-I ratio obtained from iDCs or mDCs harvested at different time points, prior or after cell incubation with bafilomycin A1 (as in Fig 1A/B, see Fig S3 for representative western blots and graphs). iDCs and mDCs from individual donors are numerated. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. **D**: Principal component analysis (PCA) including FACS-determined MFI of cell surface expression of CD80, CD86 and HLA-DR as determined from iDCs or mDCs, and the velocity, the intensity and the time of transition determined from DC of individual donors. **E**: PCA including FACS-determined MFI of the above-mentioned cell surface markers from DCs matured with either LPS, R848 or TNF- α , and the velocity, the intensity and the time of transition determined from mDCs of individual donors.

Figure 3. Modulation of autophagy flux and dendritic cell maturation

A, Immature dendritic cells differentiated from healthy donor blood monocytes (HD iDC) were matured (HD mDC) with LPS and harvested at the indicated time points (12hrs, 24hrs, 48hrs) for analyzing the autophagic flux by quantification of the LC3-II:LC3-I ratio after cell incubation with bafilomycin A1 (Baf A1). The indicated autophagy flux parameters of velocity, intensity and time of transition were mathematically extracted from graphs. For each parameter determined results were expressed as fold increase between LPS-treated DCs (mDCs) and iDCs. **B-D** Immature DC differentiated from healthy donor blood monocytes were pre-treated or not with **(B)** Bafilomycin A1, **(C)** Spautin-1 **(D)** rapamycin and matured or not for 48h with LPS. Maturation markers expression (CD80, CD86, HLA-DR) were analyzed by flow cytometry and results were expressed as median of fluorescence. For each parameter, the median is indicated with a bar.

Figure 4. Autophagy flux analysis in T300A dendritic cells from Crohn disease patients

Immature dendritic cells differentiated from Crohn diseases patients' blood monocytes expressing T300A variant (n=5) or not (n=12) were matured (CD mDC) or not (CD-iDC) by a 48hrs culture with LPS, **A**, Phenotypic analysis of CD iDC vs CD mDC. CD80, CD86, CD83 and HLA-DR expression were measured by flow cytometry method and results were expressed as median of fluorescence. **B**, Autophagy flux parameters of velocity, intensity and time of transition were mathematically extracted from quantification of the LC3-II:LC3-I ratio obtained from CD iDC and CD mDC harvested at different time points, prior or after cell incubation with bafilomycin A1 (see fig S5); For each parameter, the median is indicated with a bar *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Supplementary Figure Legends

Figure S1. Autophagy flux analysis in dendritic cells.

A, Determination of three parameters of the autophagy flux. Representation of a graph from iDCs, derived from blood monocyte of one healthy donor, obtained following the quantification of the LC3-II:LC3-I ratio determined after several time point of culture, prior or after incubation with Baf A1. From the curve was determined : i/ the velocity (J) which is the slope of the curve between the last time point with minimal LC3-II:LC3-I ratio (obtained before treatment with Baf A1) and the first of the "plateau" reaches after Baf A1 treatment; ii/ the intensity (v) which is the mean of the LC3-II:LC3-I ratio of all time points at the "plateau" of the curve following Baf A1 treatment (the maximal LC3-II:LC3-I ratio, v on the graph), iii/ the time of transition (τ) corresponds to the time of the turnover of the

entity pool of autophagosome in steady state, which is equal to the time required to fill the pool of autophagosome from zero to its steady-state value, the time of transition $\tau = v/J$. Importantly, the “time points” used for the calculation of each parameters were depending of the LC3-II:LC3-I ratio-derived graphs obtained from each individual donor and patient. **B-E**: autophagy flux was analyzed from Langerhans cells (LCs) (**B** and **C**) and dermal dendritic cells (DDCs) (**D** and **E**) and in Fig. 1A-C. A representative western blot of LC3-B and β -actin and its corresponding graph obtained from LCs (**B**) or DDCs (**D**) extracted from one donor are shown. The velocity, intensity and time of transition parameters were determined for LCs extracted from 5 donors (**C**) and for DDCs extracted from 2 donors (**E**). For each parameter, the median is indicated with a bar.

Figure S2. Analysis of maturation profile of dendritic cells.

Immature dendritic cells differentiated from healthy donor blood monocytes (HD iDC) were eventually matured (HD mDC) by a 48hrs culture with LPS, R848 or TNF- α . **A** Representative histogram of FACS-determined median of fluorescence of cell surface expression of CD80, CD86, and HLA-DR obtained from HD iDC and HD mDC (LPS, R848 and TNF- α); **B-C** After 48 hours of stimulation with LPS, R848 or TNF- α , IL-6 (**B**) and IL-8 (**C**) were measured in supernatant by ELISA method. Results were expressed in ng/ml and the median is indicated with a bar.

Figure S3. Autophagy flux in mature dendritic cells.

Immature dendritic cells differentiated from healthy donor blood monocytes (HD iDC) were eventually matured (HD mDC) by a 48hrs culture with LPS, R848 or TNF- α . **A**, a representative western blot obtained from iDCs and mDCs matured with either LPS, R848 or TNF- α of one donor, prior and after treatment with Baf A1 is shown. **B**, individual western blots are accompanied with their respective graph corresponding to the quantification of the LC3-II:LC3-I ratio determined for each time point. The autophagy flux parameters of mDC are shown Fig. 2A. **C**, principal component analysis (PCA) including FACS-determined MFI of cell surface expression of CD80, CD86 and HLA-DR as determined from iDCs or mDC-LPS, or iDCs/mDC-R848, or iDCs/mDC-TNF- α , and the velocity, the intensity, and the time of transition.

Figure S4. Maturation of dendritic cells and autophagy flux modulation.

Immature DC differentiated from healthy donor blood monocytes were pre-treated or not with **(A)** Bafilomycin A1, **(B)** Spautin-1, **(C)** rapamycin, and matured or not for 48h with LPS. Cell surface expression of activation (CD83) and cell adhesion (CD54-ICAM1) molecules were analyzed by flow cytometry and results were expressed as median of fluorescence. For each parameter, the median is indicated with a bar.

Figure S5. Autophagy flux in dendritic cells from T300A CD patient.

Immature dendritic cells differentiated from a representative T300A CD patient were matured (CD mDC) or not (CD iDC) by a 48hrs culture with LPS. **A**, histogram of FACS-determined median of fluorescence of cell surface expression of CD80, CD86, and HLA-DR obtained from CD T300A-iDC and CD T300A-mDC. **B**, representative western blot obtained from T300A CD CD iDC and T300A CD CD mDC prior and after treatment with Baf A1.

Table 1. Baseline characteristics of the 13 patients with CD.

Figure 1:

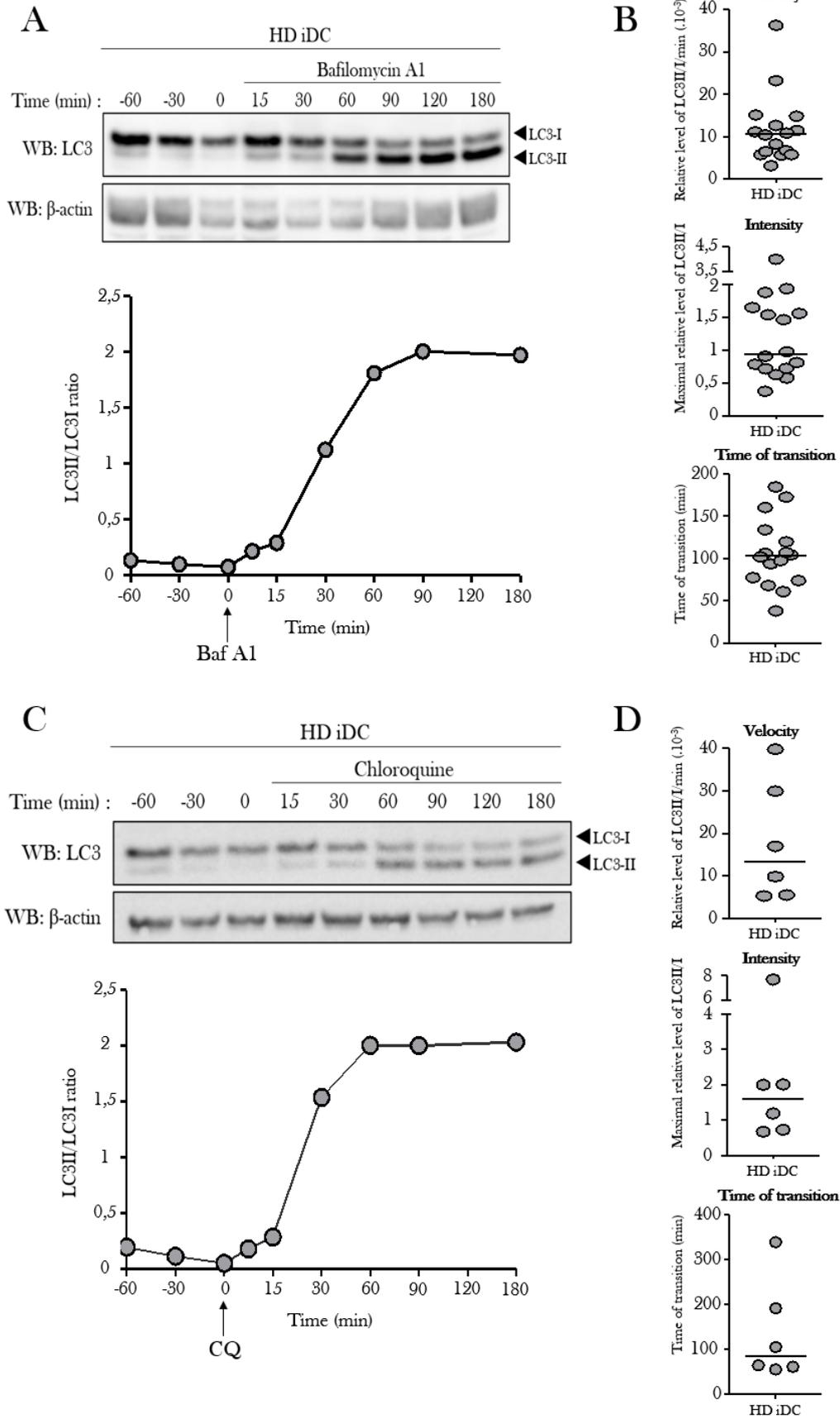


Figure 2:

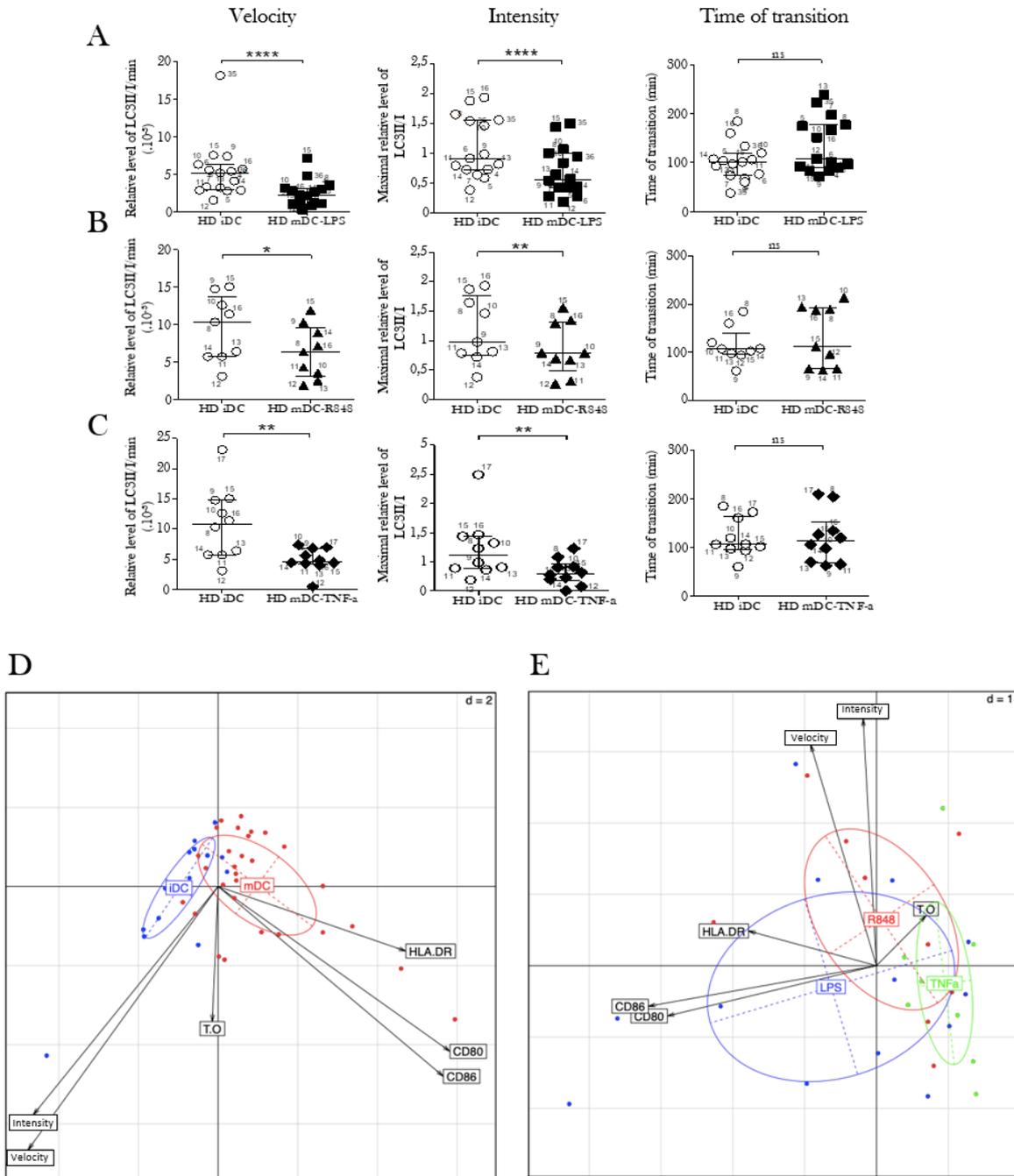


Figure 3:

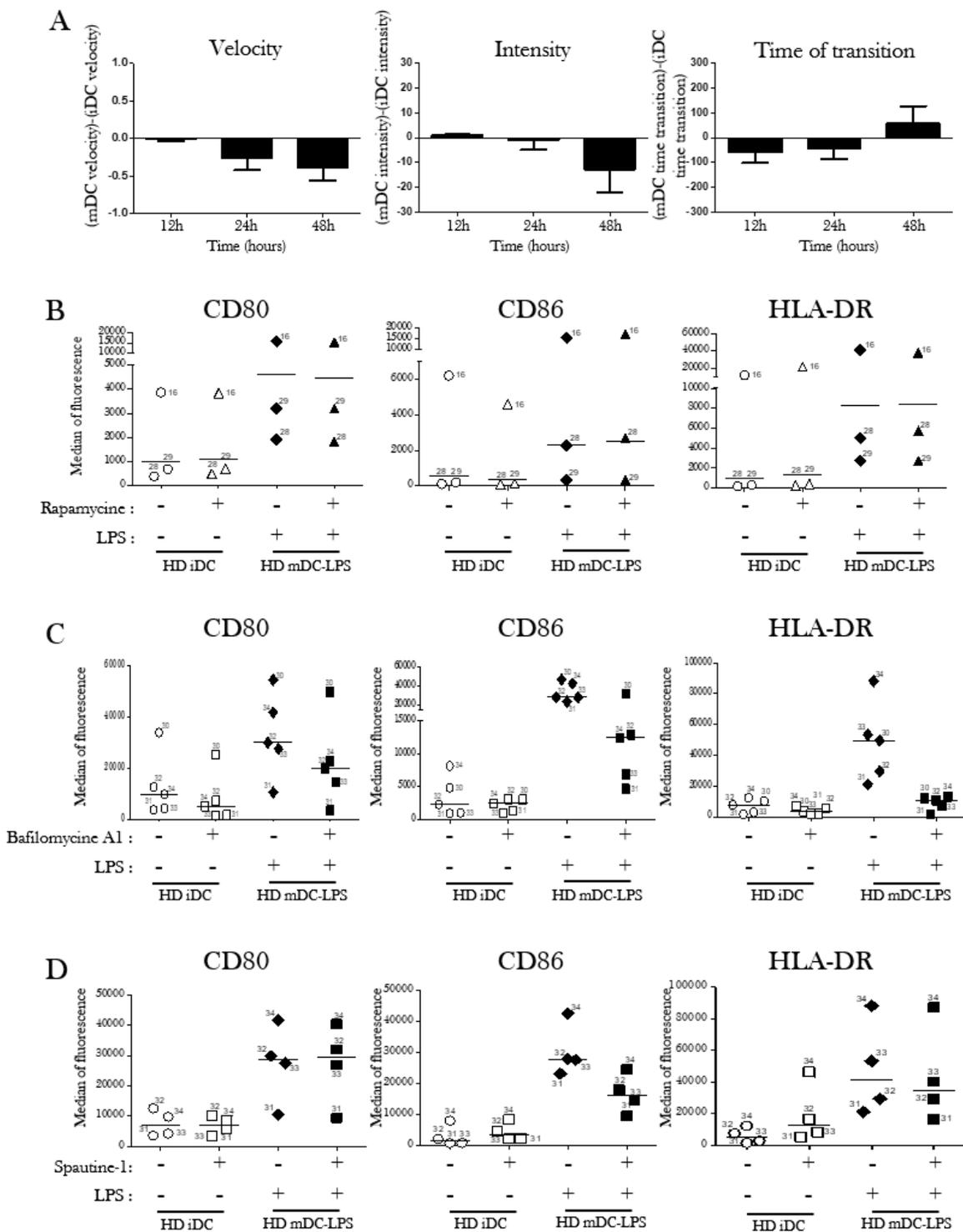


Figure 4:

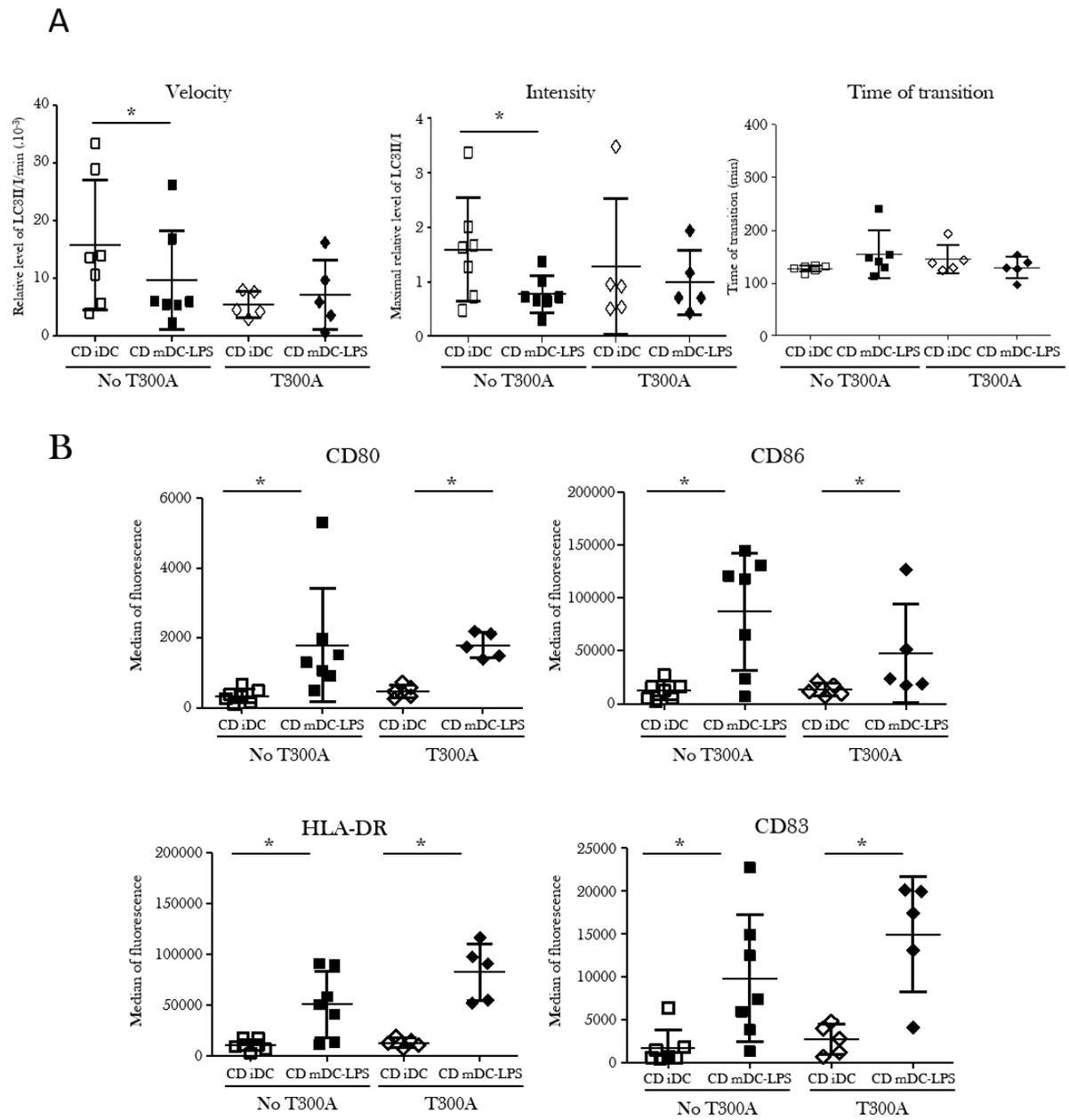


Figure S1:

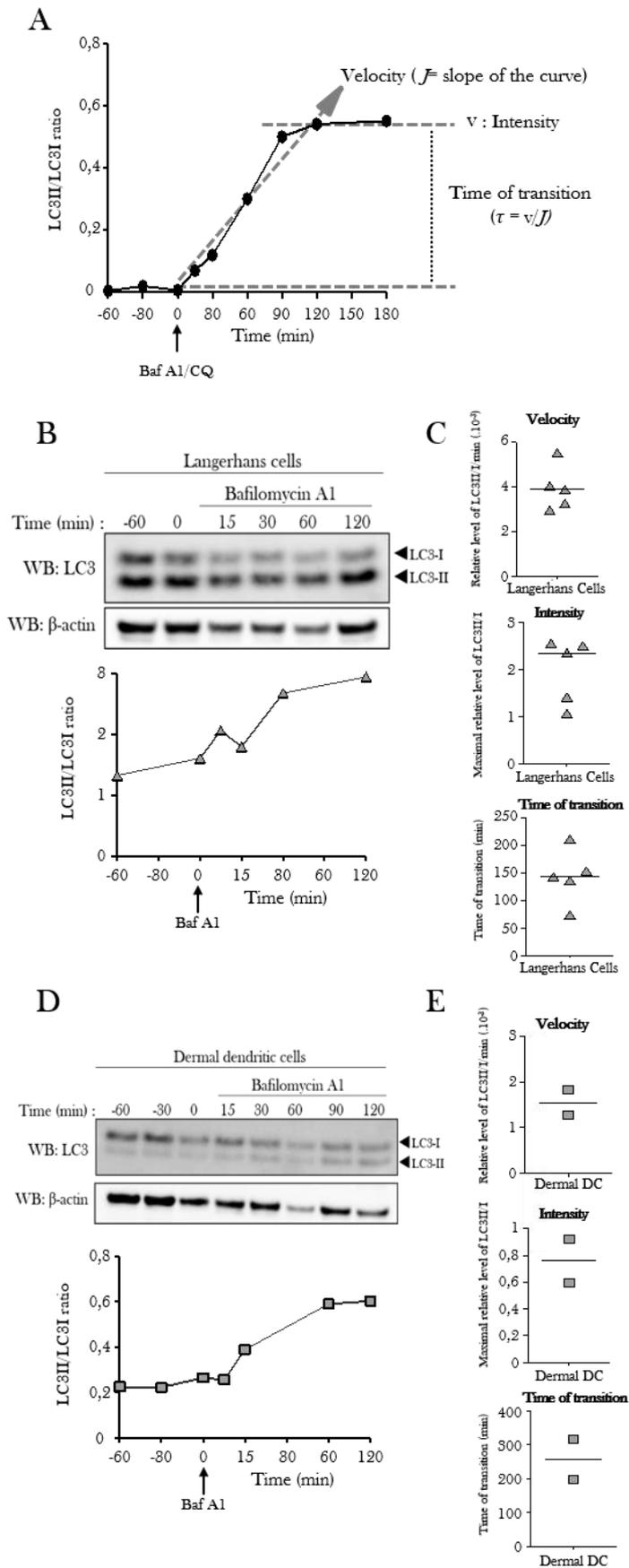
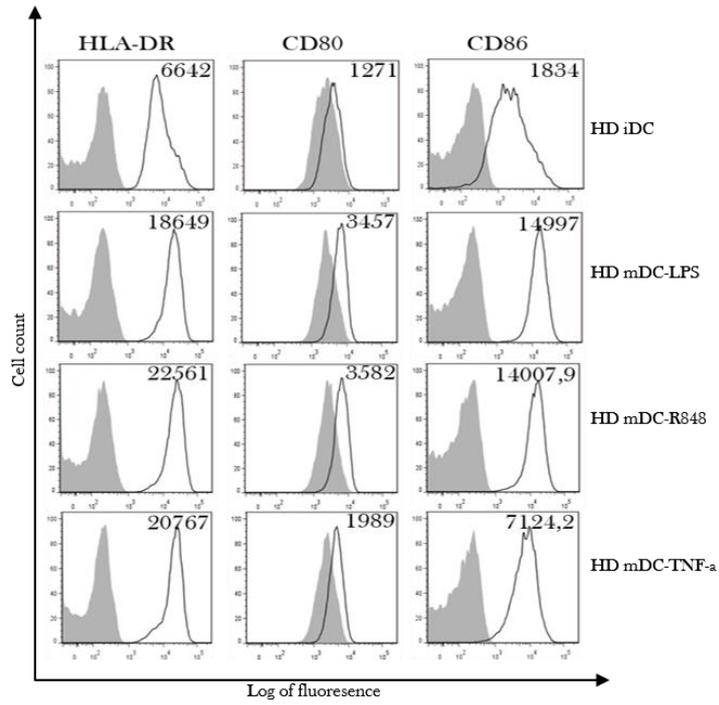
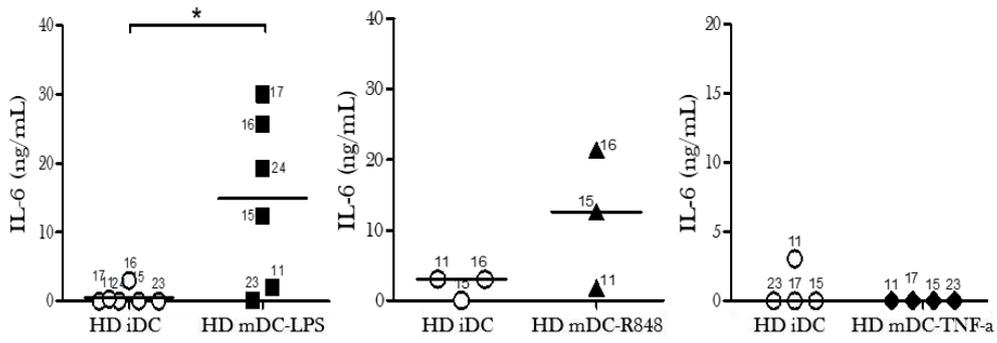


Figure S2:

A



B



C

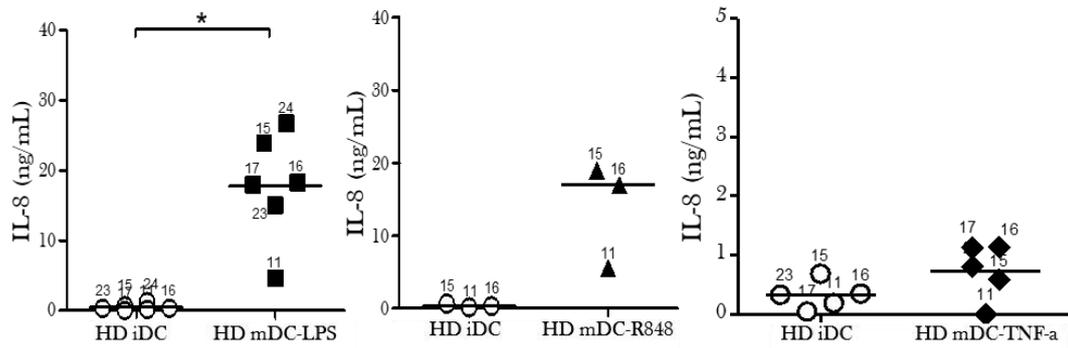
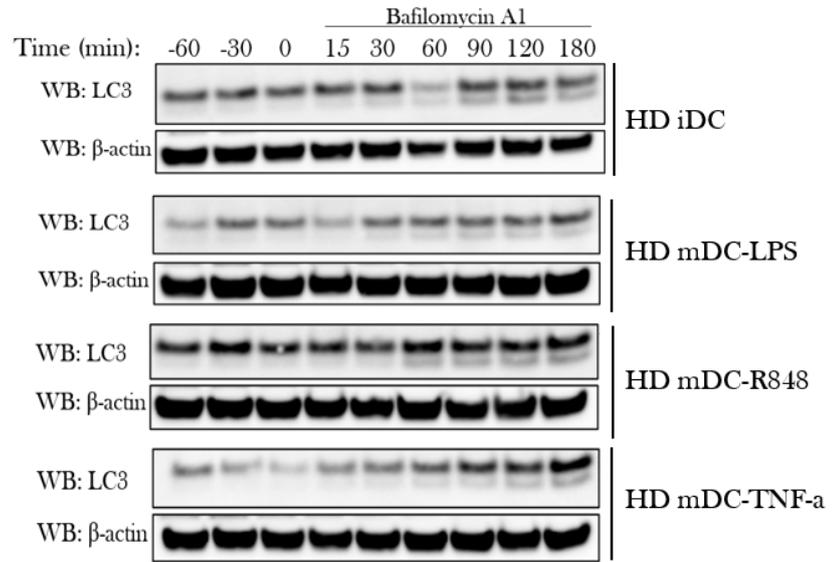
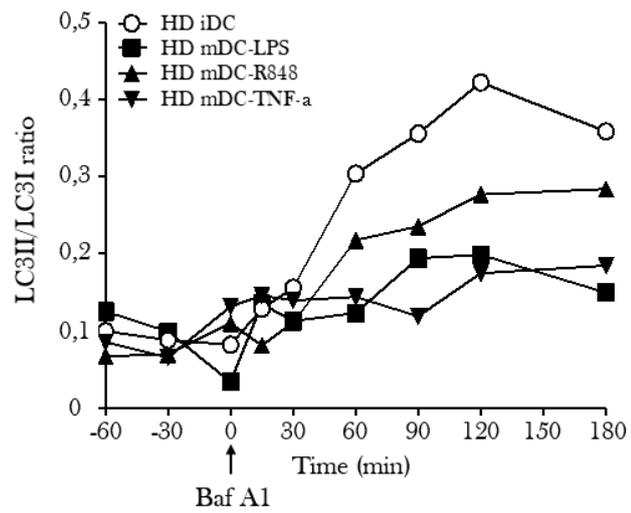


Figure S3:

A



B



C

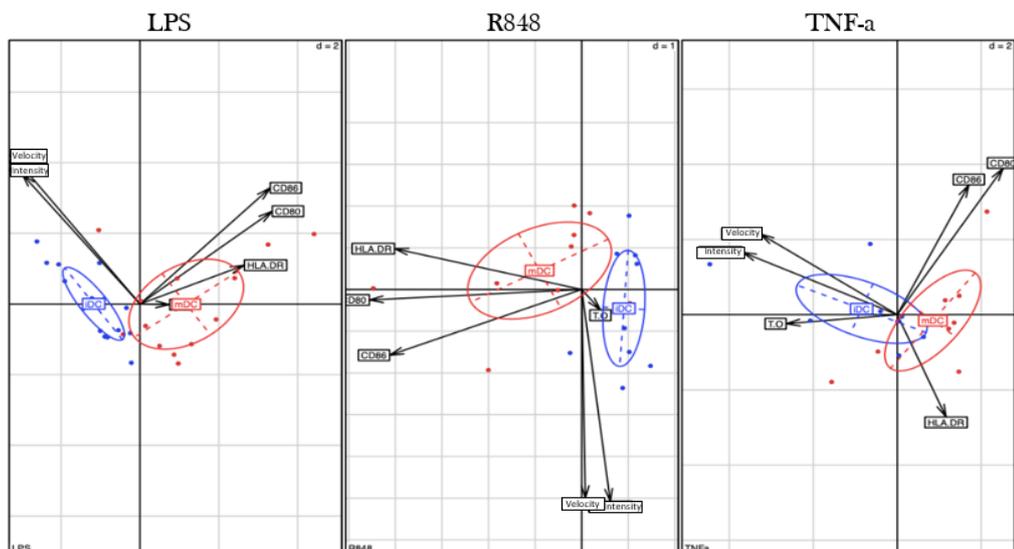


Figure S4:

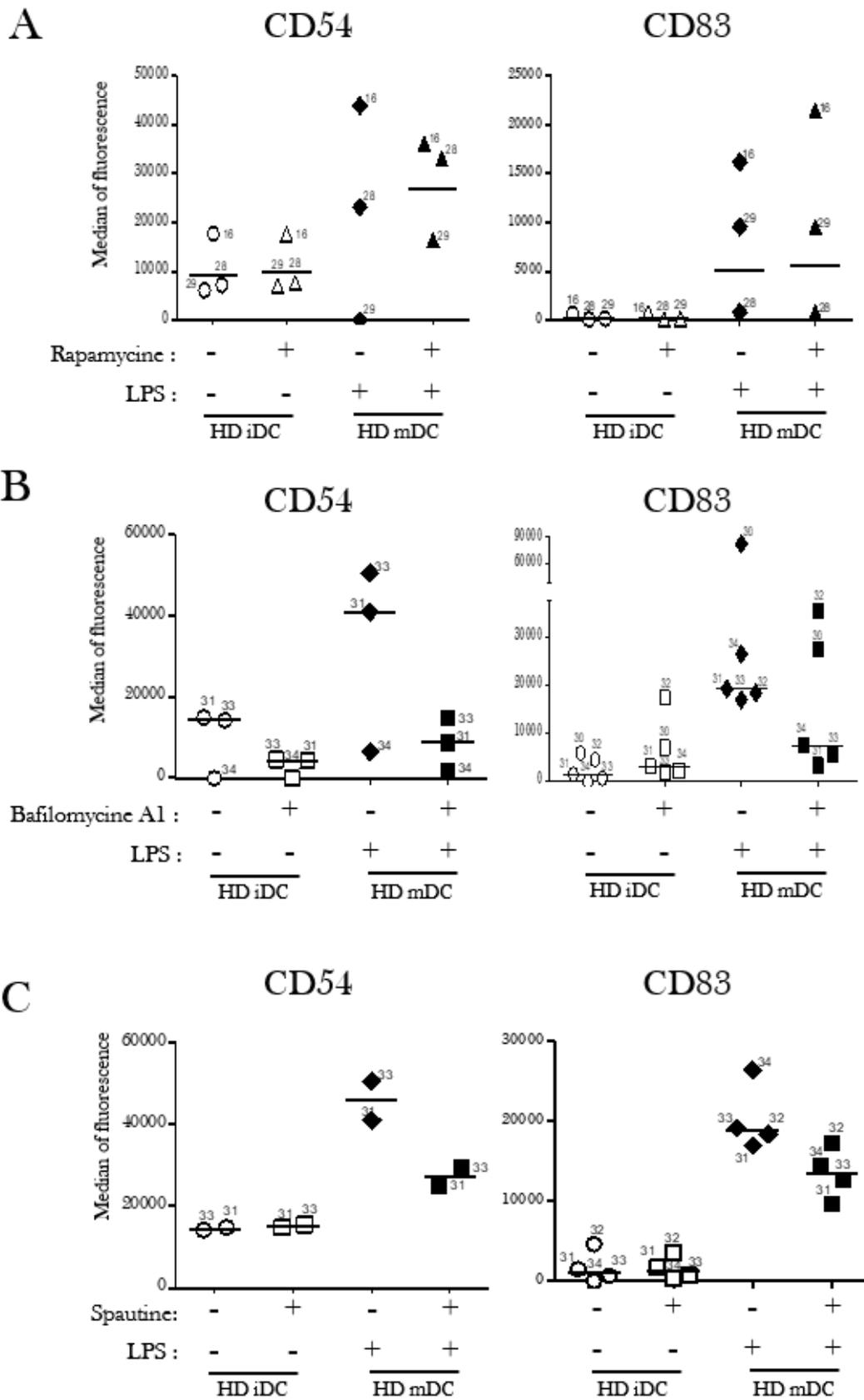
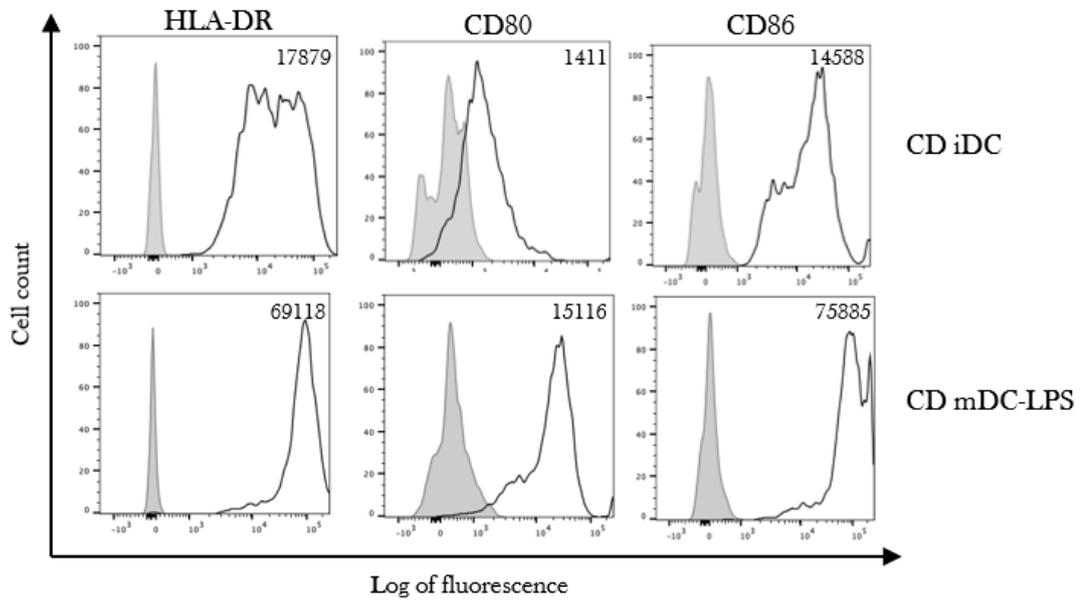


Figure S5:

A



B

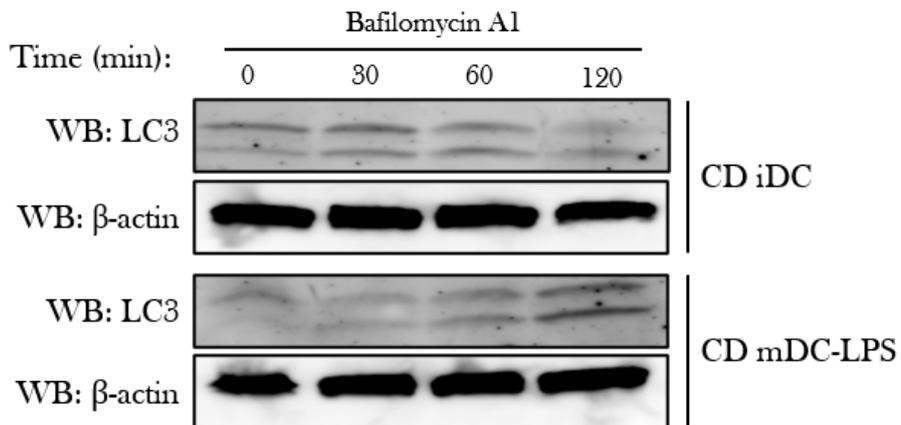


Table 1

	CD patients ATG16L1 No T300A	CD patients ATG16L1 T300A
Age at inclusion (years), mean ± SD	32,5±10,7	32,2±18,4
Female gender, n (%)	2 (40%)	3 (60%)
Active smokers, n (%)	1 (12,5%)	1 (20%)
Duration of CD (years), mean ± SD	12,9±10,6	9±14
Prior bowel resection, n (%)	4 (50%)	1 (20%)
Montreal Classification		
CD location		
L1, n (%)	0 (0%)	1 (20%)
L2, n (%)	3 (37,5%)	2 (40%)
L3, n (%)	5 (62,5%)	2 (40%)
CD behaviour		
B1, n (%)	4 (50%)	2 (40%)
B2, n (%)	3 (37,5%)	3 (60%)
B3, n (%)	1 (12,5%)	0 (0%)
Perianal lesions, n (%)	5 (62,5%)	4 (80%)
Prior medications		
Thiopurines, n (%)	5 (62,5%)	3 (60%)
Methotrexate, n (%)	2 (40%)	2 (40%)
Anti-TNF agents		
Infliximab, n (%)	3 (37,5%)	4 (80%)
Adalimumab, n (%)	3 (37,5%)	0 (0%)
Golimumab, n (%)	1 (12,5%)	0 (0%)
Ustekinumab, n (%)	1 (12,5%)	0 (0%)
Vedolizumab, n (%)	1 (12,5%)	1 (20%)
At least two biologics, n (%)	5 (62,5%)	4 (80%)
Disease's activity at inclusion		
Clinical activity		
HBI (Harvey-Bradshaw-Index), mean ± SD	3,9±3,7	3,9±8,3
HBI > 4, n (%)	3 (37,5%)	2 (40%)
Biological activity		
CRP (C-Reactive-Protein), mean ± SD	8,6±9,5	1,7±16
CRP > 5mg/L, n (%)	4 (50%)	2 (40%)
Fecal calprotectin, mean ± SD	732±993	85±47
Fecal calprotectin > 250 mg/g, n (%)	1 (12,5%)	0 (0%)
Concomitant use of medication		
Steroids	1 (12,5%)	0 (0%)
Immunosuppressors		
No one	4 (50%)	2 (40%)
Thiopurines	4 (50%)	3 (60%)
Methotrexate	0 (0%)	0 (0%)
Anti-TNF agents		
Infliximab, n (%)	3 (37,5%)	4 (80%)
Adalimumab, n (%)	0 (0%)	0 (0%)
Golimumab, n (%)	1 (12,5%)	0 (0%)
Ustekinumab, n (%)	0 (0%)	0 (0%)
Vedolizumab, n (%)	1 (12,5%)	1 (20%)

References

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767–811.
2. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med.* 2009 Dec 21;206(13):3101–14.
3. Tanoue T, Atarashi K, Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(5):295–309.
4. Bekiaris V, Persson EK, Agace WW. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):86–101.
5. Palmen MJ, Dijkstra CD, van der Ende MB, Peña AS, van Rees EP. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. *Clin Exp Immunol.* 1995 Aug;101(2):351–6.
6. Steinbach EC, Plevy SE. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Jan;20(1):166–75.
7. Torres J, Mehandru S, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet.* 2017 29;389(10080):1741–55.
8. Scharl S, Barthel C, Rossel J-B, Biedermann L, Misselwitz B, Schoepfer AM, et al. Malignancies in Inflammatory Bowel Disease: Frequency, Incidence and Risk Factors-Results from the Swiss IBD Cohort Study. *Am J Gastroenterol.* 2019;114(1):116–26.
9. Samadder NJ, Valentine JF, Guthery S, Singh H, Bernstein CN, Leighton JA, et al. Family History Associates With Increased Risk of Colorectal Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(9):1807-1813.e1.
10. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol.* 2018;53(4):379–89.
11. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011 Jun 15;474(7351):307–17.
12. de Souza HSP, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016 Jan;13(1):13–27.
13. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity.* 2019 16;50(4):992–1006.
14. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014 May;14(5):329–42.
15. Agus A, Massier S, Darfeuille-Michaud A, Billard E, Barnich N. Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:567929.
16. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Aug 21;104(34):13780–5.

17. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):207–11.
18. Momozawa Y, Dmitrieva J, Théâtre E, Deffontaine V, Rahmouni S, Charlotheaux B, et al. IBD risk loci are enriched in multigenic regulatory modules encompassing putative causative genes. *Nat Commun.* 2018 21;9(1):2427.
19. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012 Nov 1;491(7422):119–24.
20. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017 Jul 3;36(13):1811–36.
21. Viret C, Rozières A, Faure M. Autophagy during Early Virus-Host Cell Interactions. *J Mol Biol.* 2018 Jun 8;430(12):1696–713.
22. Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy.* 2018 Feb;14(2):243–51.
23. Salem M, Ammitzboell M, Nys K, Seidelin JB, Nielsen OH. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy.* 2015 Apr 3;11(4):585–94.
24. Lassen KG, Kuballa P, Conway KL, Patel KK, Becker CE, Peloquin JM, et al. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 May 27;111(21):7741–6.
25. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 2008 Nov 13;456(7219):259–63.
26. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* 2010 Jan;16(1):90–7.
27. Vazeille E, Buisson A, Bringer M-A, Goutte M, Ouchchane L, Hugot J-P, et al. Monocyte-derived Macrophages from Crohn's Disease Patients Are Impaired in the Ability to Control Intracellular Adherent-Invasive Escherichia coli and Exhibit Disordered Cytokine Secretion Profile. *Journal of Crohn's and Colitis.* 2015 May 1;9(5):410–20.
28. Conway KL, Kuballa P, Song J-H, Patel KK, Castoreno AB, Yilmaz OH, et al. Atg16l1 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from Salmonella infection. *Gastroenterology.* 2013 Dec;145(6):1347–57.
29. Zhang H, Wang D, Shihb DQ, Zhang X-L. Atg16l1 in dendritic cells is required for antibacterial defense and autophagy in murine colitis. *IUBMB Life.* 2020 Dec;72(12):2686–95.
30. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut.* 2013 Nov;62(11):1653–64.
31. Penel-Sotirakis K, Simonazzi E, Péguet-Navarro J, Rozières A. Differential capacity of human skin dendritic cells to polarize CD4+ T cells into IL-17, IL-21 and IL-22 producing cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e45680.

32. Loos B, Toit A du, Hofmeyr J-HS. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy*. 2014 Nov 2;10(11):2087–96.
33. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014 May 15;40(5):642–56.
34. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 31;102(22):7922–7.
35. Münz C. Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunol Rev*. 2016;272(1):17–27.
36. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J*. 2008 Apr 9;27(7):1110–21.
37. Shi C-S, Kehrl JH. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem*. 2008 Nov 28;283(48):33175–82.
38. Xu Y, Jagannath C, Liu X-D, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007 Jul;27(1):135–44.
39. Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, et al. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):654–69.
40. Massey D, Parkes M. Common pathways in Crohn’s disease and other inflammatory diseases revealed by genomics. *Gut*. 2007 Nov;56(11):1489–92.
41. Murthy A, Li Y, Peng I, Reichelt M, Katakam AK, Noubade R, et al. A Crohn’s disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*. 2014 Feb 27;506(7489):456–62.
42. Lassen KG, Kuballa P, Conway KL, Patel KK, Becker CE, Peloquin JM, et al. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 May 27;111(21):7741–6.
43. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008 Nov 13;456(7219):264–8.
44. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn’s disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One*. 2008;3(10):e3391.
45. Messer JS, Murphy SF, Logsdon MF, Lodolce JP, Grimm WA, Bartulis SJ, et al. The Crohn’s disease: associated ATG16L1 variant and Salmonella invasion. *BMJ Open*. 2013 Jun 20;3(6).
46. Strisciuglio C, Miele E, Wildenberg ME, Giugliano FP, Andreozzi M, Vitale A, et al. T300A variant of autophagy ATG16L1 gene is associated with decreased antigen sampling and processing by dendritic cells in pediatric Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Oct;19(11):2339–48.

II. Résultats complémentaires non-publiés

1. Analyse du flux autophagique dans des cellules dendritiques primaires

L'un des enjeux de ma thèse était de suivre et d'analyser le flux autophagique dans des DCs primaires. Pour cela, nous avons choisi de suivre le niveau d'expression de deux protéines autophagiques : LC3, une protéine essentielle de l'étape d'élongation du phagophore, et p62, qui est à la fois un récepteur autophagique et une protéine dégradée par autophagie.

Les premiers résultats complémentaires que je vais vous présenter m'ont permis de mettre en place un système permettant d'identifier la signature du flux autophagique dans des DCs primaires. Ils ont été réalisés avec des MoDCs obtenue après 5 jours de différenciation contre 7 jours dans l'article scientifique. Comme je l'ai expliqué dans la partie I.5. de l'introduction de ce manuscrit, nous nous sommes basé sur les travaux de Loos *et coll.* qui ont développé différentes approches afin de suivre le flux autophagique selon une cinétique de temps, dans une cellule donnée (Haspel et al. 2011 ; Loos et al. 2014). La difficulté de cette approche est de développer un système qui permet d'analyser des cellules primaires, à l'état basal. Pour commencer, j'ai généré des DCs dérivées de monocytes triées à partir de PBMCs issu de sang de donneurs sain, comme décrit précédemment (voir l'article scientifique). Après 5 jours de différenciations, les DCs immatures sont cultivées afin d'analyser leur flux autophagique à l'état basal (Figure 30). Le flux autophagique est mesuré au cours d'une cinétique de temps, pendant laquelle les DCs sont récupérées à différents temps indiqués dans la figure 30. La cinétique est divisée en deux parties : une première partie d'analyse qui permet de suivre le flux autophagique dans les DCs à l'état basal et une seconde partie d'analyse où les cellules sont traitées avec un inhibiteur autophagique afin de bloquer ce flux pour en évaluer les caractéristiques. Deux inhibiteurs de l'étape de maturation de l'autophagie ont été utilisés ; la bafilomycine A1 (Figure 30A) et la chloroquine (Figure 30B), provoquant tous les deux une accumulation des autophagosomes dans la cellule traitée. Afin d'analyser la dynamique de l'autophagie dans les DCs au cours de cette cinétique, la lipitation de la protéine LC3 est suivi par une analyse en western-blot. Ainsi, durant la première heure de cinétique, on peut observer un taux de LC3 lipidé (LC3-II) plus ou moins constant, ce qui indique une activité autophagique relativement constante dans les iDCs à l'état basal. Par la suite, après avoir traitées les DCs avec l'un des inhibiteurs autophagiques, on observe une accumulation progressive de LC3-II dans les DCs, ce qui suggère une accumulation progressive des autophagosomes dans la cellule. Cette accumulation est le reflet du blocage du processus autophagique à l'état basal, et démontre la présence d'un flux autophagique dynamique dans ces iDCs. Afin d'analyser la nature de ce flux, j'ai utilisé la courbe représentative du ratio de LC3-II/LC3-I au cours du temps, obtenu après la

(semi-)quantification de LC3-I et LC3-II. Cette courbe m'a permis d'estimer trois caractéristiques du flux autophagique dans les iDCs qui sont la vitesse, l'intensité du flux autophagique et le temps de transition (ou turnover autophagique). Ces caractéristiques nous ont permis de définir la signature/la nature du flux autophagique dans des DCs primaires immatures. De manière intéressante, les résultats obtenus nous ont aussi permis d'analyser la variabilité interindividuelle.

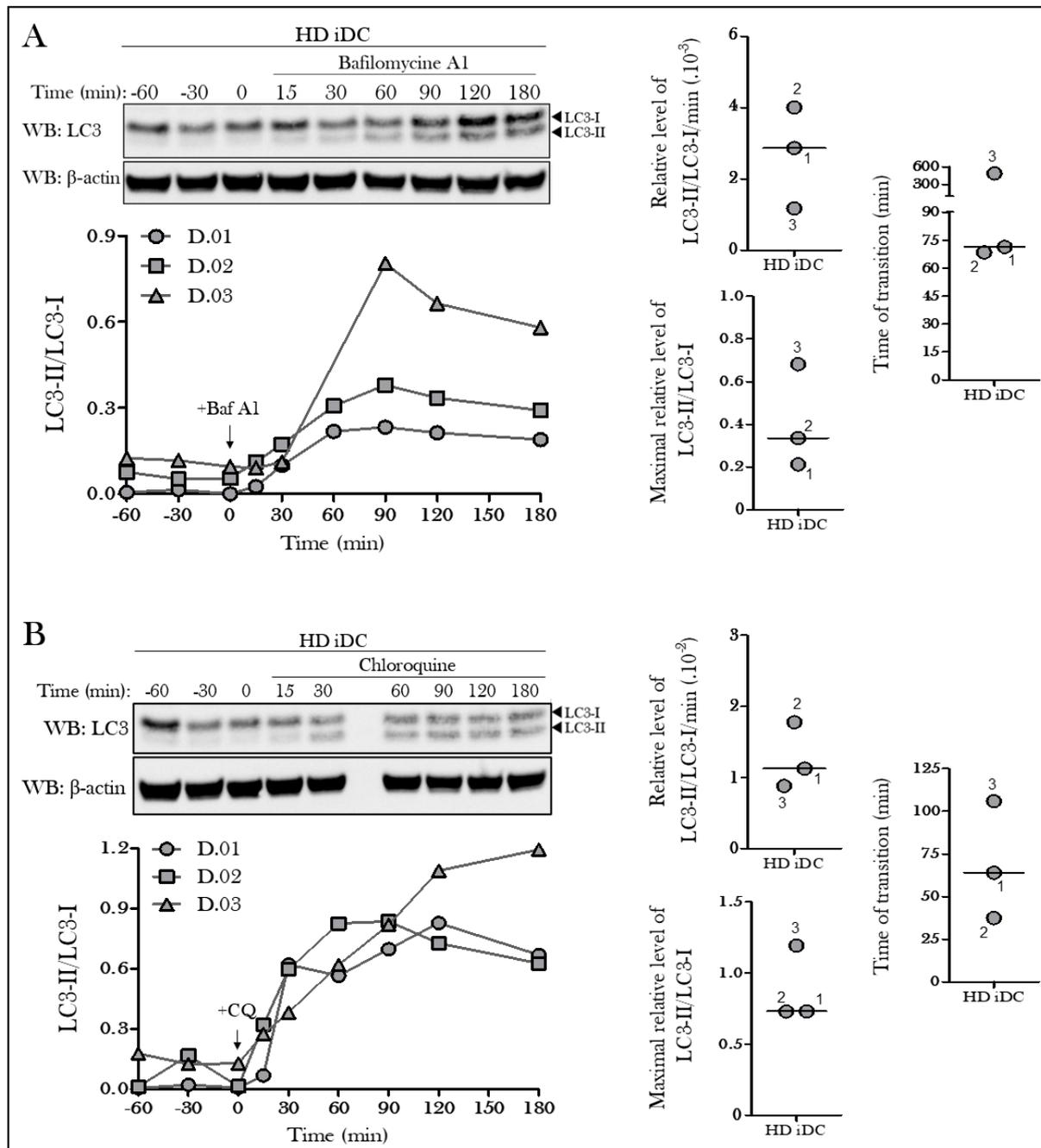


Figure 30 : Identification de la signature autophagique de cellules dendritiques immatures primaires

Des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains ont été générées après 5 jours de différenciation en utilisant du GM-CSF (20ng/mL) et de l'IL-4 (50ng/mL). Le flux autophagique dans ces DCs a été suivi via le suivi de la lipodation de la protéine LC3 par western-blot selon une cinétique de temps. Au cours de cette cinétique les cellules ont été traitées avec de la bafilomycine

AI (100nM, +Baf AI) (A), ou bien avec de la chloroquine (50µM, +CQ) (B) aux temps indiqués. A partir de la (semi-)quantification des deux formes de LC3, une courbe représentation de l'évolution du ratio LC3-II/LC3-I a été réalisé. A partir de cette courbe représentative, trois paramètres ont été mesuré afin d'identifier la signature du flux autophagique de ces DCs ; soit la vitesse, l'intensité et le temps de transition (ou turnover) du flux autophagique. La barre indique la médiane des valeurs obtenu à partir d'échantillons cellulaires issus de trois donneurs sains indépendants (ou HD pour Healthy Donnor).

Ainsi, j'ai utilisé de manière originale le suivi de la lipodation de LC3 pour suivre et analyser le flux autophagique basal dans des DCs à l'état immatures. Cette étude nous a permis d'identifier pour la première fois la nature/signature du flux autophagique dans des DCs primaires.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'évolution de la protéine autophagique p62 afin de suivre l'évolution du flux autophagique dans nos cellules. P62 est une protéine à longue durée de vie qui est dégradé par autophagie (Liu et al. 2016b) et dont l'accumulation témoigne d'un défaut d'activité autophagique.

Pour cela, j'ai généré des iDCs et des mDCs après 48h de traitement au LPS, selon le protocole présenté dans l'article scientifique. L'évolution du niveau d'expression de p62 au cours de la cinétique de temps indiqué figure 1C a été réalisé par analyses en western-blot. Ces analyses ont été faite en parallèle de l'analyse du niveau d'expression de LC3, décrit précédemment (Figure 30). Premièrement, aucune évolution de p62 n'a été observé au cours de la cinétique, que ce soit avant ou après traitement avec l'un des inhibiteurs autophagiques, et aussi bien dans les iDCs que dans les mDCs (Figure 31). Ces résultats montrent qu'un blocage du processus autophagique n'affecte pas la quantité de p62, dans les DCs étudiées. Il est intéressant de noter que les cellules dendritiques contiennent des plateformes de signalisation appelée DALIS (pour Dendritic cell Aggresome-Like Induced Structures), où de nombreuses protéines s'agrègent, dont p62 (Lelouard et al. 2002 ; Mintern et al. 2015). Au sein de ces DALIS, p62 joue le rôle de protéine de signalisation interagissant avec de nombreuses protéines, telles que des MAPKs ou la protéine TAK1 (Kehl et al. 2019). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la majorité du p62 contenu dans les DCs est localisé au sein des DALIS, ce qui les préserve d'une dégradation par autophagie. Deuxièmement, la quantité de p62 est plus importante dans les DCs matures que dans les DCs immatures. Ainsi, cela suggère que la maturation des DCs entraîne une accumulation de p62 dans ces cellules. Par ailleurs, une étude en 2002, rapporte qu'une stimulation au LPS induit la formation de DALIS dans des DCs de souris (Lelouard et al. 2002). Ainsi, nos résultats reflètent probablement une augmentation de la formation des DALIS au sein des DCs après leur maturation, associé à une augmentation de p62 au sein de ces structures. Par

ailleurs, il est tout à fait possible que le processus de maturation induit une régulation transcriptionnelle de p62, associé à une augmentation de sa concentration dans les DCs.

Pour conclure, nous avons finalement décidé de ne pas poursuivre l'analyse du niveau d'expression de p62 afin de suivre le flux autophagique dans les DCs primaires.

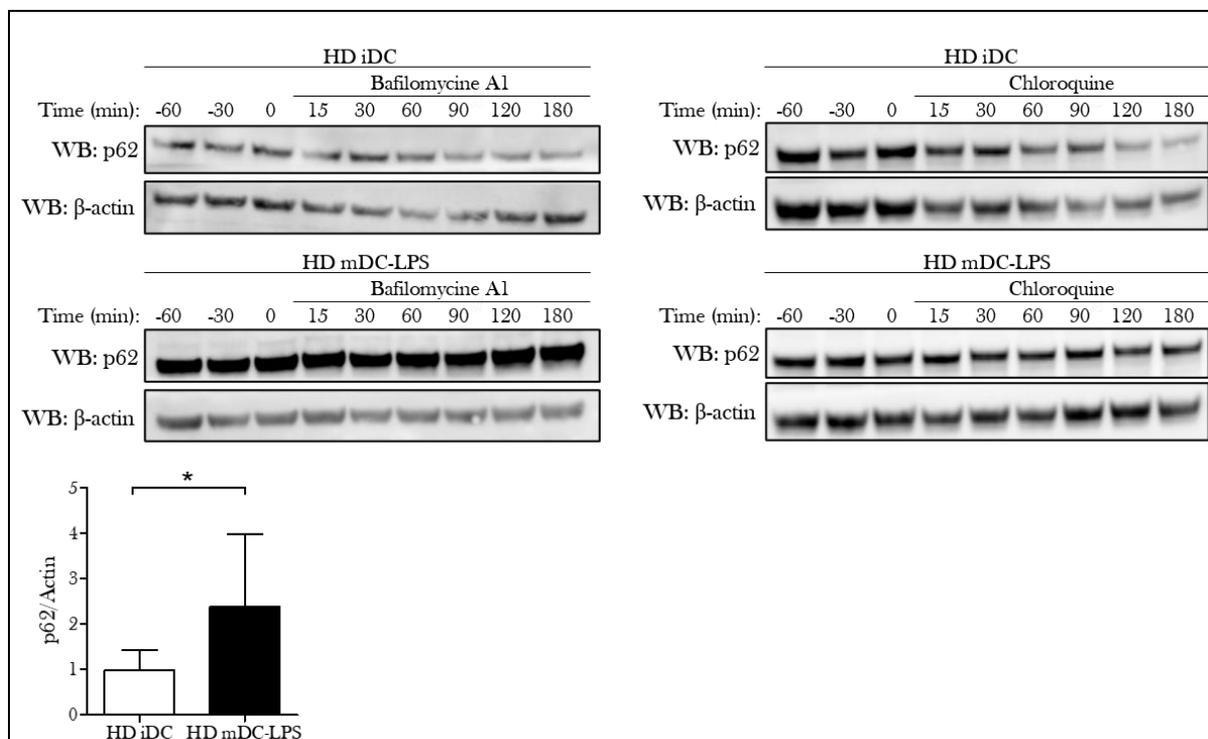


Figure 31 : Evolution de la quantité p62 dans des cellules dendritiques humaines en fonction de leur statut de maturation

Des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains ont été générées après 5 jours de différenciation en utilisant du GM-CSF (20ng/mL) et de l'IL-4 (50ng/mL), puis traitées ou non avec du LPS (1µg/mL) pendant 48 heures afin d'induire la maturation des DCs. Les cellules ont été traitées avec de la bafilomycine A1 (100nM, +Baf A1) (A), ou bien avec de la chloroquine (50µM, +CQ) (B) aux temps indiqués au cours d'une cinétique de temps. Les cellules ont ensuite été collectées afin d'en extraire les protéines et analyser le taux d'expression de la protéine p62 par western-blot ; l'analyse de l'expression de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Le ratio de p62 sur actine a été mesuré à partir de la quantification des trois premiers points de la cinétique (-60min, -30min et 0min) dans les iDCs et les mDC-LPS. Les valeurs obtenues à partir d'échantillons cellulaires issus d'au moins trois donneurs sains indépendants (ou HD pour Healthy Donnor).

2. Analyse de la fonctionnalité de l'autophagie dans les cellules dendritiques humaines en fonction de leur état de maturation : étude de la mitophagie

L'autophagie est un processus catabolique qui permet de réguler l'homéostasie intracellulaire en dégradant, notamment, des éléments cellulaires obsolètes, tels que des agrégats protéiques, des

ribosomes, ou encore des mitochondries endommagées (voir partie A.I.4. de mon manuscrit). Précédemment, je vous ai montré qu'au cours de leur maturation les DCs adaptent leur flux autophagique, vers une diminution du flux dans les mDCs en comparaison aux iDCs. Nous voulions donc évaluer la fonctionnalité de l'autophagie dans les DCs primaires en fonction de leur statut de maturation. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la mitophagie, qui correspond à la dégradation sélective des mitochondries par autophagie.

Il existe différentes voies qui permettent d'induire la mitophagie dans une cellule, et parmi ces voies nous avons choisi d'activer la voie PINK-1/Parkin, induite à la suite d'une dépolarisation des membranes des mitochondries (voir partie A.I.4.b. de mon manuscrit) (Heo et al. 2015 ; Lazarou et al. 2015b). Afin d'induire la dépolarisation, j'ai utilisé la combinaison de deux inhibiteurs mitochondriaux : l'oligomycine A qui est un inhibiteur de l'ATP synthase et l'antimycine A1 qui est un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire.

Dans un premier temps, nous avons validé l'effet de ces inhibiteurs dans des DCs primaires (Figure 32.A et B). Pour cela, j'ai généré des iDCs et des mDCs obtenues après 48h de traitement avec du LPS. Les cellules ont ensuite été traitées selon différentes concentrations d'inhibiteurs et la dépolarisation des membranes des mitochondries a été évaluée par cytométrie de flux, en utilisant une sonde TMRM (Figure 32.A). Cette sonde fluorescente fixe les mitochondries ayant une polarité membranaire chargée positivement et dont le signal diminue après dépolarisation. Ainsi, nous avons observé que la polarité membranaire des mitochondries est supérieure dans les iDCs non-traitées que dans les mDCs non-traitées. De plus, cette polarité diminue de manière dose dépendante avec les traitements oligomycine A/antimycine A1, ce qui montre que la combinaison des deux drogues induit une dépolarisation des membranes des mitochondries, quel que soit le statut de DCs. Il semblerait, cependant, que l'efficacité du traitement soit plus importante dans les iDCs, dont la dépolarisation atteint environ 80% pour les cellules traitées avec les concentrations les plus fortes d'inhibiteurs, alors qu'elle n'atteint que 65% dans les mDCs. Par la suite, j'ai analysé l'impact de cette dépolarisation sur l'expression des protéines mitochondriales Timm-23 et Tomm-20 par western-blot (Figure 32.B). Nous avons observé une diminution de l'expression de ces protéines de manière dose-dépendante, à la fois dans les iDCs et les mDCs. Ces résultats sont en faveur d'une dégradation de ces protéines, à la suite de la dépolarisation des membranes des mitochondries induite par les traitements.

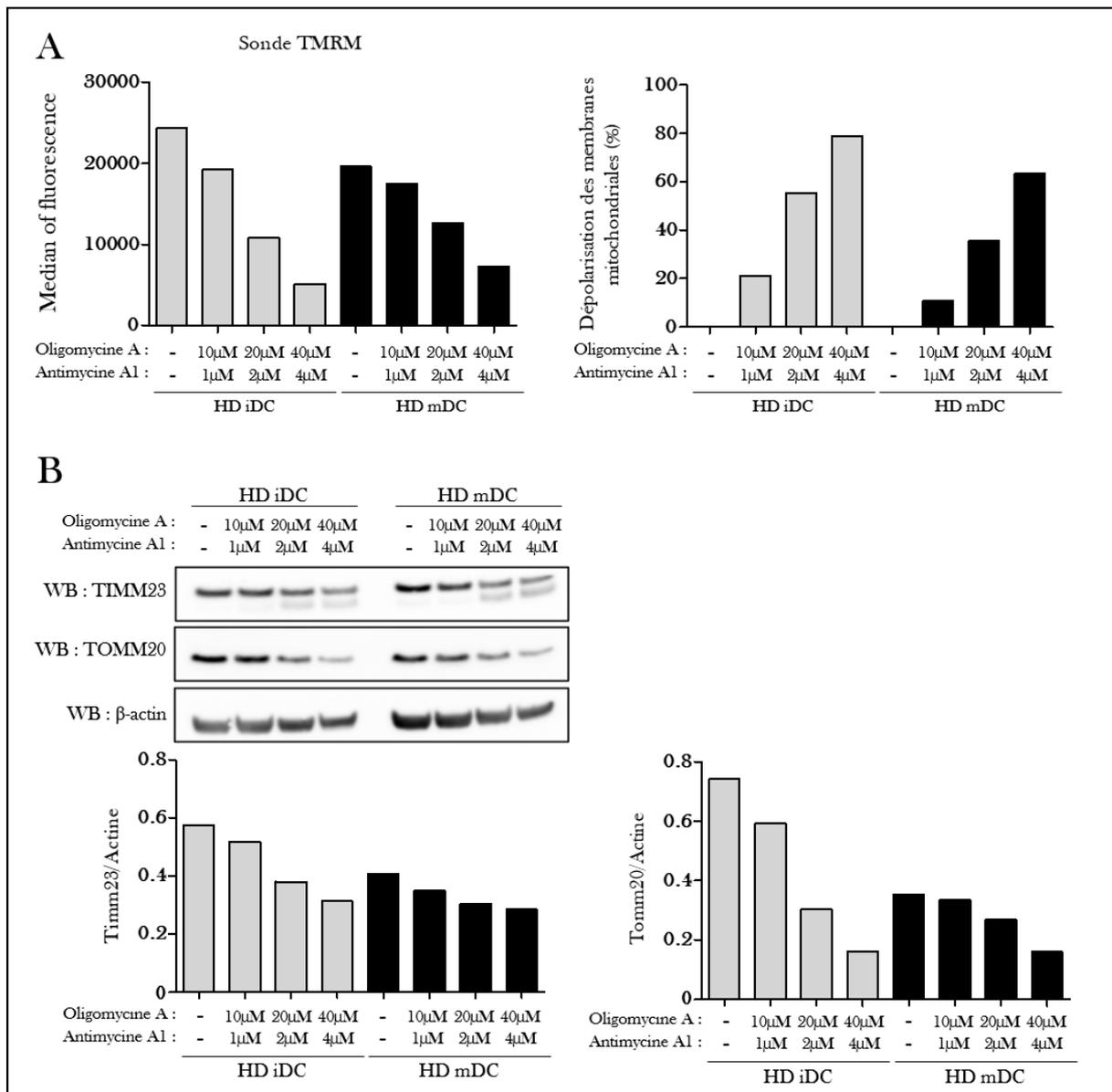


Figure 32 : Dépolarisation des membranes des mitochondries dans des cellules dendritiques humaines

Des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains ont été générées après 5 jours de différenciation en utilisant du GM-CSF (20ng/mL) et de l'IL-4 (50ng/mL), puis traitées ou non avec du LPS (1µg/mL) pendant 48 heures afin d'induire la maturation des DCs. Les DCs sont ensuite traitées, ou non, avec l'oligomycine A et l'antimycine A1 pendant 8 heures selon les concentrations indiquées (A et B). La polarité des membranes des mitochondries a été mesurée après incubation des cellules avec une sonde spécifique, la sonde TMRM (25µM) qui fixe les mitochondries dont la polarité membranaire est chargée négativement, puis analysée par cytométrie de flux (A). L'induction du processus de mitophagie, a été analysé via la mesure de l'expression des protéines Tomm-20 et Timm-23 par western-blot (B) ; la quantification de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Le taux d'expression des protéines a été quantifié en utilisant le logiciel ImageJ. Les valeurs ont été obtenues à partir d'un échantillon cellulaire issu d'un donneur sain (ou HD pour Healthy Donnor).

De plus, le taux de diminution est proportionnel au taux de dépolarisation des mitochondries dans chaque population de DCs. En effet, le niveau d'expression de Timm-23 est environ 2 fois moins important après traitement avec les inhibiteurs à la plus forte concentration dans les iDCs et d'environ 1,3 fois moins important dans les mDCs. On peut observer le même effet pour la protéine Tomm-20 dont le niveau d'expression est 4 fois moins important après traitement avec les inhibiteurs à la plus forte concentration dans les iDCs et d'environ 2 fois moins important dans les mDCs. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il y a moins de dégradation des mitochondries dans les mDCs que dans les iDCs, ce qui peut s'expliquer par l'intensité du taux de dépolarisation dans chaque population.

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons voulu vérifier si les mitochondries endommagées par les traitements oligomycine A/antimycine A1 étaient bien dégradées par mitophagie. En effet, comme je l'ai expliqué dans la partie I.4.b. de l'introduction de ce manuscrit, la voie de signalisation PINK/Parkin induite après dépolarisation des membranes dans les mitochondries permet de dégrader les mitochondries endommagées par autophagie (**Lazarou et al. 2015b**). De ce fait, il est fort probable que la diminution des protéines Timm-23 et Tomm-20 reflète l'induction de mitophagie dans les DCs. Afin de valider notre hypothèse, j'ai généré puis traité les iDCs et mDCs-LPS avec la combinaison d'inhibiteurs, associé ou non avec un traitement bafilomycine, permettant de bloquer l'autophagie. J'ai choisi de traiter les cellules avec une concentration intermédiaire d'inhibiteurs (20 μ M d'oligomycine A et 2 μ M d'antimycine A1), afin de ne pas affecter leur viabilité. Le niveau d'expression des protéines mitochondriales Timm-23 et Tomm-20, ainsi que la protéine autophagique LC3 ont été ensuite analysées par western-blot (**Figure 33**). Les résultats obtenus dans cette partie sont très préliminaires et n'ont été obtenu qu'une seule fois, ils sont donc à interpréter avec d'extrême précautions et nécessite d'être répétés.

Premièrement, à la suite des traitements oligomycine A/antimycine A1, la diminution de l'expression de Tomm-20 est associé à une augmentation de la lipidation de LC3 dans les deux populations de DCs, que nous interprétons par une activation du processus autophagique (**Figure 33**). Ainsi, Tomm-20 semble bien dégradé par mitophagie. Cependant, l'augmentation de la quantité de LC3-II est moins importante dans les mDCs, ce qui suggère un flux autophagique plus faible dans ces cellules. Ces observations sont en cohérence avec les résultats discutés dans l'article scientifique, qui démontrent une modification du flux autophagique au cours de la maturation des DCs qui tend vers une diminution de la vitesse et de l'intensité du flux. Cependant, je n'ai pas pu confirmer les résultats obtenus précédemment (**Figure 32B**) concernant

le niveau d'expression de Tomm-20 dans les iDCs non-traitées. Ainsi, ils ne nous permettent pas d'interpréter la différence de dégradation de Tomm-20 entre les iDC et les mDCs.

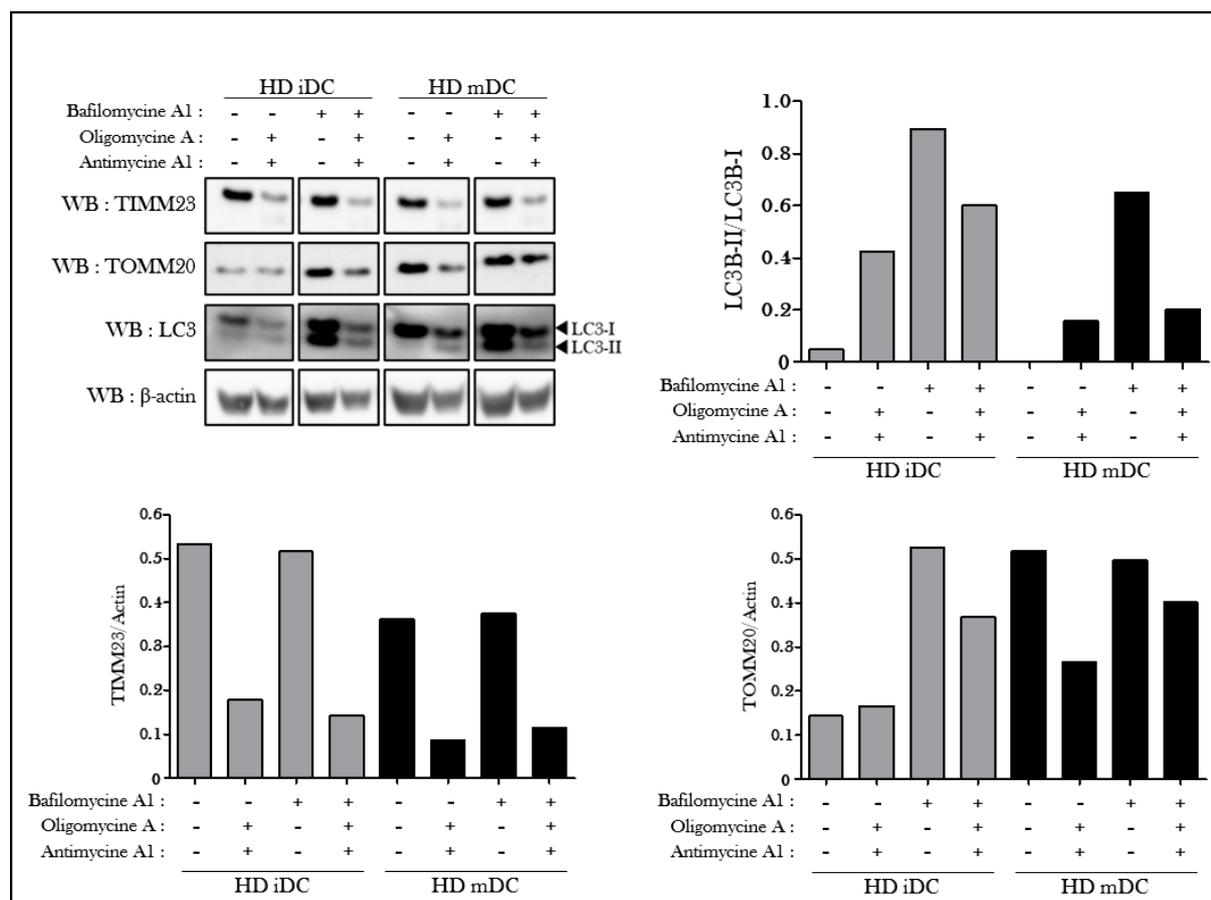


Figure 33 : Activation du processus de mitophagie dans des cellules dendritiques humaines
Des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains ont été générées après 5 jours de différenciation en utilisant du GM-CSF (20ng/mL) et de l'IL-4 (50ng/mL), puis traitées ou non avec du LPS (1 μ g/mL) pendant 48 heures afin d'induire la maturation des DCs. Les DCs sont ensuite traitées, ou non, avec l'oligomycine A et l'antimycine A1 pendant 8 heures selon les concentrations suivantes : 20 μ M d'oligomycine A, 2 μ M d'antimycine A1 et 100nM de bafilomycine A1. L'induction du processus de mitophagie, a été analysé via la mesure de l'expression des protéines Tomm-20, Timm-23 et LC3 par western-blot ; la quantification de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Le taux d'expression des protéines a été quantifié en utilisant le logiciel ImageJ. Les valeurs ont été obtenues à partir d'un échantillon cellulaire issu d'un donneur sain (ou HD pour Healthy Donnor).

Deuxièmement, nous avons observé que le traitement bafilomycine seul, n'induisait pas de modifications d'expression des protéines mitochondriales dans les deux populations de DCs (Figure 33). En revanche, lorsque les DCs ont été traitées à la fois avec la combinaison d'oligomycine A et d'antimycine A1 et avec le traitement bafilomycine, nous avons observé une diminution moins importante de l'expression de Tomm-20 à la fois dans les iDCs et les mDCs. De plus, ces résultats sont en association avec une augmentation de la lipidation de LC3, ce qui

montre que Tomm-20 est moins dégradée lorsque l'autophagie est bloquée. Cette expérience suggère qu'à la suite de la dépolarisation des mitochondries, celles-ci sont bien dégradées par mitophagie. Il est intéressant de noter que la diminution de la dégradation de Tomm-20 ainsi que l'accumulation de LC3-II, induite par le blocage de l'autophagie, est moins importante dans les mDCs que dans les iDCs. Au regard de l'ensemble des résultats obtenus, nous supposons que la baisse de mitophagie pourrait être associée à un flux autophagique moins important dans les mDCs. Ainsi, il est possible que la diminution du flux autophagique dans les mDCs soit associée à une diminution de l'activité autophagique à la suite de leur maturation.

Cependant, les résultats obtenus pour la protéine mitochondriale Timm-23 sont contradictoires avec ceux obtenus pour Tomm-20. En effet, lorsque les DCs ont été traitées à la fois avec la combinaison d'oligomycine A/antimycine A1 et la bafilomycine, nous avons observé que l'inhibiteur autophagique ne semble pas avoir d'effet sur le niveau d'expression de la protéine, aussi bien dans les iDCs que dans les mDCs (**Figure 33**). Ces résultats suggèrent que la protéine Timm-23 est dégradée via une autre voie de dégradation, indépendamment de l'autophagie. En effet, il est possible que cette protéine soit dégradée par le protéasome, tout comme les protéines MFN1/2 (**Tanaka et al. 2010**).

Pour conclure, nous supposons que l'induction de la dépolarisation des membranes des mitochondries induit par l'oligomycine A et l'antimycine A1 entraîne la dégradation des mitochondries via le processus de mitophagie, bien que certaines protéines mitochondriales semblent être dégradé via une autre voie catabolique.

3. Evaluation de la régulation du flux autophagique dans des cellules dendritiques humaines en fonction de leur état de maturation

D'après les résultats précédents, je vous ai montré qu'au cours de leur maturation, les DCs sont capables d'adapter leur flux autophagique vers une signature du flux plus faible pour les mDCs que pour les iDCs. De ce fait, nous avons cherché à comprendre quel mécanisme pouvait réguler cette adaptation. Ainsi, nous avons choisi d'analyser deux éléments qui peuvent influencer le flux autophagique dans une cellule : 1) la disponibilité en lysosomes qui contrôle la maturation des autophagosomes et 2) la voie de signalisation mTOR qui contrôlent les différentes étapes du processus autophagique (voir partie A.I.3.d. Régulation de l'autophagie de mon introduction).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la disponibilité en lysosomes dans les DCs, puisque le processus autophagique est dépendant des lysosomes présents dans la

cellule (Mizushima et al. 2010). Ainsi, j'ai généré des DCs dérivées de monocytes après 5 jours de différenciation, puis je les ai, ou non, traitées avec différents agents pendant 48h afin d'induire leur maturation. Le niveau d'expression de LAMP-1, un marqueur des lysosomes, a été analysé et (semi-)quantifié par western-blot dans chaque population de DCs ainsi obtenu (Figure 34). Les résultats observés n'indiquent aucune différence significative du taux d'expression de LAMP-1 entre les iDCs et les mDCs, quel que soit l'agent maturant utilisé. On peut donc conclure que ce n'est pas une différence de disponibilité en lysosomes qui peut expliquer l'adaptation du flux autophagiques entre ces DCs.

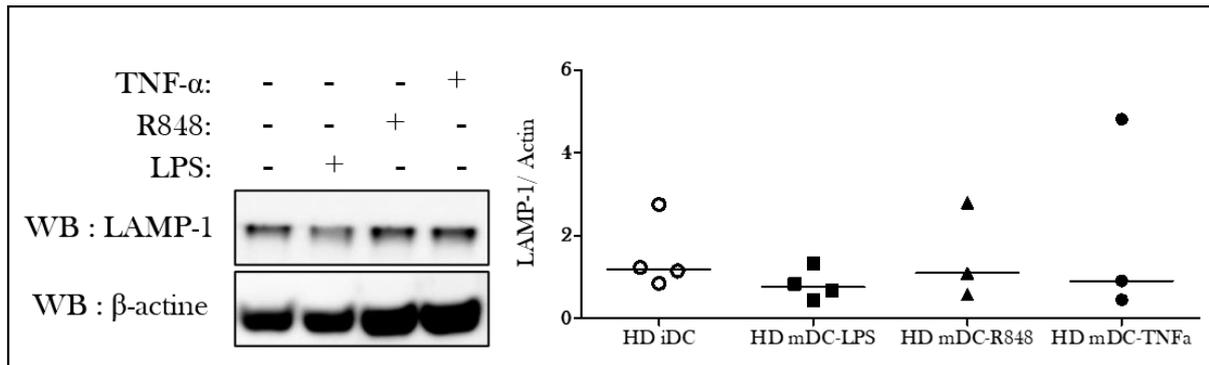


Figure 34 : Estimation de la quantité de lysosomes dans des cellules dendritiques humaines associées à leur statut de maturation

Des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains ont été générées après 5 jours de différenciation en utilisant du GM-CSF (20ng/mL) et de l'IL-4 (50ng/mL), puis traitées ou non avec du LPS (1 μ g/mL), ou du R848 (3 μ g/mL), ou encore du TNF- α (200ng/mL) pendant 48 heures afin d'induire la maturation des DCs. Les cellules ont ensuite été collectées afin d'en extraire les protéines et analyser le taux d'expression de la protéine LAMP-1 par western-blot ; la quantification de l'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Le niveau d'expression de LAMP-1 a été quantifié en utilisant le logiciel ImageJ, puis normalisé par la quantité d'actine. La barre représente la médiane des valeurs obtenues à partir d'échantillons cellulaires issus d'au moins trois donneurs sains indépendants (ou HD pour Healthy Donnor).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux différentes voies de signalisation qui régulent l'initiation de l'autophagie, et particulièrement la voie mTOR. En effet, comme je l'ai expliqué dans la partie I.3.d. de l'introduction de ce manuscrit, le complexe mTOR-C1 régule négativement l'autophagie, en phosphorylant la protéine ULK-1 au niveau de la sérine 757, afin d'inhiber l'activation du complexe d'initiation ULK (Kim et al. 2011 ; Shang et Wang 2011). En amont, ce sont les voies AMPK et AKT qui régulent la voie mTOR ; la voie AKT permet d'activer le complexe C1, alors que la voie AMPK le régule négativement (Lee et al. 2010). Afin d'analyser l'implication de la voie mTOR dans l'évolution du flux autophagique au cours de la maturation des DCs, j'ai tout d'abord généré des iDCs et des mDCs obtenues après 48h de traitement au LPS, selon le protocole décrit précédemment. Les cellules ont ensuite

été collectées afin d'analyser le niveau d'expression de plusieurs protéines qui régule l'initiation de l'autophagie par western-blot (Figure 35A), mais aussi de les (semi-)quantifier (Figure 35B). Ainsi, nous avons observé une diminution de la phosphorylation activatrice de AMPK dans les mDC en comparaison avec les iDCs, associé avec une légère augmentation de la phosphorylation négative de ULK. Cependant, aucune différence de phosphorylation des protéines AKT et S6, un substrat de mTOR-C1, n'a été observé. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il y a une augmentation de l'activité de la voie mTOR dans les mDCs, associé à une baisse de la quantité d'AMPK et une augmentation de l'inhibition du complexe ULK via la phosphorylation négative de ULK-1. Ces résultats sont très préliminaires et n'ont été obtenu qu'une seule fois, ils sont donc à interpréter avec énormément de précaution et nécessite d'être répétés, d'autant qu'il s'agit de cellules primaires. Par ailleurs, ils sont tout de même en cohérence avec les résultats discuter dans l'article scientifique, où l'on observe une adaptation de la signature du flux autophagique dans les mDCs, qui tend vers une diminution de la vitesse et de l'intensité du flux. Aussi, l'augmentation de l'activité de la voie mTOR dans les mDCs pourrait être un mécanisme moléculaire contribuant à cette adaptation.

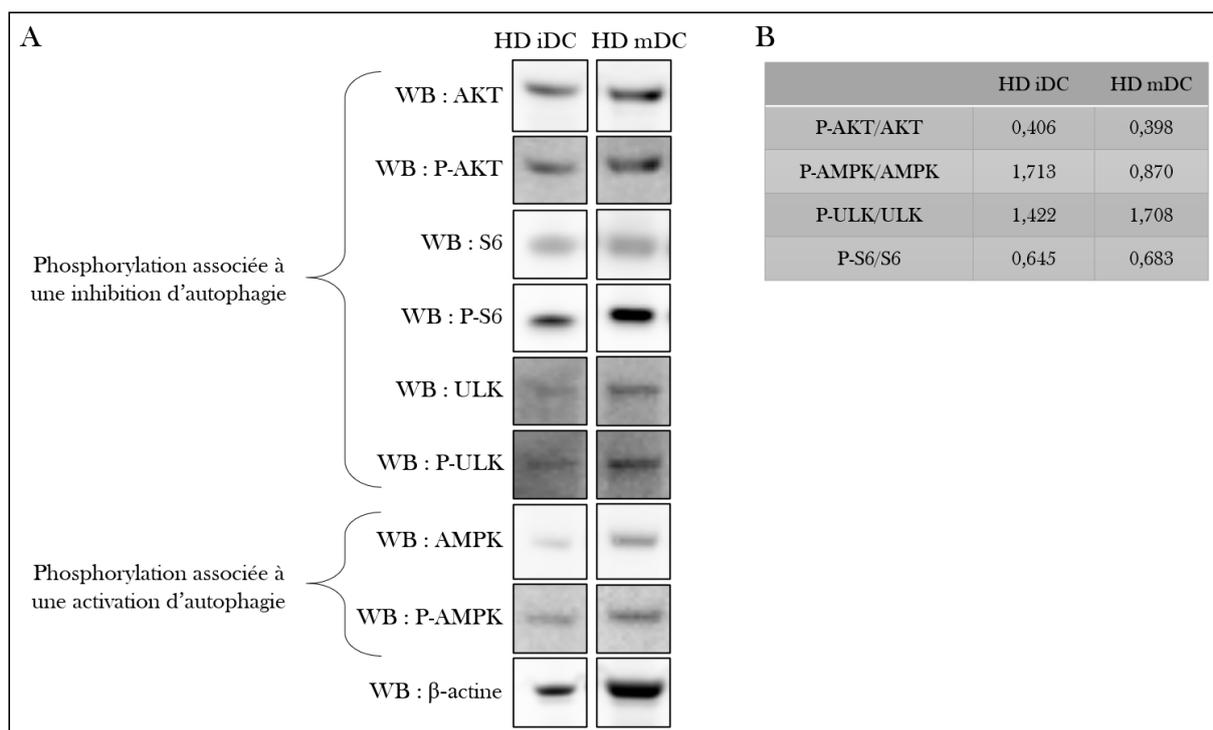


Figure 35 : Analyse des voies de signalisation qui régule l'activation de l'autophagie dans des cellules dendritiques humaines associées à leur statut de maturation

Des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains ont été générées après 5 jours de différenciation en utilisant du GM-CSF (20ng/mL) et de l'IL-4 (50ng/mL), puis traitées ou non avec du LPS (1µg/mL) pendant 48 heures afin d'induire la maturation des DCs. Les cellules ont ensuite été collectées afin d'en extraire les protéines et analyser le taux d'expression des protéines AKT, phospho-AKT (Ser473), S6, phospho-S6 (T389), ULK, phospho-ULK (ser757), AMPK

et phospho-AMPK (Thr172) par western-blot (A) ; la quantification de l'actine a été utilisé comme contrôle de charge. Le niveau d'expression des protéines phosphorylées a été quantifié en utilisant le logiciel ImageJ, puis normalisé par la quantité de protéine totale (B). Les valeurs ont été obtenu à partir d'un échantillon cellulaire issus d'un donneur sain (ou HD pour Healthy Donnor).

D. Discussion et perspectives

Au cours de ma thèse, nous avons mis en place au laboratoire un système permettant d'analyser le flux autophagique dans des cellules primaires. Ce système m'a permis de montrer que les DCs primaires ont un flux autophagique dynamique, qui s'adapte en fonction de leur état de maturation. Par la suite, mes travaux ont permis d'analyser pour la première fois la nature du flux autophagique de DCs de patients atteints de la maladie de Crohn et exprimant des polymorphismes autophagiques. Ces analyses ont démontré que les DCs exprimant un SNP impactant directement un gène du processus autophagique présentent un flux autophagique altéré à l'état immature et semble perdre leur capacité à adapter leur flux autophagique au cours de leur maturation.

1. **Identification de la signature du flux autophagique dans des cellules dendritiques primaires.**

A ce jour, l'importance de l'autophagie dans la modulation des fonctions des cellules dendritiques est bien établi (**Ghislat et Lawrence. 2018**). Cependant, à ma connaissance, il n'y a aucune étude dans la littérature qui traite de l'analyse de la dynamique du flux autophagique dans des DCs humaines, en raison, notamment, de la difficulté à travailler avec des cellules primaires. De plus, la majorité des études, qui traitent de l'autophagie dans les DCs, ont été réalisées dans des contextes infectieux, inflammatoires, ou tumoraux, permettant de moduler plus facilement l'autophagie dans une DC. Ainsi, c'est dans ce contexte que mes travaux de thèse, prennent place afin d'analyser la nature du flux autophagique dans des DCs primaires humaines à l'état basal.

Dans ces travaux, nous avons utilisé un modèle classique de cellules dendritiques générées *in vitro* à partir de monocytes humains (ou MoDCs) et différenciées en GM-CSF et IL-4. L'utilisation de cellules générées *in vitro* présente de multiples avantages, mais aussi des inconvénients. En effet, les MoDCs sont utilisées par de nombreux scientifiques comme modèle de cellules dendritiques, puisqu'elles sont plus faciles à générer et à cultiver que des DCs extraites *ex vivo* (**Sallusto et Lanzavecchia. 1994 ; Robbins et al. 2008**). Les études réalisées avec ces cellules ont permis de mieux comprendre la biologie de la DC humaine (**Segura et al. 2013b**). Cependant, il est important de ne pas oublier que ce sont des DCs générées *in vitro* à partir de monocytes et non de précurseurs issus de la moelle. De plus plusieurs études montrent qu'elle possède un profil transcriptomique différent des DCs extraites *ex vivo* (**León et al. 2005 ; Segura et al. 2013b**). C'est à partir de MoDCs que j'ai développé le système d'analyse permettant d'évaluer la signature du flux autophagique dans des DC humaines. Par ailleurs, j'ai eu la chance de pouvoir valider ce système en l'appliquant dans des DCs cutanées extraites *ex vivo* (utilisation de cellules dendritiques cutanées ; LCs et DDCs). Il est donc tout à fait pertinent d'utiliser les

MoDCs comme modèle cellulaire pour notre étude. Pour plus de clarté, j'ai écrit DCs pour faire référence aux MoDCs.

Afin d'analyser le flux autophagique dans des DCs primaires, j'ai suivi la lipidation de la protéine autophagique LC3 et la dégradation de p62 par western-blot. L'utilisation du suivi de la lipidation de LC3 est communément utilisée pour analyser le processus autophagique, étant donné que le LC3 lipidé (ou LC3-II) est localisée dans la membrane des autophagosomes (Klionsky et al. 2016). En effet, la mesure du ratio LC3-II/LC3-I (ou de manière simplifiée « LC3 lipidé/LC3 non-lipidé ») à un instant t, avant et après traitement avec un inhibiteur de la dégradation des autophagosomes, permet de valider ou non une modulation du processus autophagique en estimant le nombre d'autophagosomes dans une cellule à cet instant t. Pour aller plus loin et afin d'analyser la dynamique du processus autophagique, nous avons choisi d'analyser la qualité de ce flux en suivant la lipidation de LC3 par western-blot au cours d'une cinétique de temps. Cette idée émerge de deux études qui ont mis en évidence l'intérêt d'analyser le processus autophagique selon une cinétique de temps pour pouvoir en évaluer la dynamique (Haspel et al. 2011 ; Loos et al. 2014). De manière intéressante, Loos *et coll.* ont développé un système basé sur le suivi d'autophagosomes, classiquement réalisé en microscopie confocale, en utilisant ou non des inhibiteurs de la maturation autophagique, au cours d'une cinétique de temps. Ce système leur a permis de quantifier les autophagosomes au cours du temps et d'évaluer la dynamique du flux d'autophagosomes dans des fibroblastes de souris (Loos et al. 2014). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser deux inhibiteurs autophagiques, communément utilisés : la bafilomycine A1 et la chloroquine. Par ailleurs, nous avons privilégié l'utilisation de la bafilomycine A1, en raison d'une étude publiée en 2017 qui rapporte que la chloroquine peut induire de la lipidation non-spécifique de LC3, localisée au niveau des endosomes (Jacquin et al. 2017). Le système d'analyse que j'ai mis en place au sein du laboratoire a l'avantage de permettre un suivi dynamique de l'évolution de LC3-II dans des cellules primaires sur un temps court. Une cinétique courte permet d'éviter une régulation négative du processus autophagique via un blocage du flux autophagique sur une longue durée (Chittaranjan et al. 2015). A partir nos résultats nous avons ensuite défini trois paramètres permettant de caractériser ce que l'on a appelé « la signature du flux autophagique », qui sont : la vitesse, l'intensité et le temps de transition du flux autophagique d'une cellule donnée. L'application de cette analyse à diverses populations de cellules dendritiques a permis de démontrer que chaque type DCs humaines analysées possède un flux autophagique dynamique et spécifique, que ce soit au sein de DCs générées *in vitro* ou de DCs extraites *ex vivo* (cellules dendritiques cutanées ; cellules de Langerhans (ou LCs) et cellules dendritiques du derme (ou DDCs)). En effet, il est intéressant de noter que le flux

autophagique mesuré dans les LCs est bien plus intense que celui mesuré dans les DDCs. Cette différence d'intensité de flux pourrait témoigner d'une spécificité de l'activité autophagique associée aux fonctions spécifiques des DCs.

Afin de compléter mon analyse du suivi de la lipidation de LC3, j'ai donc analysé la dégradation de p62 par western-blot, étant un récepteur autophagique ainsi qu'une protéine à longue durée de vie dégradé par autophagie. Malgré l'utilisation de différents inhibiteurs autophagiques (bafilomycine A1 et chloroquine), je n'ai pas observé de variation d'expression de p62 dans les DCs que j'ai analysés, quel que soit leur statut de maturation. Il est intéressant de noter que p62 est une protéine multifonctionnelle, intervenant à la fois dans le processus autophagique, en tant que récepteur autophagique, mais aussi en tant que protéine de signalisation (Liu et al. 2016 ; Kehl et al. 2019). De plus, il a été décrit qu'après leur maturation, les DCs diminuent fortement leurs capacités à capturer, détecter et dégrader des antigènes (Sallusto et al. 1995 ; West et al. 2000). On peut alors supposer que p62 sera alors moins sollicité pour ses fonctions dans le ciblage et l'adressage des cargos vers une dégradation autophagique, mais plus pour ses fonctions de protéine de signalisation. Il est intéressant de noter que p62 peut se retrouver concentré au niveau de structures appelées DALIS, qui sont des plateformes de signalisations composées d'agrégats protéiques au sein des DCs (Lelouard et al. 2002 ; Mintern et al. 2015). Par ailleurs, il a été montré que la formation de DALIS augmente avec la maturation des DCs, associée alors à une accumulation de p62 au sein de ces structures (Lelouard et al. 2002 ; Mintern et al. 2015). Ainsi, il est possible que l'utilisation du western-blot ne permette pas d'analyser de faibles variations de p62 dans les DCs, en particulier dans les mDCs.

Ainsi, nous pensons que notre système de suivi de la lipidation de LC3 selon une cinétique de temps dans des DCs est suffisamment efficace, puisqu'il nous a permis d'identifier la signature autophagique de diverses populations de DCs primaires. Cette signature du flux autophagique est basée sur la mesure de paramètres quantitatifs de ce flux, qui sont la vitesse, l'intensité et le temps de transition/renouvellement.

Pour conclure sur cette première partie, au regard de l'ensemble de ces résultats, nous supposons que chaque type de DC humaine possède sa propre signature du flux autophagique. Il serait donc intéressant de comprendre quel mécanisme régule cette spécificité. Deux hypothèses peuvent être envisagées : 1) l'influence de l'environnement, qui pourrait alors conditionner la DC et la signature de son flux autophagique, ou 2) la qualité du flux autophagique serait une fonction intrinsèque et propre à chaque type de cellules dendritiques.

2. Adaptation du flux autophagique au cours de la maturation des cellules dendritiques humaines

L'autophagie est un processus essentiel à la biologie de la cellule dendritique, impactant les différentes fonctions de cette cellule quel que soit son statut de maturation (**Ghislat et Lawrence. 2018**). En effet, dans les iDCs, l'autophagie est importante pour capturer et dégrader certains antigènes, mais aussi pour lui permettre de mûrir complètement. Son rôle au sein des mDCs a été surtout étudié pour son impact dans la genèse et l'apprêtement des antigènes, mais aussi dans l'activation et la polarisation des LTs.

Dans mes travaux de thèse, j'ai confirmé l'importance de l'autophagie dans l'acquisition des marqueurs de maturation dans les DCs humaines (**Cooney et al. 2010 ; Min et al. 2010**), tels que le CD86, CD83, HLA-DR et CD54. En effet, j'ai montré qu'à la suite d'un blocage du processus autophagique, via l'utilisation de la bafilomycine A1 ou de la spautin-1, les DCs ainsi traitées ont un profil de maturation moins important que les DCs non traitées après 24h de stimulation au LPS. Cependant, il s'est avéré que le phénotype observé après utilisation de la spautin-1 était moins fort que le phénotype obtenu après traitement des DCs avec la bafilomycine. Il est possible que ces résultats reflètent une différence d'efficacité de blocage de l'autophagie. Néanmoins, il n'est pas à exclure que la bafilomycine, en bloquant l'acidification des lysosomes affecte le transport des molécules du CMH-II vers la membrane plasmique des DCs (**Chow et al. 2002 ; Trombetta et al. 2003**). Pour aller plus loin, il serait intéressant d'identifier le mécanisme qui permet à l'autophagie de réguler l'expression des marqueurs de maturation dans les DCs humaines. Deux hypothèses sont à envisager : 1) une (ou plusieurs) protéine(s) autophagique(s) peut(vent) interagir avec un intermédiaire moléculaire commun à tous les marqueurs de maturation, ou 2) une (ou plusieurs) protéine(s) autophagique(s) peut(vent) interagir avec différents intermédiaires moléculaires régulant chacun un ou plusieurs marqueurs de maturation.

Plusieurs études montrent qu'il est possible de moduler le processus autophagique via l'engagement/la stimulation de TLRs, à la fois dans des DCs humaines (**Blanchet et al. 2010 ; Manuse et al. 2010 ; Zhou et al. 2012 ; Severa et al. 2013 ; El-Awady et al. 2015 ; Minter et al. 2015**) et des DCs murines (**Terawaki et al. 2015**). Certaines de ces études montrent que la stimulation de TLRs active le processus autophagique dans les premières heures de stimulation en parallèle de l'induction de la maturation des DCs (**El-Awady et al. 2015**), démontrant alors l'impact direct de la stimulation de TLRs sur l'autophagie. Par ailleurs, d'autres études montrent une diminution/inhibition de l'autophagie après au moins 12h après l'engagement de TLRs (**Blanchet et al. 2010 ; El-Awady et al. 2015**), ce qui suggère un impact de la maturation des DCs sur le processus autophagique, induite par l'engagement des TLRs. Ces résultats posent la question

suivante : pourquoi l'autophagie est-elle diminuée dans des mDCs, sachant que c'est un processus important pour leurs fonctions biologiques (notamment en support de la présentation antigénique) ? Mes travaux de thèse ont montré que la maturation des DCs induit une modification de la dynamique du flux autophagique et non pas une diminution du processus autophagique. En effet, nous avons montré, qu'à la suite de la maturation de DCs primaires, induite après 48h de stimulation par les ligands de TLRs ou un ligand de TNF-Rs, la dynamique du flux autophagique de ces cellules s'adapte, passant d'un flux rapide et intense dans les iDCs à un flux lent et moins intense dans les mDCs, sans modification du temps de transition. Il est intéressant de noter que ce temps de transition, autrement appelé temps de renouvellement du pool d'autophagosomes, n'évolue pas au cours de la maturation des DCs. On peut alors supposer qu'en maintenant ce renouvellement la cellule conserve son homéostasie cellulaire, quel que soit son statut de maturation. Par ailleurs, nous avons montré que cette modification de la dynamique du flux autophagique se faisait progressivement à partir de 12h post-stimulation. Ces résultats montrent que l'adaptation du flux autophagique est induite tardivement au cours du processus de maturation des DCs humaines. On peut donc se demander : (1) quel est l'impact de cette adaptation sur la fonctionnalité de l'autophagie ? ; (2) quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) régule(nt) cette adaptation ? et 3) quel(s) est(ont) l'(les) impact(s) sur les fonctions de la cellule dendritique ? Par ailleurs, les résultats obtenus dans cette étude ont été réalisés à partir de DC dérivées de monocytes, il serait donc intéressant d'évaluer si ce processus d'adaptation du flux autophagique est partagé par tous les sous-types de cellules dendritiques.

3. Impact sur la fonctionnalité de l'autophagie

Au cours de ces travaux, j'ai analysé l'impact de l'adaptation du flux autophagique sur la fonctionnalité de l'autophagie dans les DCs primaires en fonction de leur statut de maturation. L'autophagie étant un mécanisme du catabolisme, il permet d'éliminer diverses organelles, agrégats protéiques ou encore microorganismes. Afin d'analyser la fonctionnalité de l'autophagie, nous avons choisi d'étudier la mitophagie, qui correspond à la dégradation sélective des mitochondries par autophagie. Ainsi, j'ai analysé l'activation de ce processus dans des DCs, en fonction de l'état de maturation. Les résultats très préliminaires obtenus suggèrent que la dégradation des mitochondries est plus intense dans les iDCs que dans les mDCs. Il semblerait alors que c'est après leur maturation que l'intensité de la mitophagie diminue dans les DCs. Ces résultats sont en cohérence avec une adaptation du flux autophagique vers une diminution de sa vitesse et de son intensité. Par ailleurs, il a été montré que la mitophagie s'active dans les DCs humaines pour permettre leur maturation. En effet, Basit *et coll.* ont montré qu'à la suite d'une stimulation de DCs conventionnelles (ou cDCs) humaines, par des ligands de TLR, la mitophagie

s'active pour supporter une transition métabolique, passant d'un métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique, nécessaire à leur maturation. (Basit et al. 2018). Il semblerait alors que la mitophagie soit nécessaire aux iDCs, pour permettre leur maturation, et moins essentiel aux mDCs, au niveau desquelles l'intensité du processus est moins importante. Ainsi, on peut supposer que la modification de la dynamique du flux autophagique au cours de la maturation des DCs, entraîne une adaptation des fonctionnalités de l'autophagie, en support des nouveaux besoins physiologiques de la cellule. Cette adaptation est associée à une réduction de la mitophagie dans les mDCs, auquel pourrait s'ajouter une ou plusieurs autres modifications d'autophagie sélective. Par ailleurs, il est d'abord nécessaire de confirmer nos résultats, qui sont très préliminaires.

4. Régulation de l'adaptation du flux autophagique dans les DCs primaires au cours de leur maturation

Précédemment, j'ai décrit que lors de la maturation des DCs, le flux autophagique est modifié passant d'un flux fort dans les iDCs vers un flux faible dans les mDCs. A la suite de ces résultats, j'ai cherché à comprendre quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) régule(nt) cette adaptation.

Il existe différentes manières d'induire la maturation de DCs, notamment via l'engagement des TLRs (Dalod et al. 2014). De ce fait, j'ai utilisé différents agents de stimulation afin de générer différents types de mDCs. Deux de ces agents activent deux voies de TLR dépendante de l'adaptateur MyD88 (via l'utilisation du LPS, ligand de TLR-4 et via l'utilisation du R848, ligand de TLR-7/8), et un dernier agent active la voie du TNF (via l'utilisation du TNF- α , ligand du TNF-R1 notamment). Ainsi, nous avons montré que le flux autophagique s'adapte indépendamment de la voie de la signalisation engagée afin d'induire la maturation des DCs. En contexte physiologique, lorsque les DCs rencontrent un microorganisme, ce sont plusieurs récepteurs qui sont alors engagés, et qui permettent la maturation des DCs. Il serait donc intéressant de tester : 1) la stimulation de iDCs via plusieurs agents de maturation simultanément ou 2) la stimulation de iDCs avec différents microorganismes vivants indépendamment. Ainsi nous pourrions analyser si l'engagement de plusieurs PRRs à un effet additif ou redondant sur la modification de la dynamique du flux autophagique dans les DCs au cours de leur maturation.

De nombreuses études rapportent l'activation de la voie mTOR, une voie essentielle pour la régulation de la biologie de la DCs, à la suite de l'engagement de TLRs (Krawczyk et al. 2010 ; Snyder et Amiel. 2019 ; Rezinciuc et al. 2020). Il est intéressant de noter que cette voie peut réguler l'ensemble des étapes du processus autophagique. En effet, il a été montré que la voie mTOR peut inhiber l'étape d'initiation de l'autophagie en phosphorylant notamment la protéine

ULK-1, inhibant l'activation du complexe d'initiation ULK (Shang et Wang. 2011 ; Puente et al. 2016). Dans mes travaux de thèse, des résultats très préliminaires suggèrent une régulation négative de l'autophagie dans les mDCs par la voie mTOR, passant par la phosphorylation de ULK-1 et associée à une baisse de phosphorylation de AMPK, une protéine antagoniste de mTORC-1. Par ailleurs, dans le contexte de maladies auto-immunes, il a été montré que l'activation de la voie mTOR permettait de réguler négativement l'autophagie dans les DCs murines, en favorisant la localisation nucléaire du facteur de transcription FoxO1, qui réduit la transcription du gène codant pour la protéine autophagique LC3B (Alissafi et al. 2017). On peut donc imaginer que ce soit la persistance de l'activation de la voie mTOR, au cours du processus de maturation, qui régule l'adaptation du flux autophagique dans les DCs.

Par ailleurs, il a été montré que la modulation de l'autophagie par la voie mTOR permettait la régulation des fonctions des mDC (Snyder et Amiel. 2019), en particulier dans la présentation des antigènes exogènes (Deretic. 2012), notamment la présentation d'antigènes via les molécules du CMH-II (Schmid et al. 2007). En effet, les études rapportent qu'une régulation négative de l'autophagie, dépendante de l'activation de la voie mTOR, diminue la présentation des antigènes d'origine intracellulaire au profit de la présentation d'antigènes d'origine extracellulaire (Deretic. 2012 ; Snyder et Amiel. 2019). De plus, l'activation de la voie mTOR favorise le trafic des vésicules endo/lysosomales, riche en molécules du CMH-II, et contribue à l'acidification des lysosomes, associée à la dégradation des antigènes exogènes (Chow et al. 2002 ; Vyas et al. 2007 ; Saric et al. 2016), le tout augmentant la présentation des antigènes d'origine extracellulaire. Le trafic endo/lysosomal est important dans les iDCs, tant pour alimenter les voies d'endocytose et de phagocytose (Land. 2018), que pour dégrader les antigènes capturés, notamment par autophagie (Kondylis et al. 2013). Plusieurs études montrent, en effet, que l'autophagie est alimentée par les endosomes : lors de la formation du phagophore, afin d'alimenter l'apport en membrane ; lors de l'étape de maturation, afin de délivrer des antigènes dans les autophagosomes (Kondylis et al. 2013). Il s'avère que ce trafic vésiculaire est particulièrement augmenté pendant la maturation des DCs, pour favoriser l'apprêtement des peptides antigéniques sur les molécules du CMH, mais aussi le transport des complexes de CMH/peptides vers la membrane plasmique (Kleijmeer et al. 2001); à cela s'ajoute une diminution des voies de capture des antigènes (Sallusto et al. 1995 ; West et al. 2000). De ce fait, on peut imaginer qu'au sein des mDCs, le trafic endo/lysosomal, régulé par la voie mTOR, alimente moins le processus autophagique, modulant ainsi la dynamique du flux autophagique. Il serait donc intéressant de poursuivre les analyses concernant la régulation de l'autophagie par la voie mTOR dans les DCs en fonction de leur statut de maturation. De plus, il serait intéressant d'analyser les différents éléments

intracellulaires modulés par cette voie qui peuvent impacter sur le processus autophagique, tel que le métabolisme glycolytique ou le trafic vésiculaire. Ainsi, ces analyses permettraient d'évaluer l'impact de la voie mTOR sur la régulation de la dynamique du flux autophagique dans les DCs humaines.

L'autophagie est régulée transcriptionnellement par diverses voies, dont les voies de signalisation induites par l'engagement des PRRs. En effet, il s'avère que le facteur de transcription NF- κ B peut réguler la transcription des gènes codant pour p62, Beclin et ATG5 (Schlottmann et al. 2008 ; Copetti et al. 2009), alors que le facteur c-jun peut augmenter la transcription des gènes codant pour Beclin-1 et LC3 (Li et al. 2009 ; T. Sun et al. 2011). Lors d'un stress intracellulaire, induit par la céramide, l'autophagie est induite au sein de diverses cellules tumorales humaines. Cette autophagie est dépendante de l'activation de la voie des MAPKs aboutissant à l'activation du facteur de transcription c-Jun. Ce facteur régule la transcription du gène codant pour LC3 (Sun et al. 2011), mais aussi beclin-1 (Li et al. 2009), favorisant la mort des cellules cancéreuses. De manière complémentaire, Copetti *et coll.* ont montré qu'à la suite d'un traitement céramide ou tamoxifen, le facteur NF- κ B/p65 régule positivement la transcription du gène codant pour Beclin-1, activant le processus autophagique au sein de diverses lignées tumorales humaines (Copetti et al. 2009). Par ailleurs, il a été décrit que l'infection de macrophages par la bactérie *E.Coli* induit l'inhibition du processus autophagique via l'activation de la voie NF- κ B. La stimulation de cette voie est associée à une régulation négative de la transcription des gènes codant pour ATG5 et Beclin-1, afin de promouvoir la mort des cellules infectées, et diminuer la réponse inflammatoire induite par ces macrophages (Schlottmann et al. 2008). Il est communément décrit que les voies des MAPKs et NF- κ B sont activées afin d'induire la maturation des DCs. Il serait donc intéressant d'analyser leur implication dans la régulation transcriptionnelle de l'autophagie au cours de la maturation des DCs primaires, afin d'évaluer l'impact de ces voies sur la régulation de la signature du flux autophagique.

Mes travaux de thèse ont permis de montrer que le flux autophagique s'adapte au cours de la maturation des DCs, tendant vers une diminution de sa vitesse et de son intensité. Il est important de noter que la fonction principale des mDCs est de présenter leurs antigènes aux LTs pour moduler la réponse immunitaire adaptative (Uhl et al. 2009 ; Cooney et al. 2010 ; Tey et Khanna. 2012 ; Romao et al. 2013 ; Strisciuglio et al. 2013 ; Mintern et al. 2015 ; Münz. 2016). Par ailleurs, Alissafi *et coll.* démontre l'importance de l'interaction entre LTs et DCs dans la régulation de l'autophagie dans les DCs. En effet, il a été montré que des LTs régulateurs étaient capables de réguler négativement l'autophagie dans les DCs murines afin de réduire la réponse

auto-immunitaire médiée par ces DCs (Alissafi et al. 2017). Dans notre étude, nous avons travaillé avec un modèle de culture de DCs seules. On peut alors se demander si en présence de LTs la dynamique du flux autophagique serait capable d'évoluer de nouveau. Il serait donc intéressant d'analyser la nature du flux autophagique dans des mDCs cultivées avec différents types de LTs.

5. Impact de l'adaptation du flux autophagique dans les DCs primaires matures

Les DCs humaines sont capables d'adapter leur métabolisme afin de garantir leurs fonctions biologiques après une stimulation de TLRs (Wculek et al. 2019). Cette adaptation est associée à une activité autophagique spécifique et nécessaire. En effet, il a été montré que lorsque des cDCs humaines sont stimulées avec un ligand de TLR, cela induit une transition métabolique d'un métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique, essentiel à l'activation des DCs (Basit et al. 2018) et à l'acquisition de nouvelles fonctions biologiques (Krawczyk et al. 2010). Basit *et coll.* ont montré qu'à la suite de l'engagement de TLR, la dépolarisation des membranes des mitochondries active le processus de mitophagie afin de dégrader les mitochondries endommagées, permettant d'induire le changement métabolique (Basit et al. 2018). D'autre part, lorsque des pDCs humaines sont stimulées avec un ligand de TLR, cela induit une augmentation du métabolisme oxydatif, essentiel à la production d'IFN-I (Basit et al. 2018). C'est l'augmentation de la glutamine intracellulaire médiée par l'autophagie qui permet cette augmentation métabolique. De manière complémentaire, d'autres études rapportent l'importance du processus autophagique dans la sécrétion d'IFN-I par les pDCs (Manuse et al. 2010 ; Zhou et al. 2012). A l'image de cette adaptation du métabolisme qui se déroule au cours de la maturation des DCs et qui est nécessaires aux fonctions biologiques de ces cellules, on peut supposer que l'adaptation du flux autophagique est elle aussi un support pour les diverses fonctions des DCs. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les cDCs et les pDCs sont des sous-types de DCs particulièrement différents, ayant des fonctions spécifiques associées. De plus, chacun des changements métaboliques rapportés dans les études ci-dessus sont associés à une fonctionnalité de l'autophagie différente et spécifique du sous-type de DCs étudié. On peut alors supposer qu'il existe une dynamique du flux autophagique spécifique à chaque sous-type de DCs, en support de leur fonctions spécifiques. Il serait alors intéressant d'analyser l'impact d'une modulation/ altération du flux autophagique dans des DCs au cours de leur maturation sur leurs capacités fonctionnelles une fois matures (capacité de présentation des antigènes, production de cytokines, activation et polarisation de LTs naïfs).

Les DCs sont des cellules capables d'être polariser vers deux principaux profils, tel que le profil immunogène (ou inflammatoire), ou tolérogène. Il est notamment possible d'orienter *in*

in vitro les DCs dérivées de monocytes, vers l'un ou l'autre de ces profils, en utilisant divers agents, comme certaines cytokines (Sim et al. 2016). Il s'avère que l'activité autophagique peut différer selon la polarité des DCs. En effet, il est décrit dans certaines études que les DCs dites tolérogènes ont une activité autophagique plus importante que les DCs inflammatoires (Baghdadi et al. 2013 ; Carroll et al. 2013 ; Pearce et Everts. 2015 ; Weindel et al. 2017 ; Fan et al. 2020). Au cours de ma thèse, j'ai utilisé des DCs traitées avec différent ligands de TLR ou un ligand de TNF-R, afin d'induire leur maturation et polarisation vers un profil pro-inflammatoires. Ainsi, nous avons montré que ces mDCs inflammatoires ont une signature de flux autophagique faible, à l'état basal. On peut alors se demander si ce sont ces conditions inflammatoires qui conditionne la iDC afin que lors de sa maturation, celle-ci adapte la dynamique de son flux autophagique. Par ailleurs, il est décrit dans la littérature qu'en fonction du contexte physiopathologique, l'autophagie participe au contrôle de l'inflammation des tissus, en régulant notamment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou encore l'activation de l'inflammasome (Baghdadi et al. 2013 ; Lassen et al. 2014 ; Pearce et Everts. 2015 ; Takahama et al. 2018). En revanche, selon le contexte environnemental, il est décrit que les DCs tolérogènes régulent positivement leur processus autophagique via la kinase AMPK. Cette protéine, un senseur énergétique qui régule le métabolisme des DCs (Pearce et Everts. 2015), favorise leur polarisation vers le profil tolérogène, associée à la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Baghdadi et al. 2013 ; Carroll et al. 2013). Par ailleurs, les DCs déficientes en AMPK présentent un profil plutôt immunogène associé à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-6 et le TNF- α , ainsi qu'à la capacité de polariser des LT de type Th1 et Th17 (Carroll et al. 2013). Carroll *et coll.* ont permis de mettre en évidence deux rôles de AMPK, associé au profil tolérogène des DCs : la régulation négative des voies NF- κ B/p65, MAPKs (p38 et ERK 1/2), qui sont en faveur de réponses pro-inflammatoires, et la régulation positive de la voie CREB, qui est en faveur de réponses anti-inflammatoires, permettant notamment la sécrétion d'IL-10 (Carroll et al. 2013). Par ailleurs, AMPK est aussi un activateur de l'autophagie, régulant à la fois positivement la formation du complexe ULK et négativement l'activité du complexe mTOR-C1 (Kim et al. 2011). En 2013, des scientifiques ont démontré que le facteur TIM-4 pouvait interagir avec AMPK afin d'activer l'autophagie dans des DCs murines. Cette autophagie induite favorise les fonctions immunosuppressives des DCs, réduit la présentation antigénique et l'activation des LT cytotoxiques en faveur de la prolifération tumorale (Baghdadi et al. 2013). De ce fait, il est possible que l'adaptation du flux autophagique que nous avons observé concerne uniquement les DCs différencié en DCs immunogènes. Il serait donc intéressant d'analyser la signature du flux autophagique dans des DCs différencié en DCs tolérogènes. Cette analyse permettrait d'évaluer

la qualité du flux autophagique dans les différentes fonctions des DCs humaines, en fonction de leur polarité.

6. Importance de la qualité du flux autophagique dans les DCs primaires en contexte pathologique

L'autophagie est un processus physiologique important pour les DCs, dont la régulation anormale favorise le développement de maladies auto-immune (Alissafi et al. 2017 ; Weindel et al. 2017 ; Fan et al. 2020) ou encore des maladies inflammatoires chroniques, telle que la maladie de Crohn (Cooney et al. 2010 ; Strisciuglio et al. 2013 ; Chu et al. 2016).

Dans le contexte de la MC, une maladie inflammatoire chronique de l'intestin, il est intéressant de noter qu'il existe divers polymorphismes autophagiques associés un risque augmenté de développer la maladie (Hugot et al. 2001 ; Hampe et al. 2007 ; Parkes et al. 2007 ; Rioux et al. 2007 ; Travassos et al. 2010). Parmi ces polymorphismes, le plus décrit à ce jour est le polymorphisme T300A d'ATG16L1. Il s'avère que ce polymorphisme est associé à un défaut d'autophagie, la protéine mutée étant préférentiellement dégradée par les caspases 3 et 7 (Lassen et al. 2014 ; Murthy et al. 2014). Par ailleurs, nous avons montré que des iDCs générées à partir de monocytes de patients atteints de la MC et exprimant ce polymorphisme autophagique présente une altération de la qualité de leur flux autophagique, en comparaison avec des iDCs générées à partir de monocytes d'individus sains. De plus, nous avons montré que ces DCs ne sont plus capables d'adapter leur flux autophagique au cours de leur maturation. Ces résultats montrent alors que le polymorphisme autophagique T300A d'ATG16L1 entraîne une perturbation du flux autophagique des DCs, associée à une perte de capacité d'adaptation. Ainsi, nous supposons que : (1) c'est la diminution de la disponibilité d'ATG16L1 qui soit la cause de l'altération de la qualité du flux autophagique, et (2) cette altération de la signature du flux soit la cause de la perturbation des fonctions de la DC. En effet, il a été montré que des DCs intestinales exprimant le polymorphisme T300A d'ATG16L1 ont un défaut d'apprêtement et de présentation des antigènes (Cooney et al. 2010 ; Strisciuglio et al. 2013), associés à l'activation majoritaire de LT de type Th17 (Chu et al. 2016) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, tel que l'IL-1 β (Lassen et al. 2014), favorisant le développement de la MC. Pour valider nos hypothèses, il serait intéressant : (1) d'analyser l'impact de cette altération sur les capacités fonctionnelles des DCs générées à partir des monocytes des patients sélectionnés dans notre étude, et (2) d'analyser l'impact d'une complémentation en ATG16L1wt à la fois sur la dynamique du processus autophagique et sur les capacités fonctionnelles des DCs.

Dans le contexte de l'arthrite juvénile idiopathique (ou JIA), une maladie auto-immune caractérisé par une forte inflammation des articulations, Omarjee *et coll.* ont montré une nouvelle

forme de développement de cette maladie associée à une mutation de la protéine LACCI1, une oxydoréductase. Cette mutation est responsable d'un défaut fonctionnel des macrophages chez les patients, responsable de la mise en place de l'inflammation dans les tissus. Ce défaut fonctionnel est associé à une perturbation du flux autophagique dans ces cellules (**Omarjee et al. 2021**).

Ainsi, on peut alors suggérer que la qualité du flux autophagique dans les APCs (ou cellules présentatrices d'antigènes), telles que les DCs et les macrophages, soit un nouveau critère associé à l'augmentation du risque de développement des maladies inflammatoires.

Ce projet a permis de mettre en évidence l'importance de la signature du flux autophagique comme support des fonctions biologiques de la cellule dendritique. Ces données s'ouvrent sur des perspectives concernant l'importance de la nature de ce flux au sein d'autres cellules immunitaires. Ainsi, à l'image de la maturation des DCs au cours de laquelle celles-ci passent d'un état de maturation à un autre, il serait intéressant d'analyser la qualité du flux autophagique lors de la transition de monocytes en macrophages, de LT naïfs en LT effecteurs, ou encore de LB en plasmocytes.

Par ailleurs, les DCs ayant une place centrale dans la réponse immunitaire, elles ont une place prépondérante au cœur de la physiopathologie de certaines maladies, dont le développement est en lien avec un dysfonctionnement du système immunitaire. Dans le contexte de la MC, le dysfonctionnement des DCs participe à la mise en place et à la persistance de l'inflammation au sein du tissu. Ce dysfonctionnement est parfois causé par un défaut d'autophagie et potentiellement à une perturbation de la qualité de leur flux autophagique. Une altération de la signature autophagique de DCs de patients atteints de la MC pourrait servir d'indicateur d'un dysfonctionnement de ces cellules. Il serait donc intéressant d'explorer l'idée d'utiliser la signature du flux autophagique dans les DCs comme : 1) un outil prédictif d'un dysfonctionnement de la réponse immunitaire chez les patients, et 2) un paramètre pronostique de l'évolution et/ou de l'utilisation de traitement personnalisé de la maladie. Ainsi, la combinaison de traitements actuels avec un traitement ciblé sur le processus autophagique pourrait être bénéfique pour les patients exprimant un ou plusieurs polymorphismes autophagiques.

E. Annexes

- Au cours de ma thèse, notre équipe a développé un travail en collaboration avec l'équipe du Pr R Mahieux au CIRI, en particulier le sous-groupe du Dr H Dutartre avec la thésarde A Carcone. Dans cette partie je vais vous présenter ce projet collaboratif, ainsi que mon implication dans cette étude, qui est associée aux travaux de thèse de A Carcone.

L'équipe de recherche du Pr R Mahieu s'intéresse au virus HTLV-1 (ou virus humain de la leucémie T de type 1) responsable de la leucémie T adulte, mais aussi d'une pathologie neuro-inflammatoire/neuro-dégénérative. Parmi les oncoprotéines du virus, Tax est l'une des protéines clé du développement de cette leucémie. De ce fait, le sous-groupe du Dr H Dutartre s'intéresse à mieux comprendre les interactions entre HTLV-1 et le système immunitaire, et en particulier à caractériser le mode d'action de la protéine virale Tax.

Il est communément décrit que le virus HTLV-1 infecte les lymphocytes T, bien qu'il soit aussi capable de cibler d'autres cellules de l'immunité innée tels que les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes. Parmi, les mécanismes de défenses de ces cellules, l'autophagie participe efficacement à la lutte contre les pathogènes intracellulaires. Au sein des LTs, il a été montré que la protéine Tax pouvait moduler le processus autophagique, en interagissant, notamment, avec la protéine autophagique Beclin-1 ou en réduisant la fusion entre autophagosome et lysosomes. Ainsi, en modulant l'autophagie, Tax favorise la réplication virale. De plus, l'équipe du Pr R Mahieux a montré que l'oncoprotéine Tax peut interagir avec divers récepteurs autophagiques, tel que p62. Certains de ces récepteurs sont capable de réguler les voies NF- κ B et interféron, modulant alors les fonctions des LTs. Par ailleurs, Tax peut directement moduler ces deux voies, ce qui suggère un lien entre l'autophagie, HTLV-1/Tax et la régulation des fonctions de ces cellules immunitaires, favorisant l'infection virale.

Il est établi que l'autophagie est un processus essentiel à la biologie de la cellule dendritique, tant pour ces fonctions dans le catabolisme cellulaire que pour réguler les fonctions spécifiques de ces cellules. Il semble donc intéressant d'évaluer les modulations d'une infection par HTLV-1 dans les fonctions des DCs, en particulier l'interaction entre Tax et l'autophagie. De ce fait, l'étude de l'infection de iDCs par le virus HTLV-1, réalisé dans l'équipe du Pr R Mahieux, ont montré que ces DCs sont plus susceptible à une infection par le virus.

A partir d'un modèle de DCs dérivées de monocytes humains exprimant ou non l'oncoprotéine Tax, les principaux objectifs de ce projet collaboratif sont les suivants : 1) identifier la qualité du flux autophagique dans les cellules exprimant ou non Tax, 2) évaluer le niveau d'activation des voies NF- κ B et interféron, et 3) analyser l'impact la protéine virale Tax sur le processus

autophagique, en particulier dans la régulation des voies NF- κ B et interféron. Au sein d cette collaboration, mon rôle est d'identifier la signature du flux autophagique des DCs exprimant ou non la protéine virale Tax. Pour cela, des DCs ont été générées, puis transduites avec des lentivirus exprimant ou non Tax. En utilisant le système que j'ai développé pendant ma thèse, j'ai analysé la signature du flux autophagique de ces DCs, et observé une modification de la qualité du flux autophagique des DCs exprimant l'oncoprotéine Tax, vers une diminution de sa vitesse et de son intensité. Ces résultats très préliminaires suggèrent que l'expression de la protéine virale Tax altère la dynamique du processus autophagique dans les DCs, qui pourrait alors contribuer à une modification/perte de fonctions de ces cellules.

La poursuite de ce projet permettrait, à long terme, de développer un nouvel outil afin de mieux comprendre l'impact des infections virales sur les fonctions des DCs.

- Au cours de ma thèse, notre équipe a développé un travail en collaboration avec l'équipe du docteur T Walzer, en particulier avec le docteur Omarjee, doctorant à cette période dans au sein du CIRI. Dans cette partie, je vais donc vous présenter mon implication dans le travail effectué par le docteur Omarjee, ainsi que ces principaux résultats de thèse reportés dans un article scientifique publié dans le journal « Journal of Experimental Medicine », dont je suis troisième auteur (Omarjee.O, Mathieu.AL, Quiniou.G et al. 2021).

Dans le cadre de son projet de thèse, le Dr Omarjee sous la direction du Professeur Alexandre Belot, rhumatopédiatre au Hospices Civils de Lyon, a travaillé à mieux caractériser les formes familiales et monogéniques des maladies auto-immunes et auto-inflammatoires comme l'arthrite juvénile idiopathique (ou JIA). La JIA est une maladie auto-immune qui touche les enfants de moins de 16 ans et se caractérise par une forte inflammation au niveau des articulations. Les mécanismes responsables de cette inflammation sont peu connus à ce jour. Grâce aux technologies de séquençage de nouvelle génération, ils ont séquencé plusieurs cas familiaux de JIA et ont identifié des mutations dans le gène *LACC1*, une protéine non caractérisée au début du projet.

LACC1 est une oxydoréductase exprimée par les cellules myéloïdes et dont les fonctions sont peu connues, malgré quelques évidences qui suggère qu'elle soit impliquée dans le métabolisme des acides gras. Par ailleurs, cette protéine semble participer à la lutte antibactérienne au sein des macrophages, en modulant la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, il a été montré que l'absence de *LACC1* dans ces cellules, perturbe leurs fonctions dans l'immunité innée. Pour finir, des mutations du gène codant pour *LACC1* ont été associées à diverses maladies inflammatoires, comme les maladies inflammatoires de l'intestin, la lèpre ou encore l'arthrite juvénile idiopathique, suggérant un rôle important de cette protéine dans la régulation de la réponse inflammatoire.

Malgré quelques évidences de l'importance de *LACC1* dans les fonctions de certaines cellules immunitaires, aucune étude ne permet d'expliquer clairement l'implication de cette protéine dans le développement de l'auto-inflammation chez les patients. Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle de *LACC1* au sein des maladies inflammatoires, en particulier la JIA, le Dr Omarjee a premièrement étudié le mécanisme d'expression de *LACC1* dans les cellules immunitaires. Grâce aux approches pharmacologiques, Omarjee et al met en évidence la forte expression de *LACC1* induite via la voie M-CSF-mTOR dans une sous population de macrophages. Ils mettent aussi en évidence l'absence de *LACC1* chez leurs patients atteints de

JIA et ainsi utiliseront un modèle de macrophages primaires d'humain déficients pour LACC1 *via* l'utilisation de siRNA pour poursuivre leur étude.

Dans le monde de la clinique, les maladies inflammatoires issues de causes monogénique sont actuellement catégorisées sous 3 groupes : 1) l'inflammasomopathies, où l'activation aberrante des inflammasomes, 2) la relopathies, où la suractivation de la voie NF- κ B et 3) l'interféronopathies - production aberrante d'interféron de type 1. Au cours de ces travaux de thèse, le docteur Omarjee a mis en évidence qu'un défaut de LACC1 dans des macrophages humains ne représentait aucun impact sur l'activation de l'inflammasome, et des voies IFN et NF- κ B, suggérant une nouvelle forme de la maladie inflammatoire monogénique probablement dû à un mécanisme moléculaire différent.

De manière intéressante, une analyse protéomique de macrophages humains a permis à Omarjee *et coll.* d'identifier deux nouveaux partenaires de LACC1, AMPK et RACK1. Il est intéressant de noter que la kinase AMPK fait partie des régulateurs positifs du processus autophagique. Par ailleurs, des mutations du gène codant pour LACC1 ont été retrouvés dans la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire de l'intestin. Il s'avère que diverses mutations du processus autophagique sont aussi impliquées dans la physiopathologie de cette maladie (mutations des gènes NOD-2 ou encore ATG16L1) et dont les défauts sont associés à de multiples altérations de la muqueuse intestinales qui conduisent à un excès d'inflammation. L'ensemble de la littérature suggèrent un lien possible entre l'autophagie, LACC1 et la mise en place de réponse inflammatoire. Ainsi, j'ai participé à l'élaboration de diverses analyses biochimiques et fonctionnelles qui ont permis à Omarjee *et coll.* de mettre en évidence la fonction d'activateur autophagique de LACC1, dans les macrophages. Cette activation d'autophagie se déclenche à la suite de l'activation de la kinase AMPK et par l'intermédiaire de LACC1.

Une étude réalisée en 2016, a été montré que l'absence de LACC1 impactait le métabolisme lipidique de macrophages, associé à une diminution du pool d'acides gras. Cependant le mécanisme qui permet d'expliquer cette diminution n'est pas connu à ce jour. Or, il s'avère que l'induction d'autophagie médiée par la kinase AMPK est impliquée dans la génération de gouttelettes lipidiques, qui permettent notamment de fournir les acides gras nécessaires à la respiration des mitochondries. Omarjee *et coll.* ont alors démontré qu'un défaut de LACC1, associé à un défaut d'autophagie, diminue les capacités respiratoires des mitochondries de macrophages humains. Ces résultats montrent l'importance de LACC1 dans l'accumulation de gouttelettes lipidiques, via le processus autophagique, et régulant alors le pool

d'acides gras qui alimente la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, ces résultats suggèrent que LACC1 régule le métabolisme lipidique des macrophages via la régulation de l'autophagie.

Pour finir, Omarjee *et coll.* ont identifié plusieurs défauts fonctionnels dans les macrophages humains déficient en LACC1, tel que leur capacité de phagocytose. Or, il s'avère que l'autophagie régule les fonctions de captures et de dégradations des antigènes chez les macrophages. Ainsi, ces résultats suggèrent que LACC1 régule les capacités fonctionnelles des macrophages, dont la phagocytose, via la régulation de l'autophagie.

Pour conclure, les travaux de thèse du docteur Omarjee mettent en évidence une nouvelle forme d'inflammation associée à une altération du processus autophagique, ainsi que du métabolisme lipidique de macrophages humains, induit par une perte de fonction de la protéine LACC1.

Dans le cadre de cette collaboration, j'ai pu apporter au docteur Omarjee mes connaissances sur le processus autophagique dans les cellules immunitaires, en particulier dans les APCs, ainsi que mon expertise de l'analyse du flux autophagique au sein de cellules primaires. C'est donc ensemble, que nous avons mis en place différents protocoles permettant d'évaluer le rôle de la protéine LACC1 dans le processus autophagique de macrophages primaires humains.

ARTICLE

LACC1 deficiency links juvenile arthritis with autophagy and metabolism in macrophages

Ommar Omarjee^{1,2}, Anne-Laure Mathieu^{1,2}, Gaëlle Quiniou¹, Marion Moreews¹, Michelle Ainouze², Cécile Frachette^{2,4}, Isabelle Melki^{2,3,4}, Cécile Dumaine³, Mathieu Gerfaud-Valentin⁵, Agnès Duquesne^{2,6}, Tilmann Kalinich⁷, Eda Tahir Turanli^{8,9}, Christophe Malcus^{2,10}, Sébastien Viel^{2,11}, Rémi Pescamona^{2,11}, Sophie Georgin-Laval^{2,12}, Yvan Jamilloux¹³, Jean-Paul Larbre^{2,12}, Guillaume Sarabay^{2,13}, Flora Magnotti¹⁴, Gillian I. Rice¹⁴, Françoise Bleicher¹⁵, Jonathan Reboulet¹⁵, Samir Merabet¹⁵, Thomas Henry¹⁶, Yanick J. Crow¹⁶, Mathias Faure¹⁷, Thierry Walzer^{2,18}, and Alexandre Belot^{2,18}

Juvenile idiopathic arthritis is the most common chronic rheumatic disease in children, and its etiology remains poorly understood. Here, we explored four families with early-onset arthritis carrying homozygous loss-of-expression mutations in *LACC1*. To understand the link between *LACC1* and inflammation, we performed a functional study of *LACC1* in human immune cells. We showed that *LACC1* was primarily expressed in macrophages upon mTOR signaling. We found that *LACC1* deficiency had no obvious impact on inflammasome activation, type I interferon response, or NF- κ B regulation. Using bimolecular fluorescence complementation and biochemical assays, we showed that autophagy-inducing proteins, *RACK1* and *AMPK*, interacted with *LACC1*. Autophagy blockade in macrophages was associated with *LACC1* cleavage and degradation. Moreover, *LACC1* deficiency reduced autophagy flux in primary macrophages. This was associated with a defect in the accumulation of lipid droplets and mitochondrial respiration, suggesting that *LACC1*-dependent autophagy fuels macrophage bioenergetics metabolism. Altogether, *LACC1* deficiency defines a novel form of genetically inherited juvenile arthritis associated with impaired autophagy in macrophages.

Introduction

Autoinflammatory diseases are innate immunological disorders associated with sterile inflammation in the absence of auto-antibodies or autoreactive T cells (Manthiram et al., 2017). This group includes a series of inherited diseases affecting specific inflammatory pathways. Inflammasomes are highly regulated multi-protein complexes that can detect various danger signals and cleave precursors of IL-1 β and IL-18 pro-inflammatory

cytokines. Inflammasomopathies are due to genetic defects driving deregulated maturation and secretion of these cytokines (Harapas et al., 2018). Type-I interferonopathies are a group of diseases characterized by an excessive secretion or signaling of type-I IFN (IFN-I), which results in the up-regulation of IFN-stimulated genes (i.e., IFN signature; Rodero and Crow, 2016; Rice et al., 2013). NF- κ B is a transcription factor involved in the

¹Centre International de Recherche en Infectiologie/International Center for Infectology Research, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5308, Lyon, France; ²National Reference Centre for Rheumatic and Autoimmune Diseases in Children, RAISE, Paris and Lyon, France; ³General Pediatrics, Infectious Disease and Internal Medicine Department, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁴Laboratory of Neurogenetics and Neuroinflammation, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Institut Imagine, Hôpital Necker, Paris, France; ⁵Internal Medicine, Croix Rousse Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ⁶Pediatric Nephrology, Rheumatology, Dermatology Department, Hôpital Femme Mère Enfant, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; ⁷Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care Medicine, Charité University Medicine Berlin, German Rheumatism Research Center, Leibniz Association, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany; ⁸Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Letters, Istanbul Technical University, Istanbul, Turkey; ⁹Molecular Development of the Immune System Section, Laboratory of Immune System Biology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD; ¹⁰Immunology Department, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ¹¹Immunology Department, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, France; ¹²Rheumatology Unit, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, France; ¹³Centre Hospitalier Universitaire Montpellier, University of Montpellier, Laboratory of Rare and Autoinflammatory Genetic Diseases and Centre de Référence des Maladies Auto-Inflammatoires et des Amyloses d'Origine Inflammatoire, Montpellier, France; ¹⁴Division of Evolution and Genomic Sciences, School of Biological Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, UK; ¹⁵Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; ¹⁶Centre for Genomic and Experimental Medicine, Medical Research Council Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh, UK; ¹⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Sorbonne Université, Service de Médecine Interne, Centre de Référence des Maladies Auto-Inflammatoires et des Amyloses d'Origine Inflammatoire, Paris, France; ¹⁸Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Trousseau, Université Pierre-et-Marie-Curie-Paris 6, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR5 933, Paris, France.

Correspondence to Alexandre Belot: alexandre.belot@chu-lyon.fr; Thierry Walzer: Thierry.walzer@inserm.fr.

© 2021 Omarjee et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-NonCommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.nupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 International license), as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.



induction of numerous pro-inflammatory cytokines, downstream of several innate immune receptors. NF- κ B activation is tightly regulated through multiple post-translational mechanisms, including ubiquitination (Aksentjevich and Zhou, 2017). Genetic disorders leading to NF- κ B overactivation are reported as NF- κ B-related autoinflammatory diseases (relopathies; Steiner et al., 2018).

Beyond these well-described groups of diseases, several forms of autoinflammation remain unclassified. Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is a heterogeneous inflammatory disease affecting joints of children <16 yr (Prakken et al., 2011). Mechanisms of joint inflammation remain poorly understood in the context of juvenile arthritis. The main features of this type of inflammation include (1) hypervascularization and hyperplasia of the synovial membrane and infiltration of inflammatory monocytes, T helper type 1 (Th1) and Th17 cells, in the synovial fluid with accumulation of macrophages in the synovial membrane (Evans et al., 2009; Dennis et al., 2014); (2) presence of inflammatory cytokines and metabolites in the synovial fluid; and (3) cartilage and bone erosion by matrix metalloproteinases and osteoclasts (Firestein and McInnes, 2017). Early genetic investigations in JIA through genome-wide association studies identified the HLA system and genes involved in lymphocyte regulation as important (Hersh and Prahalad, 2015). More recently, next-generation sequencing applied to familial forms of JIA identified LACCI mutations as the first model of autosomal recessive juvenile polyarthritis (Kallinich et al., 2016; Karacan et al., 2018; Rabionet et al., 2019; Wakil et al., 2015). These patients were negative for autoantibodies, including antinuclear antibodies, and the first patients reported displayed features of systemic JIA, suggesting dysregulation of innate immunity.

LACCI, also known as C13ORF31 or FAMIN, is a 47-kD protein expressed in myeloid cells (Cader et al., 2016; Lahiri et al., 2017; Skon-Hegg et al., 2019). Genome-wide association studies had previously associated LACCI to immune- and bacteria-mediated diseases such as inflammatory bowel diseases and leprosy. Mouse and human studies have suggested multiple roles of LACCI in fatty acid synthase-mediated *de novo* lipogenesis (Cader et al., 2016), NOD2-mediated signaling (Lahiri et al., 2017), ER stress (Huang et al., 2019), and, more recently, purine nucleotide cycle (Cader et al., 2020). A common finding in these studies was an impairment of macrophage effector function in terms of production of cytokines and reactive oxygen species in the absence of LACCI, consistent with aberrant host microbial interactions. However, these studies did not provide solid evidence to explain autoinflammation in patients. Moreover, there are conflicting data in terms of LACCI function, Laccase domain activity (active or inactive; Cader et al., 2016; Lahiri et al., 2017), and subcellular localization (peroxisome, cytoplasm, mitochondria; Cader et al., 2016; Lahiri et al., 2017). Of note, *Laccl*-deficient mice do not develop spontaneous arthritis, questioning the use of this model to understand human pathology.

Genetic variation at the LACCI locus has been reported to affect the risk of Crohn's disease (Umeno et al., 2011). This is also the case for several variants of modulators of autophagy, including NOD2 and ATG16L1 variants (Assadi et al., 2016; Baldassano et al., 2007; Philpott et al., 2014; Sales-Marques

et al., 2014). Autophagy is an evolutionarily conserved mechanism essential in cellular detoxification and metabolism through the lysosomal degradation pathway (Levine and Kroemer, 2019). Autophagy is regulated by upstream energy sensors such as mammalian target of rapamycin (mTOR) and AMP-activated protein kinase (AMPK), which control anabolic and catabolic programs, respectively. mTOR inhibits autophagy at transcriptional (TFEB) and post-translational (phosphorylation of ULK complex) levels, while AMPK activation results in ULK complex activation and mTOR inhibition. Following the initiation of autophagy, leading to *de novo* formation of an isolated membrane called the phagophore, the two ubiquitin-like conjugation systems, ATG5-ATG12 and ATG8/LC3, concur to mediate the elongation of both extremities of the phagophore. During this process, a lipidated form of the otherwise cytosolic ATG8/LC3 protein (referred to as LC3-I) is incorporated within the growing autophagosome surrounding cellular cargos, and is a key marker of this vesicular structure (referred to as LC3-II). Ultimately, autophagosomes, which sequester cytosolic material, mature to fuse with lysosomes, leading to the degradation and the recycling of the complete intracellular content. In murine cell lines and rat hepatocytes, autophagy regulates lipid metabolism (Nguyen et al., 2017; Singh et al., 2009) and mitochondria turnover. During bacterial infection, the NOD2-ATG16L1 complex recruits autophagy machinery for pathogen uptake and elimination (Homer et al., 2010; Travassos et al., 2010). ATG16L1-deficient macrophages secrete higher levels of IL-1 β (Saitoh et al., 2008), as do macrophages treated with autophagy maturation inhibitor bafilomycin A1 (BafA1; Harris et al., 2011). Moreover, knockdown of two important proteins of the autophagy mechanism, ATG16L1 and IRGM, in human dendritic cells stabilizes their interaction with T cells, thereby favoring inflammatory Th17 T cell activation (Wildenberg et al., 2012). Enhanced Th17 responses were also observed in LACCI knockout arthritis mouse models (Skon-Hegg et al., 2019).

In this study, we report the identification of loss-of-function LACCI mutations in patients from four unrelated families, and study the role of LACCI in human immune cells. Our functional analyses using different assays do not support a link between LACCI and previously reported pathways involved in autoinflammation, i.e., inflammasome, regulation of NF- κ B, or IFN-1. We found that LACCI was primarily expressed in macrophages. Using an unbiased proteomic screen and various biochemical and functional systems, we show that LACCI is a novel component of the autophagy machinery operating in macrophages downstream of the energy sensor AMPK. Moreover, LACCI is essential to promote the accumulation of lipid droplets in macrophages, which fuels mitochondrial respiration via fatty acids. Thus, LACCI loss of function defines a novel form of inflammation associated with defects in macrophage autophagy and metabolism.

Results

Next-generation sequencing of JIA patients identifies homozygous loss-of-function mutations in LACCI

Four consanguineous families of North African (A), Lebanese (B), Turkish (C), and African (D) ancestry were identified with

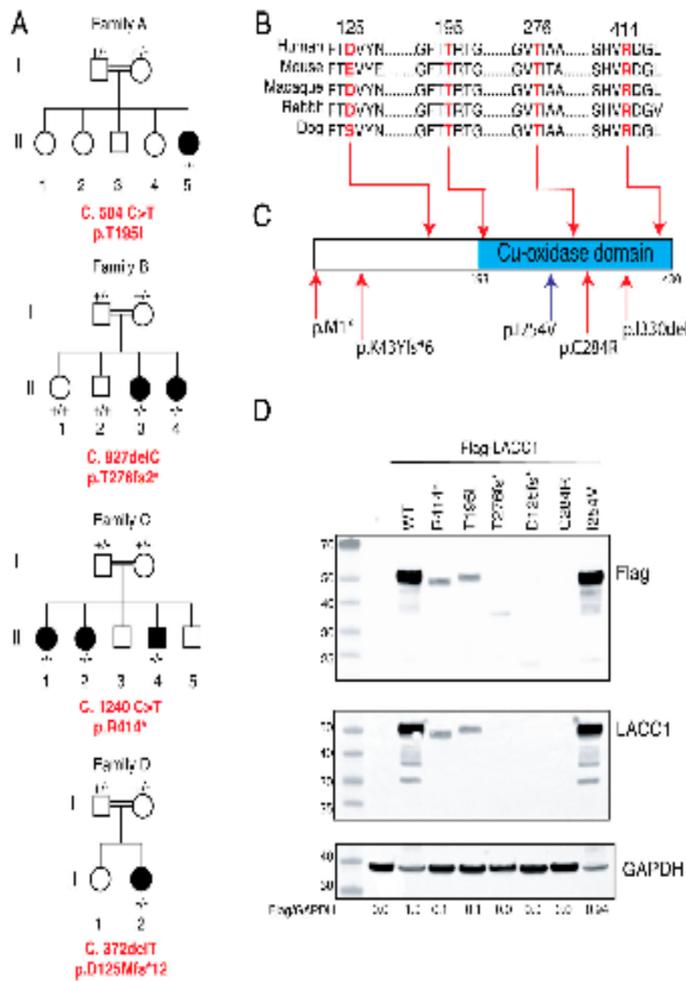


Figure 1. Whole or targeted exome sequencing identifies loss-of-function mutations in LACC1 from JIA families. (A) Pedigree of four JIA families with identified LACC1 mutations. (B) Protein alignment at mutated amino acid sites across species. (C) Representation of novel JIA mutations (upper red arrows), previously reported JIA mutations (lower red arrow), and Crohn's disease-associated variant (lower blue arrow) on the structure of LACC1 with a predicted copper-oxidase domain. (D) Immunoblots of 293T cells transfected with plasmids encoding for flagged forms of LACC1 WT or variants (representative of two experiments).

polyarticular JIA (pJIA, Fig. 1 A and Table 1). Patient A.II.5 was diagnosed with pJIA at the age of 5 mo and was initially treated with corticosteroids. Anti-IL-1 therapy was then administered to treat the systemic symptoms with a partial response. This patient is now 11 yr old and treated with anti-IL-6 antibodies, with good efficacy. The clinical cases of patients B.II.3 and 4 have already been reported (Kallinich et al., 2016). Both developed severe pJIA at the age of 16 mo and 15 mo, respectively, and a LACC1 mutation was identified. Of note, patient B.II.3 received bone marrow transplantation for precursor-B acute lymphoblastic leukemia that cured arthritis, suggesting that hematopoietic cells mediate LACC1-related arthritis. Finally, patients C.II.1, C.II.2, and C.II.4 were diagnosed with pJIA, which started at the age of 11 mo and 5 yr for C.II.2 and C.II.4, respectively. The two girls showed poor response to anti-TNF and anti-IL-1 therapy, while anti-TNF therapy was effective in C.II.4. Finally, patient D.II was diagnosed with pJIA at the age of 2 yr and is currently under tocilizumab therapy. Table 1 summarizes previous (in italics) and current therapies (bold) administered to each patient. Importantly, neither rheumatoid factor nor anti-

citruinated peptide antibodies were identified in patients from families A, B, C, or D.

Whole-exome (families B and C) or panel-exome sequencing (families A and D) was performed and identified homozygous mutations in LACC1 (Fig. 1 A) leading to amino acid substitution (family A) or stop codon insertion (families B, C, and D). All affected regions of LACC1 protein were highly conserved during evolution (Fig. 1 B), and in silico combined annotation-dependent depletion and population frequency (Genome Aggregation Database) analysis predicted rare damaging variants with scoring of 22.6 and 42 in families B and C, respectively. Interestingly, the position of LACC1 variants (including previously reported ones) was mostly concentrated in the C-terminal Laccase domain (Fig. 1 C). To determine the impact of those predicted highly damaging variants on LACC1 expression, we expressed their tagged forms including the p.C284R (systemic JIA) and p.I254 (Crohn's) LACC1 variants in 293T cells. Western blot (WB) analysis of cell lysates demonstrated a loss of >90% of the total amount of LACC1 for all JIA variants, while the Crohn's variant p.I254V did not impact the level of protein expression

Table 1. Clinical and biological characteristics of the JIA patients

Family	A	B		C			D
Patient	IL5	IL3	IL4	IL1	IL2	IL4	IL
Age (yr)	11	11	10	23	18	9	5
Ethnicity	African	Lebanese		Turkish			African
Consanguinity	Yes	Yes		Yes			Yes
LACC1 mutation	Homozygous c. 584 C>T p.T195I	Homozygous c. 827delC p.T276fs*2		Homozygous c.1240 C>T p.R414*			Homozygous c.372delT p.D129Mfs*12
CADD	NA	22.6		4.2			NA
GNOMAD	0	0		0			0
Disease	Severe pJIA	Severe pJIA		pJIA			Severe pJIA
Autoimmune characteristics	No antinuclear antibodies, no rheumatoid factors, no anti-cyclic citrullinated peptide						
Lymphocytes (1,400–3,700/ μ l)	1,410	NA	NA	1,213	1,395	3,600	5,000
CD4 T cells (530–1,500/ μ l)	NA	NA	NA	607	525	1285	NA
CD8 T cells (330–1,100/ μ l)	NA	NA	NA	309	495	708	NA
CD19 B cells (110–860/ μ l)	NA	NA	NA	NA	214	925	NA
NK cells (100–480/ μ l)	NA	NA	NA	NA	177	412	NA
Serum Ig							
IgG (4–15 g/liter)	8.1	NA	5.3	3.4	10.3	8.1	3.6
IgA (0.78–4.110.7 g/liter)	0.54	NA	0.61	0.57	1.41	0.57	0.26
IgM (0.9 g/liter)	0.63	NA	0.26	0.64	0.31	0.77	0.19
IgE (<1.250 kU/liter)	4.38	NA	6.4	16.4	2	178	75.6
Age of onset	5 mo	16 mo	15 mo	12 mo	11 mo	4 yr	2 yr
Associated uveitis	No						
Treatments	Corticosteroids	<i>Etanercept</i>	Adalimumab	<i>Etanercept</i>	Etanercept	<i>Etanercept</i>	Corticosteroids
	<i>Anakinra</i>	<i>Anakinra</i>	<i>Hydroxychloroquine</i>	<i>Anakinra</i>			<i>Methotrexate</i>
	<i>Canakinumab</i>	<i>Tocilizumab</i>		<i>Secukinumab</i>			<i>Enbrel</i>
	Tocilizumab	BMT		<i>Tocilizumab</i>			Tocilizumab
				Baricitinib			
	Methotrexate						

Text in *italics* indicates previous therapies; text in **bold** indicates current therapies. BMT, bone marrow transplant; CADD, combined annotation-dependent depletion; GNOMAD, Genome Aggregation Database; NA, not available; NK, natural killer cells.

(Fig. 1 D). This demonstrates that LACC1 mutations in JIA patients induce a lower expression of LACC1.

LACC1 expression is induced by M-CSF during differentiation of monocyte-derived macrophages, in an mTOR-dependent pathway

LACC1 expression has been reported in murine macrophages and neutrophils (Cader et al., 2016; Skon-Hegg et al., 2019), but limited explorations have been performed in human cells (Lahiri et al., 2017). The protein database BioGPS indicated highest LACC1 mRNA levels in human macrophages (<http://biogps.org/#goto=genereport&gid=144811>). To screen for LACC1 expression at the protein level, we searched for a specific antibody to detect endogenous levels of LACC1 expressed by the monocytic U937 cell line differentiated or not in macrophages. We also used U937 cells in which we either knocked out or endogenously tagged (in

frame) LACC1 by CRISPR/Cas9 genome editing as a control. Numerous commercial antibodies were tested by WB, including those that were used in previous articles on LACC1. Only one of them (clone E7; Santa Cruz) showed a specific staining by WB (Fig. S1 A). We then measured LACC1 expression in different primary human blood cells using this specific antibody. LACC1 expression was undetectable in lymphocytes and monocytes (Fig. 2 A) but was strongly induced in macrophages differentiated from monocytes with M-CSF. LACC1 was also expressed in GM-CSF-derived macrophages and GM-CSF/IL-4-derived dendritic cells, albeit at lower levels than in M-CSF-derived macrophages (hereafter simplified as macrophages; Fig. 2 B). Interestingly, macrophages also expressed a short form of LACC1 (Fig. 2, A and B) that may correspond to a cleavage product of the protein. LACC1 expression was rapidly induced by M-CSF during macrophage differentiation from day

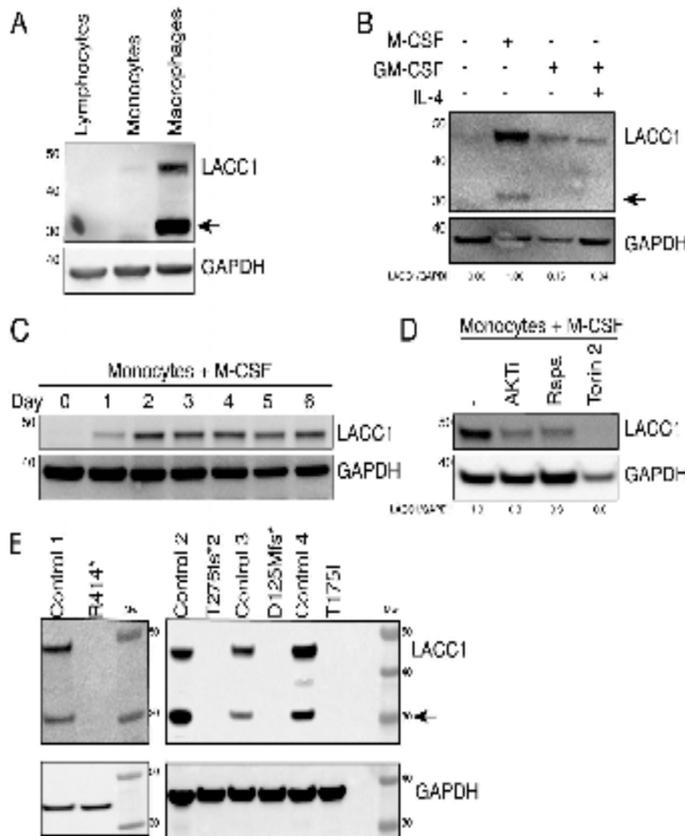


Figure 2. LACC1 is strongly expressed in an mTOR-dependent manner during M-CSF-induced human monocyte-macrophage differentiation. (A) Immunoblots of various immune cells isolated from buffy coat (lymphocyte and monocytes) or differentiated in vitro (M-CSF macrophages; representative of three experiments). Arrowhead indicates short fragment of LACC1. (B) Immunoblot of monocytes stimulated with the indicated cytokines for 6 d (representative of two experiments). Arrowhead indicates short fragment of LACC1. (C) Immunoblots of monocytes treated with M-CSF at different time points (representative of three experiments). (D) Immunoblots of monocytes treated with M-CSF and inhibitors (AKT, Rapamycin, and Torin2) over 24 h (representative of two experiments). (E) Immunoblots of macrophages derived from either four healthy donors or four JIA patients bearing indicated mutations in LACC1. Mw, molecular weight. For B and D, a quantification of LACC1 level is shown below the blot.

1 onwards (Fig. 2 C). We used various pharmacological inhibitors to identify signaling pathways regulating LACC1 induction upon M-CSF stimulation. p38, JNK, ERK, and PI3K pathways did not contribute to this induction (Fig. S2). Conversely, inhibitors targeting the protein kinase B (PKB, also known as AKT)-mTOR pathway suppressed LACC1 expression (Fig. 2 D and Fig. S2). These results point the M-CSF-AKT-mTOR axis as an essential pathway for LACC1 expression during macrophage differentiation. Next, we measured LACC1 expression in patient-derived macrophages and observed a total absence of the protein, confirming that these point mutations induced complete deficiency of LACC1 at the endogenous level (Fig. 2 E).

LACC1 deficiency does not influence inflammasome, IFN- γ , or NF- κ B activation

Absent activation of the IFN- γ pathway, NF- κ B-mediated signaling, or inflammasome complex may lead to different forms of auto-inflammatory diseases (Fig. 3 A). As some of the features observed in these conditions overlap with those of JIA patients (notably fever, arthritis, C-reactive protein [CRP] increase, and elevated inflammatory blood markers; Fig. S3 A), we looked for evidence of a link between LACC1 and such autoinflammatory pathways. The expression of IFN-stimulated genes (ISGs) was measured on three patients' whole blood samples from one family, and an IFN score was calculated as previously described

(Pescarmona et al., 2019). The IFN score was similar between LACC1 patients and healthy donors, well below that of patients affected by Aicardi-Goutières syndrome (AGS) and stimulator of IFN genes (STING)-associated vasculopathy of infancy (SAVI), two inherited interferonopathies (Fig. 3 B). To test whether the loss of LACC1 favored excessive activation of the inflammatory NF- κ B pathway, we knocked down LACC1 expression in primary macrophages using siRNA (hereafter called as siLACC1 macrophages), and measured IKK α expression, IKK β phosphorylation, and cytokine secretion in response to heat-killed bacteria (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus*) or LPS, a bacterial cell wall component. Similar degradation of IKK α , phosphorylation of IKK β , and TNF secretion were observed in response to treatments in control and siLACC1 macrophages (Fig. 3, C and D). Patients' macrophages also produced normal levels of TNF in response to LPS (Fig. 3 E), and CRISPR/Cas9-mediated knockout of LACC1 did not influence the capacity of U937 cells differentiated into macrophages to produce TNF upon LPS stimulation (Fig. S3 B). IL-1 β release following inflammasome activation requires both a priming signal and an activating signal. In cryopyrinopathies, the priming signal is sufficient to activate inflammasome and subsequent IL-1 β /IL-18 release, while other inflammasomopathies result in higher secretion of cytokines upon administration of both signals (Catta et al., 2015; Tassi et al., 2010). This was not observed in patients'

Downloaded from <http://www.jem.org/> at 18:30:00 on 02/01/2021. DOI: 10.1083/jem.20201006. Published by INHEREM on 25 February 2021.

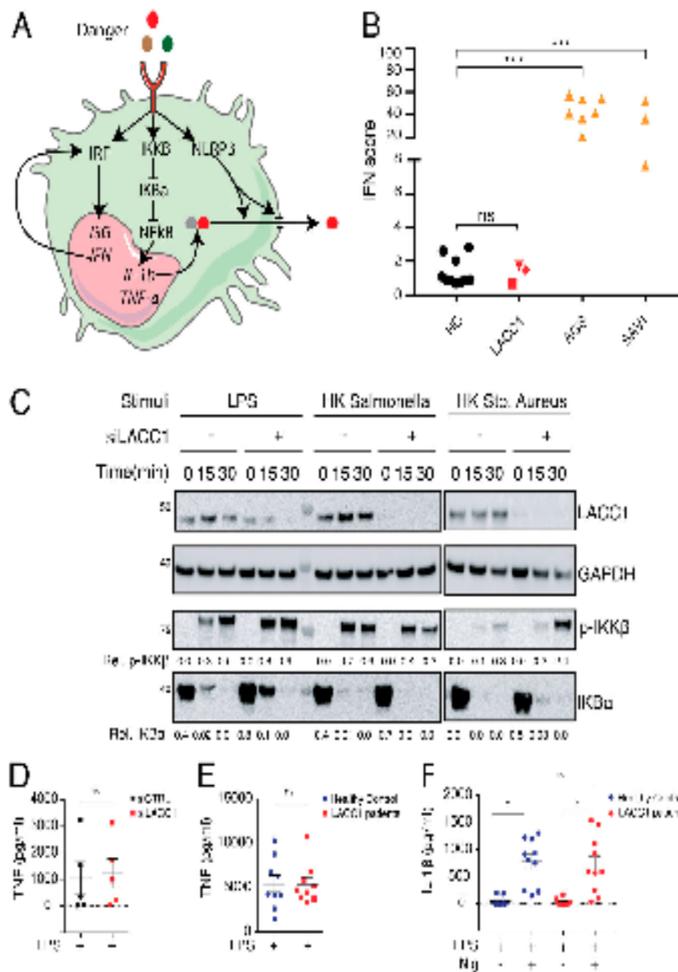


Figure 3. LACC1 deficiency does not seem to be connected to known monogenic auto-inflammatory pathways. (A) Illustration of IFN, NF- κ B, and inflammasome activation pathways. IRF, IFN regulatory factor. (B) IFN score determined from Nanostring measurement of ISGs in whole blood of 10 controls and patients C.II.1, C.II.2, and C.II.4. Samples from Alcardi-Goutières syndrome (AGS) and STING-associated vasculopathy of infancy patients (SAVI) were used as controls. ***, $P < 0.0005$ (unpaired t test). (C) Immunoblots (B) of indicated siRNA-transfected human monocyte-derived macrophages stimulated with LPS ($n = 3$), heat-killed (HK) *Salmonella*, or heat-killed *S. (Stp.) aureus* ($n = 2$) for 15 and 30 min. (D) TNF secretion of macrophages stimulated with LPS for 3 h ($n = 4$). (E) TNF secretion of monocyte-derived macrophages obtained from healthy donors and LACC1 patients stimulated with LPS for 3 h ($n = 9$). (F) L-1 β secretion of monocyte-derived macrophages obtained from healthy donors and LACC1 patients stimulated with LPS + nigericine (Ng; $n = 10$). *, $P < 0.05$ (paired t test).

macrophages primed with LPS alone or with both signals (Fig. 3 F). A similar conclusion was reached using U937 cells (Fig. S3 C). Altogether, these functional tests do not support a role for LACC1 in the regulation of inflammasome activation, IFN-1 signaling, or NF- κ B activation.

A proteomic screen identifies autophagy-associated proteins as LACC1 partners

Roles for LACC1 were previously demonstrated in lipid metabolism, NOD2-mediated NF- κ B signaling, ER stress, and in the purine nucleotide cycle (Cader et al., 2016; Lahiri et al., 2017; Huang et al., 2019). In an attempt to understand how LACC1 acted at the molecular level, we performed a bimolecular fluorescence complementation screen to identify interacting partners of LACC1. This screen consisted of coexpressing LACC1 fused with the N-terminal fragment of the Venus fluorescent protein and a library of 6,973 open reading frames (ORFs) fused with the complementary C-terminal fragment of Cerulean in HEK293T (Grinberg et al., 2004; Fig. 4 A). Potential molecular interactions led to Venus reconstitution and fluorescence emission, enabling cell sorting by flow cytometry (Fig. 4 B).

4,308 cloned ORFs from Venus⁺ cells were sequenced and filtered so as to select the highest enriched ORFs in Venus⁺ cells but depleted in Venus⁻ cells. This resulted in the identification of 28 putative LACC1 interactors (Table 2), which included SDHAF4, a cofactor of succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA) previously reported to interact with LACC1 (Lahiri et al., 2017). Interestingly, among the other proteins identified, two of them, RACK1 and especially AMPK (encoded by RACK1 and PRKAA1) are key regulators of autophagy induction (Zhao et al., 2015; Eribil et al., 2016), and several others have a known connection with autophagy (VEGF, TPK1, SUV39H1, CORO1C; Spengler et al., 2020; Miao et al., 2019; Kannan et al., 2017; Schmeckle et al., 2004). Through coimmunoprecipitation assays in 293T cells, we confirmed the interaction of LACC1 with AMPK and RACK1 (Fig. 4 C). Moreover, we also confirmed the interaction between endogenous LACC1 and RACK1 by immunoprecipitation of RACK1 followed by LACC1 WB in macrophages (Fig. 4 D). Monocytes were used as a negative control in this experiment as they do not express LACC1. This led to the identification of AMPK and RACK1 as novel partners of LACC1 in human macrophages.

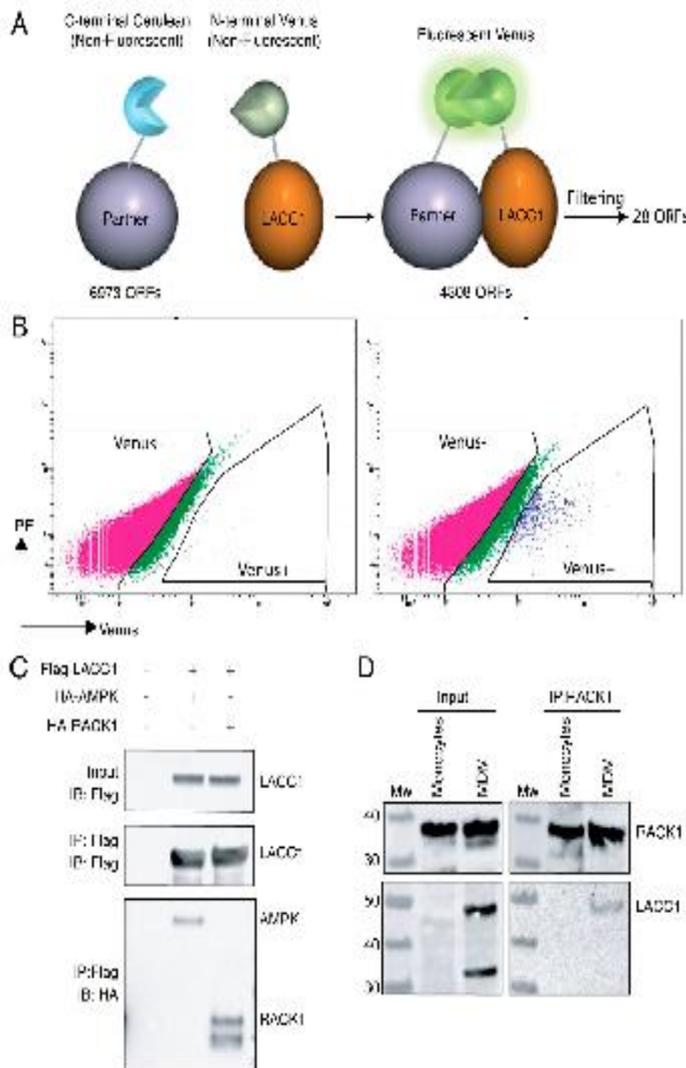


Figure 4. A large-scale proteomic screen identifies AMPK and RACK1 as LACCI partners. (A) Schematic representation of proteomic screen design consisting of the cotransfection of LACCI and ORF library tagged with either fragments of Venus protein. (B) GFP-positive cell sorting of 293T cells expressing BFC ORFs transfected with (right) or without (left) N-Venus-LACCI. (C) Immunoblots of Flag-immunoprecipitated cell lysates of 293T cells cotransfected with tagged LACCI, AMPK, or RACK1 expression vectors (representative of three experiments). (D) Immunoblots of endogenous RACK1-immunoprecipitated cell lysates of human monocytes and macrophages. Input, immunoprecipitated (IP) fractions were immunoblotted against LACCI (representative of two experiments). MDM, monocyte-derived macrophage; Mw, molecular weight.

Downloaded from <http://www.jem.org/> at 193.50.201.201 on 02/11/2021 11:01:17pm. See the Terms and Conditions (<https://www.jem.org/>) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

LACCI promotes autophagic flux in macrophages

Having established the interaction between LACCI, AMPK, and RACK1, we sought to investigate the link between LACCI and autophagy. We treated macrophages with inhibitors of late autophagic stages, involving lysosomal degradation. We used BafA1, inhibiting the fusion of lysosomes with autophagosomes; chloroquine, a potent inhibitor of autophagolysosome acidification; or the lysosomal cathepsin inhibitors E64D or pepstatin A. These different treatments resulted in the rapid (1 h) accumulation of full-length LACCI and the disappearance of the 30-kD cleavage product (Fig. S4 A).

To test the role of LACCI in autophagy, we first treated control or patient macrophages (carrying biallelic p.D125fs*, p.T195I, and T276fs* variants) with BafA1 and measured the level of expression of LC3-II, which is normally degraded during the autophagy process, but accumulates when the autophagy maturation step is compromised. Upon BafA1 treatment, LC3-II

accumulated in both control and patient macrophages, albeit to a lower extent in LACCI-deficient patients (Fig. 5 A). Due to the varying autophagy flux among healthy donors (Fig. 5 A) arising from different genetic backgrounds, we reasoned that LACCI knockdown with siRNA in the same donor macrophages would overcome this genetic disparity. We therefore compared autophagy flux between control and siLACCI macrophages treated with BafA1 at different time points, and measured the level of LC3-II accumulation. The inhibition of the autophagosome-lysosome fusion upon BafA1 treatment resulted in an expected and a rapid accumulation of LC3-II in control macrophages but not as much in LACCI knocked-down macrophages (Fig. 5 A), suggesting that LACCI is required for optimal macrophage autophagy. Similar defects in autophagy were observed in siLACCI macrophages when they were treated with chloroquine and rapamycin (Fig. S4, B and C). To further substantiate the link between LACCI and autophagy, we transfected LACCI in the

Table 2. List of interactors derived from proteomic assay

ORF	Numbers of reads per ORF			Frequency of reads per ORF			ORF enrichment
	Pre-sorted cells	GFP ⁺ cells	GFP ⁻ cells	Pre-sorted cells	GFP ⁺ cells	GFP ⁻ cells	
SDHAF4	154	5,994	0	1.309E-03	3.734E-02	0	28.52
VEGF	107	3,215	0	9.097E-04	2.003E-02	0	22.02
IL18BP	161	4,143	0	1.369E-03	2.581E-02	0	18.85
KRT17	199	3,943	0	1.352E-03	2.456E-02	0	18.17
PPAP2A	112	2,509	0	9.522E-04	1.563E-02	0	16.41
TPK1	135	2,252	0	1.148E-03	1.403E-02	0	12.22
RNPS1	199	3,112	0	1.692E-03	1.939E-02	0	11.46
OSBPL2	294	4,415	0	2.499E-03	2.750E-02	0	11.00
CD160	104	1,492	0	8.842E-04	9.294E-03	0	10.51
RACK1	235	2,699	0	1.998E-03	1.681E-02	0	8.42
CDV1	165	1,719	0	1.403E-03	1.071E-02	0	7.63
ADAMTS18	379	3,785	0	3.222E-03	2.358E-02	0	7.32
NY-REN-7	134	723	0	1.139E-03	4.504E-03	0	3.95
SORD	122	594	0	1.037E-03	3.700E-03	0	3.57
ZNF444	120	571	0	1.020E-03	3.557E-03	0	3.49
POLD2	619	2,684	0	5.263E-03	1.672E-02	0	3.18
SUV39H1	279	1,106	0	2.372E-03	6.890E-03	0	2.90
ACOT9	801	3,068	0	6.810E-03	1.911E-02	0	2.81
GCAT	209	781	0	1.777E-03	4.865E-03	0	2.74
PCYOX1	149	445	0	1.267E-03	2.772E-03	0	2.19
CORO1C	597	1,712	0	5.075E-03	1.066E-02	0	2.10
FBXO42	150	353	0	1.275E-03	2.199E-03	0	1.72
Clorf73	492	1,097	0	4.183E-03	6.838E-03	0	1.63
PRKAA1	105	211	0	8.927E-04	1.314E-03	0	1.47
ULRA3	581	1,074	0	4.939E-03	6.690E-03	0	1.35
MRPL21	174	274	0	1.479E-03	1.707E-03	0	1.15
ANKRA2	448	694	0	3.809E-03	4.323E-03	0	1.14
RBM30	230	339	0	1.955E-03	2.112E-03	0	1.08

autophagy reporter cell line HeLa GFP-LC3 (Klionsky et al., 2008; Mizushima et al., 2010). Upon transfection, we noticed a trend to increased GFP dots corresponding to LC3-coated autophagosomes in LACCI-transfected cells compared with controls (Fig. S4 D), suggesting that LACCI overexpression promotes autophagy.

To confirm the involvement of LACCI in autophagy, we then compared the consequences of knocking down either LACCI or ATG5, an essential protein for the elongation of growing autophagosomes in various autophagy-modulating conditions. Macrophages were cultured in normal or HBSS starvation medium (a condition of AMPK-dependent autophagy induction) and treated with BafA1 to visualize autophagy upstream signaling and flux. Results in Fig. 5 C show a comparable deficit in the accumulation of LC3-II and p62 (a natural cargo of ongoing autophagy) in LACCI and ATG5 knocked-down macrophages. AMPK phosphorylation was induced by starvation, and this

phosphorylation was identical in LACCI and ATG5 knocked-down macrophages, thereby indicating that LACCI acts downstream of AMPK in the autophagy cascade. mTOR activity, antagonistic to AMPK and autophagy, was assessed by measuring ribosomal S6 protein and 4-EBP1 phosphorylation levels. Strikingly, both proteins were highly phosphorylated in both ATG5 and LACCI knockdown conditions, pointing toward spontaneous up-regulation of mTOR signaling. This phenomenon could arise through compensatory mechanisms to failed LACCI-mediated autophagy flux. Altogether, these results establish that LACCI is important to promote autophagic flux in macrophages downstream of AMPK.

Loss of LACCI impairs lipid droplet-fueled mitochondrial respiration and phagocytosis

LACCI-deficient macrophages were previously reported to have decreased fatty acid pools and impaired cell metabolism due to

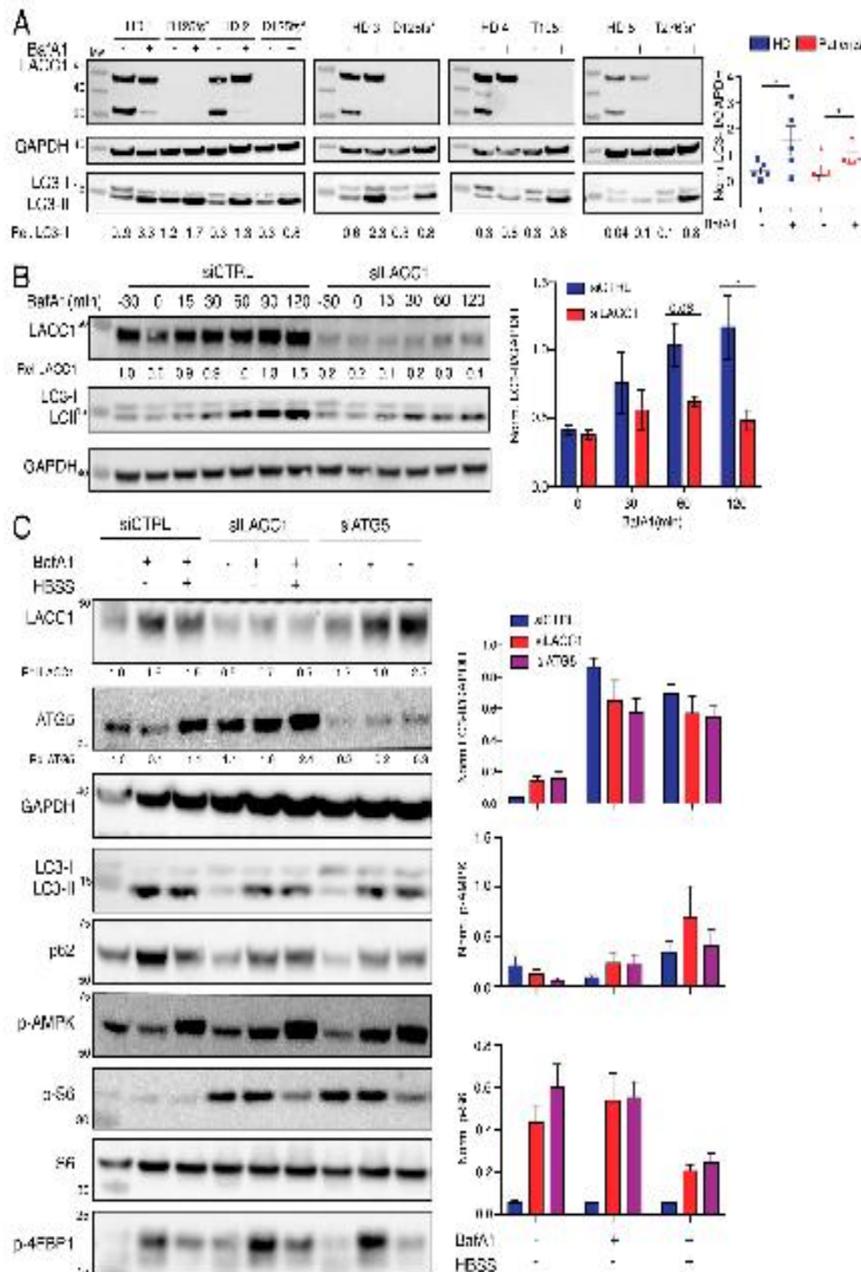


Figure 5. LACC1 regulates autophagy and associated signaling. (A) Immunoblot of five healthy donors (HD) versus five patients (three different samplings of D125fs* [triangle], T196i [circle], and T276fs* [star]) macrophages treated with BaF1 for 2 h. Right: LC3-II levels normalized to GAPDH. (*, $P < 0.05$ [paired t test]) (B) Immunoblot of control versus siLACC1 macrophages treated with BaF1 at different time points (representative of three experiments). Right: Accumulation of LC3-II levels normalized to GAPDH at selected time points based on the immunoblots. (*, $P < 0.05$ [paired t test].) (C) Immunoblot of control versus LACC1-deficient macrophages treated with BaF1 in RPMI or HBSS starvation medium for 2 h (representative of two experiments). LACC1 and ATG5 levels have been normalized with respect to GAPDH and unstimulated siCTRL condition. The right panels indicate normalized LC3-II (upper), phospho-AMPK (middle), and phospho-S6 (lower) to GAPDH. CTRL, control; Norm, normal.

Downloaded from http://www.jem.org/journal-serials-pdfs/2020/02/00614103179m_20201006.pdf by INSEERM user on 25 February 2021

defective *de novo* lipogenesis via peroxisomal fatty acid synthase interaction (Cader et al., 2016). A very important piece of evidence to support this model was the demonstration, using a commercial anti-LACCI antibody, that LACCI localized in peroxisomes. This point was challenged, however, by a subsequent study that used the same commercial antibody (E7 clone; Santa Cruz; Skon-Hegg et al., 2019) and showed a diffuse subcellular localization of LACCI. To test if the discrepancy was due to a lack of specificity of LACCI antibodies, we stained parental and modified U937 cell lines for LACCI using antibodies against human influenza hemagglutinin (HA) tag or LACCI, as mentioned above. HA staining, acting as the positive control in this experiment, gave a specific staining in all three applications tested (i.e., WB, flow cytometry, and confocal microscopy; Fig. S1, A and B). In contrast, both Sigma-Aldrich and Santa Cruz antibodies generated nonspecific binding when applied in flow cytometry (Fig. S1 B) and immunofluorescence (Fig. S1 C).

Thus, we explored other mechanisms that may explain the decreased pool of fatty acids in the absence of LACCI. In particular, previous studies established that AMPK-mediated autophagy was essential to promote the generation of lipid droplets (Nguyen et al., 2017). As we identified a physical and functional link between LACCI, AMPK, and autophagy, we tested the impact of LACCI deficiency on the accumulation of lipid droplets. Red oil staining revealed a dramatic reduction in lipid droplets in LACCI-deficient macrophages compared with controls (Fig. 6 A). Lipid droplets provide fatty acids for mitochondrial respiration via fatty acid oxidation. Extracellular oxygen consumption rate (OCR) analysis in LACCI-deficient macrophages indicated decreased mitochondrial respiration (Fig. 6 B). We next tested whether an extracellular source of fatty acid such as palmitate could restore lipid droplets levels, and hence mitochondrial respiration. Macrophages were preincubated with palmitate for 16 h, and red oil staining showed reconstitution of the lipid droplets pool (Fig. 6 C) and increased mitochondrial respiration (Fig. 6 D).

Moreover, the autophagy machinery has been shown to modulate uptake and clearance of foreign particles or apoptotic bodies (Liao et al., 2012; Martinez et al., 2011; Bonilla et al., 2013). Using either patient-derived or siLACCI-treated macrophages, we showed that LACCI-deficient macrophages had reduced apoptotic bodies uptake and bacterial phagocytosis capacity compared with controls (Fig. S5). These results suggest that LACCI regulates fundamental macrophage functions such as phagocytosis via the regulation of autophagy.

Discussion

JIA is a heterogeneous inflammatory joint disease of unknown cause, currently classified according to clinical and serological data. Next-generation sequencing has provided a new way to identify genetic causes of the disease in familial forms. In this study, we reported mutations in LACCI in four independent JIA families, with fully penetrant chronic rheumatic disease of early onset. Moreover, we show, for the first time, that such mutations impair the expression, and thereby the function, of LACCI. This implies that loss of function of LACCI contributes to

arthritis pathogenesis. However, the mechanisms underlying this contribution remain poorly understood.

LACCI was previously associated with lipid metabolism, NOD2 complex, ER stress, and purine nucleotide cycle (Cader et al., 2016, 2020; Lahiri et al., 2017; Huang et al., 2019). However, these pathways are difficult to connect to JIA pathogenesis. Systemic forms of JIA in some LACCI-deficient patients (Wakil et al., 2015) suggested a relation with innate immunity excessive activation. However, we provided various data in this article that do not support a functional link between LACCI deficiency and these pathways. Lahiri et al. (2017) reported that knock-down of LACCI in human macrophages was associated with a reduction of at least threefold in TNF and IL-1 β /6/8/10 cytokine production upon TLR and NOD2 stimulation. We were not able to reproduce these results using either gene-edited U937 cells or primary human macrophages. Moreover, we did not observe any aberrant NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in patient macrophages, whereas Cader et al. (2016) reported a decrease in IL-1 β production in LACCI-knockout murine macrophages following NLRP3 activation. Notably, the same study demonstrated that intraperitoneal injection of LPS resulted in higher IL-1 β secretion in the knockout mouse model, a finding that was not retrieved in a LPS-induced sepsis model (Skon-Hegg et al., 2019). The reasons for these discrepancies remain unclear and warrant further investigation.

In vivo, tissue-resident macrophages have either embryonic or monocytic origin, and are dependent on environment cues for functional specialization. For the first time, we report that M-CSF, and not GM-CSF, strongly induces LACCI expression during macrophage differentiation via the activation of the mTOR pathway. M-CSF is known to generate an anti-inflammatory M2-like macrophages with tissue remodeling functions, while GM-CSF favors the production of inflammatory M1-like macrophages for pathogen elimination (Lacey et al., 2012). It is also possible that similar to Crohn's disease, which has been associated to NOD2 variants, defective phagocytosis in LACCI patients could participate in systemic inflammation (Travassos et al., 2010). Further studies are required to understand which human macrophage subsets express LACCI *in vivo* and the role of microbiota, which may provide insights into the pathophysiology of the disease. One can also speculate that additional genetic or environmental factors may impact LACCI expression in other juvenile- or adult-onset arthritis.

In our study, mTOR-dependent signals induced LACCI, which promoted autophagy. Both mTOR and autophagy are important in human macrophage differentiation, despite both processes being antagonistic (Zhang et al., 2012; Jacquelin et al., 2009, 2012). M-CSF-activated colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) triggers cyclic activation of the AKT-mTOR pathway necessary for human macrophage differentiation (Jacquelin et al., 2009). We hypothesize that autophagy follows similar cyclic activation, and that LACCI might represent a potential switch between these processes. Indeed, loss of LACCI impaired autophagic flux and increased mTOR signaling in primary macrophages, representing a feed-forward loop to promote LACCI expression. To counteract the spontaneous mTOR activation and promote autophagy, mTOR inhibition may represent a new avenue for the

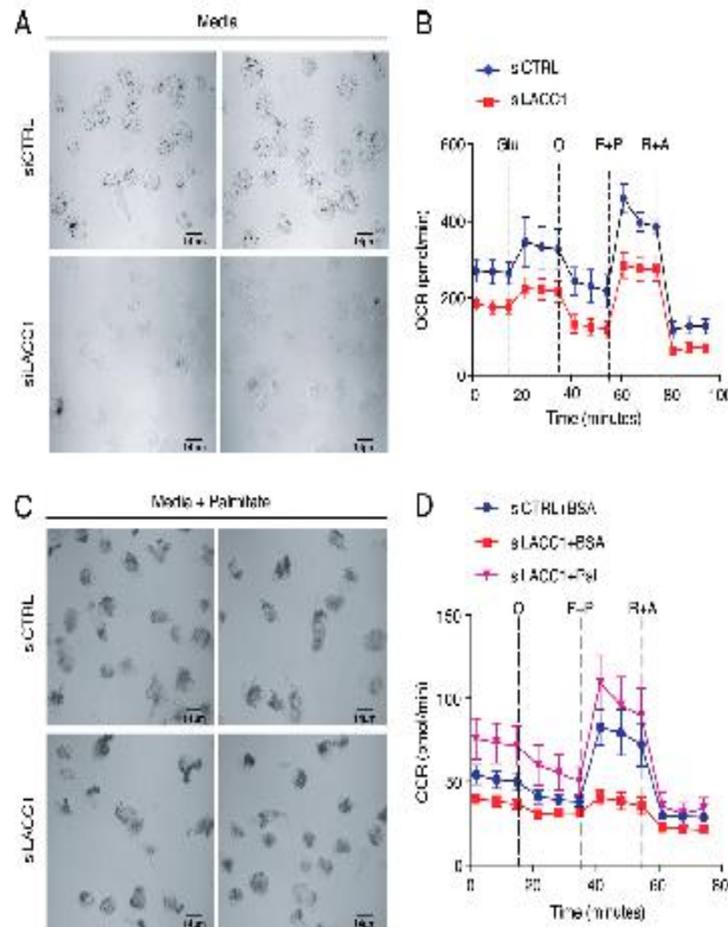


Figure 6. LACC1 promotes lipid droplet and mitochondrial respiration. (A) Red oil staining of macrophages transfected with control or LACC1 siRNA in basal RPMI medium (representative of three experiments). (B) OCR measurement of macrophages transfected with control or LACC1 siRNA with successive glucose (Glu), oligomycin (O), FCCP (F+P), and rotenone and antimycin A (R+A) treatments (representative of three experiments). (C) Red oil staining of macrophages transfected with control or LACC1 siRNA in palmitate supplemented medium for 16 h (representative of two experiments). (D) OCR measurement of transfected with control or LACC1 siRNA treated with palmitate followed by successive addition of glucose, oligomycin, FCCP, and rotenone and antimycin A (representative of two experiments). Pal, palmitate.

treatment of inflammatory arthritis (Cejka et al., 2010). In addition, mouse studies have demonstrated the importance of mTOR in fueling glucose and sterol biosynthesis during macrophage differentiation (Kammaus et al., 2017). The present study, and others, indicate that LACC1 (Cader et al., 2016) regulates lipid metabolism. This role may be connected to the shift in lipid metabolism undergone by differentiating macrophages, and suggests a functional impact in vivo (Ecker et al., 2010).

Our study identified RACK1 and AMPK, two autophagy-initiating proteins, as LACC1 partners. LACC1 polymorphisms have been associated with Crohn's disease (Assadi et al., 2016; Cleymen et al., 2013; Huang et al., 2016; Patel et al., 2014; Umeno et al., 2011), and such associations were also observed for variants of several autophagy-associated genes such as NOD2, ATG16L1, and IRGM (Iida et al., 2017). These proteins interact and associate closely with AMPK (Chauhan et al., 2015), while NOD2

partners with LACC1 (Lahiri et al., 2017). These genetic associations consolidate our model that LACC1 binds to the AMPK complex to regulate autophagy. Functionally, we demonstrate a partial reduction of the autophagy flux in LACC1-deficient macrophages under normal culture conditions.

Impaired AMPK activity decreases autophagic flux and limits lipid droplet formation, which can no longer feed mitochondrial respiration (Nguyen et al., 2017). Our study revealed impaired lipid droplet levels and mitochondrial respiration in LACC1-deficient macrophages, which could be compensated by exogenous palmitate. Supplementation of *Lacc1* knockout murine macrophages with fatty acid also rescued mitochondrial respiration (Cader et al., 2016). These results suggest that the composition of the extracellular medium or tissue microenvironment can modulate LACC1-associated phenotypes. One may speculate that the metabolic composition of the joint microenvironment drives a

Downloaded from <http://jexpmed.org/journal/doi/pdf/10.1084/jem.20201006.pdf> by INSEERM user on 25 February 2021

pro-inflammatory phenotype of LACCI-deficient macrophages. Alternatively, LACCI-dependent autophagy in macrophages may allow the clearance of some joint-specific inflammatory lipids. Indeed, lipid droplets are known to play cytoprotective roles by sequestering fatty acids and reducing the accumulation of various cytotoxic lipid species (Nguyen et al., 2017). Furthermore, based on the known interplay between autophagy and lysosomes, LACCI may also regulate other cellular functions associated with lysosomes such as antigen presentation. Finally, a more global defect of membrane trafficking may also account for the phagocytosis and autophagy defects.

In conclusion, we find that loss-of-function mutations in LACCI are associated with chronic rheumatic disease with full penetrance. Proteomic and biochemical investigations demonstrate a novel role for LACCI in modulating autophagy flux through AMPK signaling. This autophagic flux regulated lipid droplet levels and mitochondrial activity, thus linking LACCI to immunometabolism. LACCI deficiency thus defines a novel category of inflammatory disease associated with macrophage defects in autophagy and metabolism.

Material and methods

Ethics statement

Written informed consent was obtained for data collection, blood sampling, and genetic testing relating to patients, family members, and healthy control subjects. The study was approved by the Leeds (East) Multi-center Research Ethics Committee (no. 10/H1307/132) and the Comité de Protection des Personnes Sud-EST III Ethics Committee (no. 2013-011B).

Exome sequencing

DNA was extracted from whole blood samples using standard methods. Whole-exome sequencing was performed on genomic DNA of patients. Whole-exome sequencing was performed using an AmpliSeq kit, with libraries analyzed on a Life Technologies Proton instrument. P3 was sequenced using a SureSelect Human All Exon kit (Agilent Technologies) for targeted enrichment and an Illumina HiSeq 2000. Variants were assessed using the in silico programs combined annotation-dependent depletion (<https://cadd.gs.washington.edu>), SIFT (<http://sift.jvri.org>), and Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), and summarized in Varcards (<http://varcards.biols.ac.cn>). Population allele frequencies were obtained from the ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) and Genome Aggregation Database (<http://gnomad.broadinstitute.org>) databases. Sanger sequencing was performed on DNA from patients and their parents to confirm the LACCI variants found by exome sequencing. The reference sequence used for primer design and nucleotide numbering was LACCI (NM_001128303.1). Primer sequences are available on request.

Monocyte purification

Blood was obtained from healthy donors from the Etablissement Français du Sang Auvergne Rhône Alpes, France, under the convention EFS 16-2066. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from 450 ml of freshly drawn venous human

peripheral blood by Ficoll (Eurobio) density gradient centrifugation. Cells were washed three times in sterile PBS (Thermo Fisher Scientific) and resuspended in separation medium (PBS, pH 7.2, supplemented with 0.5% BSA and 2 mM EDTA). Monocyte purification was performed by CD14-positive selection using a human CD14 microbeads purification kit (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's recommendations. Cell suspensions were always >95% CD14⁺ as determined by flow-cytometric analysis.

Cell line and reagents

Human myeloid cell line U937 was obtained from the biological resource center Cellulonet (Lyon, France) and grown in RPMI 1640 GlutaMax (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (Dutscher), 10 mM HEPES, pH 7.5 (Thermo Fisher Scientific), and 0.04 mg/ml gentamycin (Thermo Fisher Scientific). U937 cells were exposed to 100 ng × ml⁻¹ of PMA (InvivoGen) for differentiation. For primary macrophage differentiation, purified monocytes were plated in the presence of 50 ng/ml M-CSF (Miltenyi Biotec) and incubated at 37°C in 5% CO₂ for times indicated in the figure legends. Human GM-CSF and human IL-4 were from Miltenyi Biotec. Rapamycin was from Tocris. Torin 2 and BafA1 were from InvivoGen. The inhibitors SB203580 (p38 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), PD98059 (ERK inhibitor), and LY294002 (PI3K inhibitor) from InvivoGen and AZD5363 (AKT inhibitor) from Selleckchem were gifts from Patrice André and the Vincent Lotteau Laboratory (Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France). Chloroquine, pepstatin A, and E64D were from Sigma-Aldrich, while BafA1 was from InvivoGen. LPS used for macrophages stimulation was from InvivoGen. Heat-killed *S. enterica* serovar Typhimurium (strain SL1344) and heat-killed *S. aureus* (strain Lug960) were cultured in T. Henry's laboratory.

LACCI knockout in U937

LACCI gene expression was invalidated in the U937 cell line by CRISPR/Cas9 technology. Guide RNA (gRNA) directed against LACCI (5'-GCTGTTTGGATTGATCTTTT-3') was cloned into the pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) vector (from Feng Zhang; Addgene plasmid 48138) following an adapted protocol from the Zhang laboratory (McGovern Institute, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA). To generate the knockout cell line, 1 µg of gRNA-expressing plasmid was transfected into 5,104 mycoplasma-free U937 cells using the Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol (10 µl tips; 1,300 V; 30 ms; one pulse). 2 d later, single-clone GFP-positive cells were sorted by flow cytometry on the BD Biosciences FACSAria II. LACCI knockout clones were screened by sequencing of a PCR fragment corresponding to the genomic region flanking the targeted sequence and by WB.

Introduction of HA tag on endogenous LACCI in U937 cell line

gRNA was designed to target LACCI near ATG using Crispor-Tefor webtool and was synthesized by IDT (gRNA sequence: 5'-TAAAGATATTCITTCAGGA-3'). Single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) was designed to add HA tag in the

N-terminal part of LACC1 and was synthesized by IDT (5'-GGA CAGCATTCAAAGTCTTCAGTAAATGTCTGATGGCAGTTTTTTT GAGAGTTC AATTTCAAACCAAAAAGATCAATCAAAA CAGCTT CTGGCGCATAATCTGGCACA TCATAAGGGTATCCTTGAAA GAATACTTTTATGCCAAAATAATCA-3'). The protocol for delivery of ribonucleoprotein (RNP) and ssODN in U937 was adapted from a protocol available on the IDT website (Alt-R CRISPR/Cas9 system-RNP electroporation Neon transfection system). Briefly, equal volumes of CRISPR RNA (crRNA; 200 μ M in nuclease-free duplex buffer; IDT) and transactivating crRNA (tracrRNA; 200 μ M in nuclease-free duplex buffer; IDT) were mixed, heated at 95°C for 5 min, cooled slowly at room temperature for 30 min, and then plunged into ice to form the single-guide RNA (sgRNA). sgRNA was then diluted to 43 μ M in nuclease-free duplex buffer (IDT). Cas9 (Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3; IDT) was diluted to 36 μ M in buffer R from the Neon transfection system kit (10 μ l; Thermo Fisher Scientific). For one reaction, 0.5 μ l of sgRNA was mixed with 0.5 μ l of diluted Cas9, and the mixture (RNP mix) was incubated 20 min at room temperature. 5×10^5 U937 cells were centrifuged and washed once in PBS, then resuspended in 9 μ l R buffer from the Neon transfection system kit (10 μ l; Thermo Fisher Scientific). 1 μ l of RNP mix was added to the cell suspension with 2 μ l of 10.8 μ M solution of Alt-R Cas9 Electroporation Enhancer (IDT) and 1 μ l of ssODN (30 μ M stock in IDT nuclease-free duplex buffer). Cells were electroporated using the Neon system (Thermo Fisher Scientific; 1,300 V; 30 ms; one pulse).

10 μ l electroporated cells were added to 190 μ l complete prewarmed medium and grown for several days. 4 d after electroporation, genomic DNA flanking the region of interest was sequenced to confirm the presence of genome editing. Then U937 was cloned, and clones were screened by PCR to confirm the presence of endogenous LACC1 HA tag (by PCR and WB).

siRNA transfection in macrophages

After 4 d of macrophage differentiation, medium was removed and replaced by 8 ml of fresh RPMI containing M-CSF. siRNA (Dharmacon) complexes were prepared at a concentration of 10 nM and were transfected using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. ON-TARGETplus Non-targeting Pool (D-001810-10) was used as a negative control. ON-TARGETplus LACC1 (L-015653-02) and ATG5 (L-004374-00) siRNA were used to decrease LACC1 and ATG5 protein expression, respectively.

IFN score assessment

Total RNA extraction was performed on whole blood collected on EDTA using a Maxwell 16 LEV SimplyRNA Blood Kit (Promega) and a magnetic particle processor (Maxwell 16; Promega) according to the manufacturer's recommendations. The extraction kit included an individual DNase treatment. Total RNA was diluted in 40 μ l RNase free water, and the concentration was quantified by spectrophotometry using a NanoVue (Biochrom). The IFN signature was assessed using the NanoString (NanoString Technologies) procedure; 200 ng of RNA was hybridized to the probes (a reporter probe and a

capture probe) at 67°C for 16–21 h using a thermocycler. Samples were then inserted into the nCounter Prep Station for the removal of excessive probes, purification, and immobilization onto the internal surface of a sample cartridge for 2–3 h. Finally, the sample cartridge was transferred to the nCounter Digital Analyzer, where color codes were counted and tabulated for each target molecule. Count numbers obtained for the six ISGs were normalized by the geometric mean of three housekeeping genes count numbers (β -actin, HPR1 [hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1] and POLR2A [RNA polymerase II subunit A]) as well as the negative and positive control values using nSolver software.

HeLa cell transfection

HeLa cells stably expressing LC3-GFP were cultured in DMEM with Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES, and 40 μ g/ml gentamycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were seeded at 150,000 cells per well in 6-well culture dishes for transfection. Cells were transfected with p3XFlag-CMV-hsLACC1 vector coding for human LACC1 cDNA fused to 3xFlag tag in its N-terminal sequence using the jetPEI reagent (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence

1.5×10^5 HeLa and 3×10^5 U937 cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates and stimulated the next day as indicated. At the desired time points, cells were washed three times with PBS and were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde. Following fixation, coverslips were washed three times with PBS and incubated 5 min with 0.1% Triton X-100. Coverslips were washed three times with PBS, and after 20 min incubation with blocking buffer (PBS, 10% goat serum, 3% BSA, and 1% human serum), coverslips were stained overnight at 4°C with mouse and rabbit primary antibodies for 20 min at room temperature with the following secondary antibodies: goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich; 1:1,000), and goat anti-rabbit-Alexa Fluor 647 (Sigma-Aldrich; 1:1,000). Following a 10-min staining with DAPI (Vector Labs), coverslips were mounted on glass slides with Prolong Gold (Molecular Probes) and imaged on a Zeiss LSM710.

Inflammasome activation assay

Macrophages were seeded in 96-well plates at 5×10^4 cells/well in RPMI 1640 GlutaMAX medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum (Dutscher). Macrophages were incubated for 3 h in the presence or absence of a priming signal consisting of LPS (10 ng/ml; Invivogen). Cells were then treated for 1.5 h with nigericin (5 mM; Invivogen) for NLRP3 inflammasome activation. Following the incubation, cells were centrifuged, and supernatants were collected.

Cytokine release measurement

All ELISAs were from R&D Systems (DY210 and DY201) and were used following the manufacturer's recommendations. Briefly, 50,000 macrophages were stimulated with 10 ng/ml of LPS for 3 h followed by 5 μ M with nigericin for 1 h 30 min. Supernatants were collected and assayed for IL-1 β and TNF levels.

Immunoblot analysis

Cells were lysed in NP-40 lysis buffer (20 mM Tris, HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% NP-40) containing protease inhibitors for 30 min at 4°C. Supernatant was collected following 10 min centrifugation at 16,000 g, 4°C, and protein content was quantified using the μ BCA quantification kit (Thermo Fisher Scientific). Protein extracts (50 μ g) were separated by SDS-PAGE on precast 4–12% acrylamide gel gradients and transferred to TransBlot Turbo Midi-size nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Antibodies used were anti-LACCI (E7 clone; Santa Cruz), anti-GAPDH, anti-IL-1 β , anti-phospho and total Akt, AMPK, IKK β , IKK α , and S6 from Cell Signaling Technology, anti-LC3B from Sigma-Aldrich, anti-p62 from Abcam, and anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000; Jackson ImmunoResearch), and revealed using the Chemiluminescence Western Lightening Plus Kit (Perkin-Elmer).

Flow cytometry analysis

U937 cells were fixed with eBioscience Fixation/Permeabilization Concentrate (00-5123-43; Invivogen) in combination with the 10 \times Permeabilization buffer (00-8333-56) following the manufacturer's instructions. Cells were then stained with primary antibodies (anti-LACCI [E7 clone; Santa Cruz], anti-LACCI [HPA040150; Sigma-Aldrich], or anti-HA [901524; Biogen]) for 1 h at room temperature. Secondary antibodies used were anti-rabbit or anti-mouse coupled with Alexa Fluor 747 for 30 min. Cells were then acquired using a LSRFortessa (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo (version 10.2).

Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) screen

HEK293T cells were established with a library of 7474 human ORFs fused to the C-terminal fragment of Cerulean (CC) and under the control of a Dox-inducible promoter. The library was inserted at one copy/cell for the large majority (80%) of cells. A proof-of-principle of this tool has been deposited (patent FR1655539), and more information will be described elsewhere (unpublished data). Transfections of the BiFC-human embryonic kidney (HEK) 293T cell library with the VN-LACCI encoding plasmid were performed using the JetPRIME reagent (Polyplus).

Red oil staining

300,000 cells were plated onto coverslips in 24-well plates and allowed to rest overnight before being stimulated the next day as indicated. Cells were washed with PBS and fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 70% isopropanol for 5 min. Cell were then stained with a solution of 4.2 mM Red Oil O dissolved in isopropanol for 15 min followed by several washes with water. Coverslips were then mounted onto glass slides using ProLong Gold Antifade Mountant (P36934; Thermo Fisher Scientific). Slides were analyzed on an LSM 800 confocal microscope, and ImageJ was used to process the images.

Seahorse analysis

The OCR was measured in XF medium (unbuffered RPMI containing 2 mM glutamine, pH 7.4) under basal conditions and in response to glucose (25 mM), oligomycin (1 μ M), trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazide (FCCP; 1.5 M), plus pyruvate

(1 mM) and antimycin A (1 μ M), plus rotenone (0.1 μ M) with an XF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Macrophages were plated (2×10^5 cells per well) in Seahorse plates overnight. The OCR was analyzed in real time for 155 min. For the fatty acid supplementation assay, Seahorse XF Palmitate-BSA FAO Substrate kit (Agilent) was used according to the manufacturer's instructions.

Efferocytosis assay

Murine thymocytes were stained using 1 μ M of CFSE (Life Technologies) for 10 min at 37°C and washed two times with 30 ml of complemented RPMI medium. Cells were treated for 4 h with dexamethasone (Sigma-Aldrich) to induce apoptosis. The CFSE-stained apoptotic bodies were washed twice with supplemented RPMI medium before being used in the efferocytosis assay. 1×10^4 macrophages were seeded on a 48-well plate overnight. 1×10^5 CFSE-stained apoptotic thymocytes were added to macrophages for 2 h. Macrophages were washed with PBS, trypsinized, and resuspended in 200 μ l of PBS. CFSE uptake was analyzed by flow cytometry.

Phagocytosis assay

Briefly, 5×10^4 macrophages seeded on a 24-well plate overnight and were incubated with DsRed-expressing *Escherichia coli* at a multiplicity of infection of 10 in antibiotic-free RPMI medium for 30 min. Wells were then washed twice with PBS, and gentamycin-containing RPMI was added. Macrophages were incubated for indicated times. Macrophages were washed with PBS, trypsinized, and resuspended in 200 μ l of PBS before analysis by flow cytometry.

Statistical analysis

Data were analyzed in GraphPad Prism 5.0. Appropriate use of unpaired and paired *t* tests was made to calculate significant differences between different experimental conditions. These are mentioned in the figure legends.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the specificity of various anti-LACCI antibodies for different protein detection assays. Fig. S2 shows the implication of signaling pathways modulating LACCI expression. Fig. S3 shows the inflammatory profile in LACCI-deficient patients. Fig. S4 shows the implication of LACCI in the autophagy machinery using primary human macrophages or a reporter HeLa LC3-GFP cell line. Fig. S5 shows the phagocytic capacity of LACCI-deficient macrophages in response to apoptotic bodies or bacteria.

Acknowledgments

We thank Sae Lim von Stuckrad for organizing the transport of clinical samples of Family A.

This work was supported by grants from Societe Francaise de Rhumatologie (grant 2016) and Fondation pour la Recherche Medicale (FD7201805005237).

Author contributions: O. Omarjee designed, performed, and analyzed experiments. A.-L. Mathieu performed and analyzed

experiments. G. Quiniou and M. Faure conceptualized the autophagy experiments. M. Moreews performed experiments. M. Ainouze performed experiments. C. Frachette, M. Gerfaud-Valentin, A. Duquesne, Y. Jamiloux, and J.-P. Larbre provided clinical samples and data of Family C. I. Meld, C. Dumaine, and G. Sarrahay provided clinical samples and data of Family D. S. Georgin-Lavialle provided clinical samples and data of Family B. T. Kallinich provided clinical samples and data of Family A. E. Tahir Turanli provided clinical samples. C. Malcus performed immunophenotyping of patients. S. Viel and R. Pescarmona performed IFN signatures of patients. G.J. Rice and Y. J. Crow provided genetic analysis of Family C. F. Magnotti and T. Henry conceptualized the inflammasome assays. F. Bleicher, J. Reboulet, and S. Merabet designed and performed the proteomic screen. T. Walzer and A. Belot supervised, designed, and funded this study. O. Omarjee prepared the initial draft. T. Walzer and A. Belot reviewed and finalized the paper.

Disclosures: S. Georgin-Lavialle reported personal fees from SOBI, non-financial support from Novartis, and personal fees from BMS outside the submitted work. F. Bleicher reported a patent to FR1655539 pending. J. Reboulet reported a patent to FR1655539 issued. S. Merabet reported a patent to FR1655539 pending. T. Henry reported personal fees from SOBI and grants from SOBI outside the submitted work. No other disclosures were reported.

Submitted: 17 May 2020

Revised: 16 September 2020

Accepted: 22 December 2020

References

Aksenjevich, I., and Q. Zhou. 2017. NF- κ B Pathway in Autoinflammatory Diseases: Dysregulation of Protein Modifications by Ubiquitin Defines a New Category of Autoinflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 8:399. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00399>

Assadi, G., R. Saleh, F. Hadzadeh, L. Vesterlund, F. Bonfigli, J. Halfvarson, L. Törkvik, A.S. Eriksson, H.E. Harris, E. Sundberg, and M. D'Amato. 2016. LACC1 polymorphisms in inflammatory bowel disease and juvenile idiopathic arthritis. *Genes Immun.* 17:261-264. <https://doi.org/10.1038/gene.2016.17>

Baldassano, R.N., J.P. Bradfield, D.S. Monos, C.E. Kim, J.T. Gleason, T. Casaluono, E.C. Frackelton, F.G. Otieno, S. Kanterakis, J.L. Shaner, et al. 2007. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut* 56: 1171-1173. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.122747>

Bonilla, D.L., A. Bhattacharya, Y. Sha, Y. Xu, Q. Xiang, A. Kan, C. Jagannath, M. Komatsu, and N.T. Elissa. 2013. Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity* 39: 537-547. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.026>

Cader, M.Z., K. Borovjak, Q. Zhang, G. Assadi, S.L. Kempster, G.W. Sewell, S. Saveljeva, J.W. Ashcroft, S. Clare, S. Mukhopadhyay, et al. 2016. C13orf31 (FAMIN) is a central regulator of immunometabolic function. *Nat. Immunol.* 17:1046-1056. <https://doi.org/10.1038/ni.3532>

Cader, M.Z., R.P. de Almeida Rodrigues, J.A. West, G.W. Sewell, M.N. Md-Ibrahim, S. Reikine, G. Sirago, L.W. Unger, A.B. Iglesias-Romero, K. Ramshorn, et al. 2020. FAMIN is a Multifunctional Purine Enzyme Enabling the Purine Nucleotide Cycle. *Cell* 180:278-295.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.017>

Carta, S., F. Penco, R. Lavieri, A. Martin, C.A. Dinarello, M. Gattorno, and A. Rubartelli. 2015. Cell stress increases ATP release in NLRP3 inflammasome-mediated autoinflammatory diseases, resulting

in cytokine imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:2835-2840. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424741112>

Cejka, D., S. Hayer, B. Niederreiter, W. Sieghart, T. Fuereder, J. Zwerina, and G. Schett. 2010. Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 62:2294-2302. <https://doi.org/10.1002/art.27504>

Chauhan, S., M.A. Mandell, and V. Deretic. 2015. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol. Cell* 58: 507-521. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.020>

Cleynen, I., J.R. Gonzalez, C. Figuera, A. Franke, D. McGovern, M. Bortlik, B.J.A. Crustius, M. Vecchi, M. Artieda, M. Szczypiorska, et al. 2013. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut* 62:1556-1565. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300777>

Demis, G. Jr., C.T.J. Holweg, S.K. Kummerfeld, D.F. Choy, A.F. Setadi, J.A. Hackney, P.M. Haverly, H. Gilbert, W.Y. Lin, L. Diehl, et al. 2014. Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics. *Arthritis Res. Ther.* 16:R90. <https://doi.org/10.1186/ar4655>

Ecker, J., G. Lielisch, M. Engstaler, M. Grandl, H. Robenek, and G. Schmitz. 2010. Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:7817-7822. <https://doi.org/10.1073/pnas.0920591107>

Ehli, S., O. Oral, G. Mitou, C. Kljg, E. Durmaz-Timucin, E. Guven-Malorov, F. Gulacti, G. Gokce, J. Dengel, O.U. Sezerman, and D. Gorucakir. 2016. RAC1 is an Interaction Partner of ATG5 and a Novel Regulator of Autophagy. *J. Biol. Chem.* 291:16753-16765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708081>

Evans, H.G., N.J. Gullick, S. Kelly, C. Pinalis, G.M. Lord, B.W. Kirkham, and L.S. Taama. 2009. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:6232-6237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808144106>

Firestein, G.S., and I.B. McInnes. 2017. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* 46:183-196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>

Grinberg, A.V., C.-D. Hu, and T.K. Kerppola. 2004. Visualization of Myc/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol. Cell Biol.* 24:4294-4308. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4294-4308.2004>

Harpas, C.R., A. Selner, S. Davidson, and S.L. Masters. 2018. An Update on Autoinflammatory Diseases: Inflammasomopathies. *Curr. Rheumatol. Rep.* 20:40. <https://doi.org/10.1007/s12926-018-0750-4>

Harris, J., M. Hartman, C. Roche, S.G. Zeng, A. O'Shea, F.A. Sharp, E.M. Lambe, E.M. Creagh, D.T. Golenbock, J. Tschopp, et al. 2011. Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *J. Biol. Chem.* 286:9587-9597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.202911>

Hersh, A.O., and S. Prahalad. 2015. Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* 64:113-124. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.002>

Homer, C.R., A.L. Richmond, N.A. Rebert, J.P. Achkar, and C. McDonald. 2010. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* 139:1630-1641, 1641.e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.006>

Huang, C., S.S. De Ravin, A.R. Paul, T. Heller, N. Ho, L. Wu Datta, C.S. Zerbe, R.E. Marchiano, D.R. Kuhns, H.A. Kaler, et al. NIDDK IBD Genetics Consortium. 2016. Genetic Risk for Inflammatory Bowel Disease is a Determinant of Crohn's Disease Development in Chronic Granulomatous Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 22:2794-2801. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000966>

Huang, C., M. Hoff, K. Ranjan, and C. Abraham. 2019. LACC1 Required for NOD2-Induced, ER Stress-Mediated Innate Immune Outcomes in Human Macrophages and LACC1 Risk Variants Modulate These Outcomes. *Cell Rep.* 29:4525-4539.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.105>

Iida, T., K. Onodera, and H. Nakase. 2017. Role of autophagy in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 23: 1944-1953. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i11.1944>

Jacquel, A., N. Benkhalaf, J. Paggetti, N. Laloui, L. Guery, E.K. Dufour, M. Ciudad, C. Racour, O. Micheau, L. Delva, et al. 2009. Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. *Blood* 114:3633-3641. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208843>

- Jacquel, A., S. Obba, L. Boyer, M. Dufles, G. Robert, P. Gounon, E. Lemichez, F. Luciano, E. Solary, and P. Aubberger. 2012. Autophagy is required for CSF-1-induced macrophage differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood*. 119:4527–4531. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-392167>
- Kallinich, T., A. Thorwarth, S.-L. von Stuckrad, A. Rosen-Wolff, H. Lukach, P. Hundsdorfer, K. Minden, and P. Krawitz. 2016. Juvenile arthritis caused by a novel FAMIN (LACC1) mutation in two children with systemic and extended oligoarticular course. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* 14:63. <https://doi.org/10.1186/s12969-016-0124-3>
- Kannan, M., E. Bajam, C. Wagner, B. Rinaldi, P.F. Kretz, P. Tilly, M. Roos, L. McGillicue, S. Bir, S. Minocha, et al. Sanger Mouse Genetics Project. 2017. WID40 repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114: E9308–E9317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713625114>
- Kamcan, I., S. Uçurlu, S. Şahin, E. Everest, Ö. Kaşapoglu, A. Tolun, H. Özdoğan, and E.T. Turanlı. 2018. LACC1 Gene Defects in Familial Form of Juvenile Arthritis. *J. Rheumatol.* 45:726–728. <https://doi.org/10.3899/jrheum.170834>
- Karmans, P.W.F., A.A. Herrada, C. Guy, G. Neale, Y. Dhungana, L. Long, P. Vogel, J. Avila, C.B. Clish, and H. Chi. 2017. Critical roles of mTORC1 signaling and metabolic reprogramming for M-CSF-mediated myelopoiesis. *J. Exp. Med.* 214:2629–2647. <https://doi.org/10.1084/jem.20161855>
- Klonosky, D.J., H. Abelevich, P. Agostini, D.K. Agrawal, G. Aliev, D.S. Askew, M. Bab, E.H. Bachrecke, B.A. Bahr, A. Ballah, et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 4:151–175. <https://doi.org/10.4161/auto.5338>
- Lacey, D.C., A. Achuthan, A.J. Fleetwood, H. Dinh, J. Roitnoda, G.M. Scholz, M.W. Chang, S.K. Beckman, A.D. Cook, and J.A. Hamilton. 2012. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J. Immunol.* 188:5752–5765. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103426>
- Lahiri, A., M. Hedl, J. Yan, and C. Abraham. 2017. Human LACC1 increases innate receptor-induced responses and a LACC1 disease-risk variant modulates these outcomes. *Nat. Commun.* 8:15614. <https://doi.org/10.1038/ncomms15614>
- Levine, B., and G. Kroemer. 2019. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*. 176:11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
- Liao, X., J.C. Shulmer, Y. Wang, M. Subramanian, K. Brown, J.S. Patton, J. Robbins, J. Martinez, and I. Tabas. 2012. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. *Cell Metab.* 15:545–553. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.022>
- Mantyhina, K., Q. Zhou, I. Akentjevich, and D.L. Kastner. 2017. The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. *Nat. Immunol.* 18:832–842. <https://doi.org/10.1038/nri.377>
- Martinez, J., J. Almenninger, A. Oberst, R. Ness, C.P. Dillon, P. Fitzgerald, M.O. Hengartner, and D.R. Green. 2011. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 17396–17401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113421108>
- Miao, Y., Q. Lv, S. Qiao, L. Yang, Y. Tao, W. Yan, F. Wang, N. Cao, Y. Dai, and Z. Wei. 2019. Alpinetin Improves Intestinal Barrier Homeostasis via Regulating Akt/mv99hi/TSC2/mTORC1/autophagy pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 384:114772. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114772>
- Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 140:313–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
- Nguyen, T.B., S.M. Louie, J.R. Daniele, Q. Tran, A. Dillin, R. Zoncu, D.K. Nomura, and J.A. Ozolsmann. 2017. DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. *Dev. Cell* 42:9–21e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.06.003>
- Patel, N., M.I. El Mouzan, S.M. Al-Mayouf, N. Adly, J.Y. Mohamed, M.A. Al-Mofarreh, N. Ibrahim, Y. Xiong, Q. Zhao, K.A. Al-Saleem, and F.S. Al-Kuraya. 2014. Study of Mendelian forms of Crohn's disease in Saudi Arabia reveals novel risk loci and alleles. *Gut*. 63:1831–1832. <https://doi.org/10.1136/gut.2014.307859>
- Pescarmona, R., A. Belot, M. Villard, L. Besson, I. Mosnier, A.-L. Mathieu, C. Lombard, L. Garnier, C. Prachette, et al. 2019. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine*. 113: 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.10.023>
- Philpott, D.J., M.T. Sorbara, S.J. Robertson, K. Croitoru, and S.E. Girardin. 2014. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14:9–23. <https://doi.org/10.1038/nri3565>
- Prakken, B., S. Alban, and A. Martin. 2011. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 377:2138–2149. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)02044-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)02044-4)
- Rabionet, R., A. Remeal, A. Mena-Villaró, S. Murias, R. Alcobendas, E. González-Roca, E. Ruiz-Ortiz, J. Azón, E. Iglesias, C. Modesto, et al. 2019. Biallelic loss-of-function LACC1/FAMIN Mutations Presenting as Rheumatoid Factor-Negative Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis. *Sci. Rep.* 9:4579. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40874-2>
- Rice, G.I., G.M. Forte, M. Szykiewicz, D.S. Chase, A. Aaby, M.S. Abdel-Hamid, S. Adcroft, R. Allcock, K.M. Bailey, U. Balotrin, et al. 2018. Assessment of Interferon-related Biomarkers in Alcaidi-Gouffres syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR a case-control study. *Lancet Neurol.* 12:1159–1169. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30558-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30558-8)
- Rodero, M.P., and V.J. Crow. 2016. Type I Interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *J. Exp. Med.* 213:2527–2538. <https://doi.org/10.1084/jem.20161596>
- Saitoh, T., N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B.-G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, et al. 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 456:264–268. <https://doi.org/10.1038/nature07383>
- Sales-Marques, C., H. Salomão, V.M. Riva, L.E. Alvarado-Arnez, E.P. Amaral, C.C. Cardoso, L.M.F. Dias-Batista, W.L. da Silva, P. Medeiros, M. da Cunha Lopes Virmond, et al. 2014. NOD2 and CARD12-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum. Genet.* 133: E25–E32. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1502-9>
- Schmeikle, T., T. Beck, D.E. Martin, and M.N. Hall. 2004. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol. Cell Biol.* 24:338–351. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.338-351.2004>
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A.M. Cuervo, and M.J. Czaja. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 458:1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Sloan-Hegg, C., J. Zhang, X. Wu, M. Sagolla, N. Ota, A. Wuster, J. Tom, E. Doran, N. Ramamoorthi, P. Caplan, et al. 2019. LACC1 Regulates TNF and IL-17 in Mouse Models of Arthritis and Inflammation. *J. Immunol.* 202:183–193. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800636>
- Spenger, K., N. Kryzhan, S. Große, A.S. Mosig, and R. Heller. 2020. VEGF Triggers Transient Induction of Autophagy in Endothelial Cells via AMPKα1. *Cells*. 9:687. <https://doi.org/10.3390/cells9030687>
- Steiner, A., C.R. Harpas, S.L. Masters, and S. Davidson. 2018. An Update on Autoinflammatory Diseases: Relapsing. *Curr. Rheumatol. Rep.* 20:39. <https://doi.org/10.1007/s12926-018-0749-x>
- Tsai, S., S. Carta, L. DeLino, R. Casati, A. Martin, M. Gattorno, and A. Rubani. 2010. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1beta secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:9789–9794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007797107>
- Travassos, L.H., L.A.M. Carneiro, M. Ramjeet, S. Hussey, Y.-G. Kim, J.G. Magalhães, L. Yuan, F. Soares, E. Chen, L. Le Bourhis, et al. 2010. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11:55–62. <https://doi.org/10.1038/nri1823>
- Umeno, J., K. Asano, T. Matsushita, T. Matsumoto, Y. Kiyohara, M. Ikeda, Y. Nakamura, N. Kamatani, and M. Kubo. 2011. Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17:2407–2415. <https://doi.org/10.1002/ibd.21651>
- Waidl, S.M., D.M. Mendes, M. Abouelhoda, N. Al-Tassan, H. Al-Dusery, E.A. Naim, B. Al-Younes, J. Shiwari, F.A. Al-Mohanna, B.F. Meyer, and S. Al-Mayouf. 2015. Association of a mutation in LACC1 with a monogenic form of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 67: 288–295. <https://doi.org/10.1002/art.38877>
- Wilderberg, M.E., A.C.W. Vos, S.C.S. Walfkamp, M. Duivenstein, A.P. Verhaar, A.A. Te Velde, G.R. van den Brink, and D.W. Hommes. 2012. Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology*. 142:1493–503.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.034>
- Zhang, Y., M.J. Morgan, K. Chen, S. Choksi, and Z.G. Liu. 2012. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood*. 119:2895–2905. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-372883>
- Zhao, Y., Q. Wang, G. Qu, S. Zhou, Z. Jing, J. Wang, W. Wang, J. Cao, K. Han, Q. Cheng, et al. 2015. RAC1 Promotes Autophagy by Enhancing the Atg4L-Bcln1-Vps34-Vps35 Complex Formation upon Phosphorylation by AMPK. *Cell Rep.* 13:1407–1417. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.011>

Downloaded from <http://www.jem.org/> on 02/21/2021 03:00:21 AM by 41.0131.77pm, 2021/02/21/2021 03:00:21 AM by 41.0131.77pm, 2021/02/21/2021 03:00:21 AM by 41.0131.77pm, 2021/02/21/2021 03:00:21 AM by 41.0131.77pm

Supplemental material

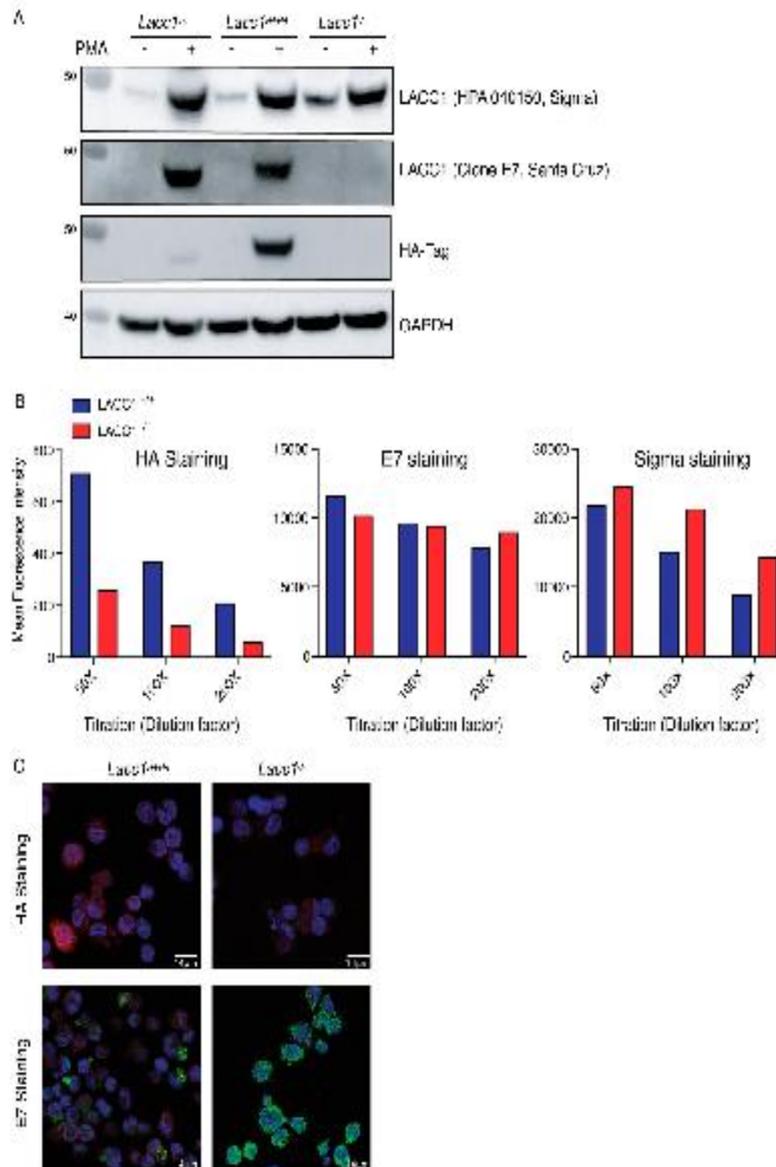


Figure S1. Endogenous LACC1 tagging reveals unspecific staining by previously used commercial antibodies. (A) Immunoblots of U937 either WT, HA-tagged, or deficient for LACC1 using anti-LACC1 (E7 clone; Santa Cruz), anti-LACC1 (HPA040150; Sigma-Aldrich), or anti-HA (901524; Biolegend) antibody. (B) Intra-cellular FACS staining of U937 HA-LACC1 or LACC1^{-/-} with indicated antibodies against LACC1. (C) Confocal analysis of U937 HA-LACC1 or LACC1^{-/-} with indicated antibodies against LACC1. Nucleus was stained with DAPI (blue).

Downloaded from <http://www.jem.org/> generated a pdf for 633620201000644103179em_20201006.pdf by INSEERM user on 25 February 2021

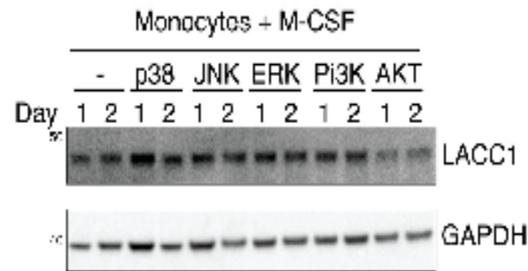


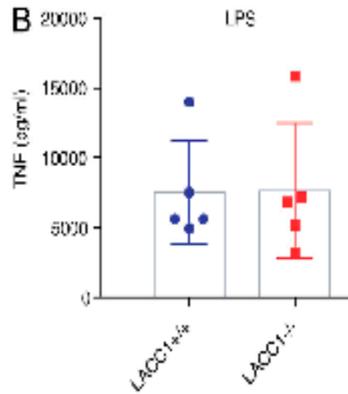
Figure S2. Role of major signaling pathways on LACC1 expression in macrophages. Immunoblots of monocytes treated with or without M-CSF and different inhibitors of p38, JNK, ERK, Pi3K, and AKT during the indicated period (representative of two experiments).

Downloaded from <http://www.jem.org/> at 18:34:00 on 09/01/2021. DOI: 10.1084/jem.20201006.pdf by INSEERM user on 25 February 2021

A

individual	Serum cytokines (pg/ml)								
	IL-6	IL-10	IFN γ	TNF	KCPI	FsL2	L-18	L-18s	
Healthy Donors	C.I.1	7	1	1	3	110	676	90	105
	C.I.2	7	1	2	3	108	688	80	110
	C.I.3	7	1	4	4	110	640	87	105
Patients	A.I.1	7	2	5	7	41	616	187	229
	B.I.1	7	2	2	5	78	616	1338	1404
	C.I.1	6	2	1	8	806	2475	195	520
	C.I.1	7	1	5	3	67	69	719	107
	C.I.2	72	2	3	7	157	229	117	187
	C.I.4	80	6	2	12	201	425	387	514
	C.I.5	39	2	6	6	47	625	325	100

B



C

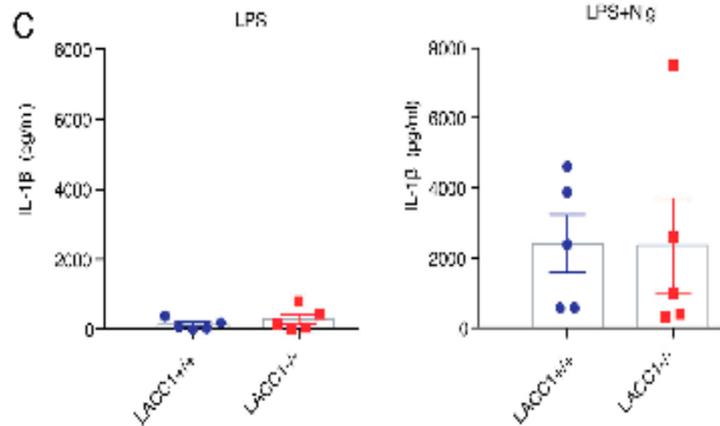


Figure S3. Inflammatory cytokine production in a LACC1-deficient environment. (A) Heatmap representation of serum cytokine levels of three healthy family members (black) and seven LACC1 patients (red). (B) U937 were differentiated for 48 h with PMA and stimulated 3 h with LPS ($n = 5$). Supernatants were assayed for TNF levels. (C) U937 were differentiated for 48 h with PMA and stimulated 3 h with LPS \pm Nigericin (Nig; $n = 5$). Supernatant were assayed for IL-1 β levels.

Downloaded from <http://jexpmed.org/content/118/10/1006> by INSEERM user on 28 February 2021

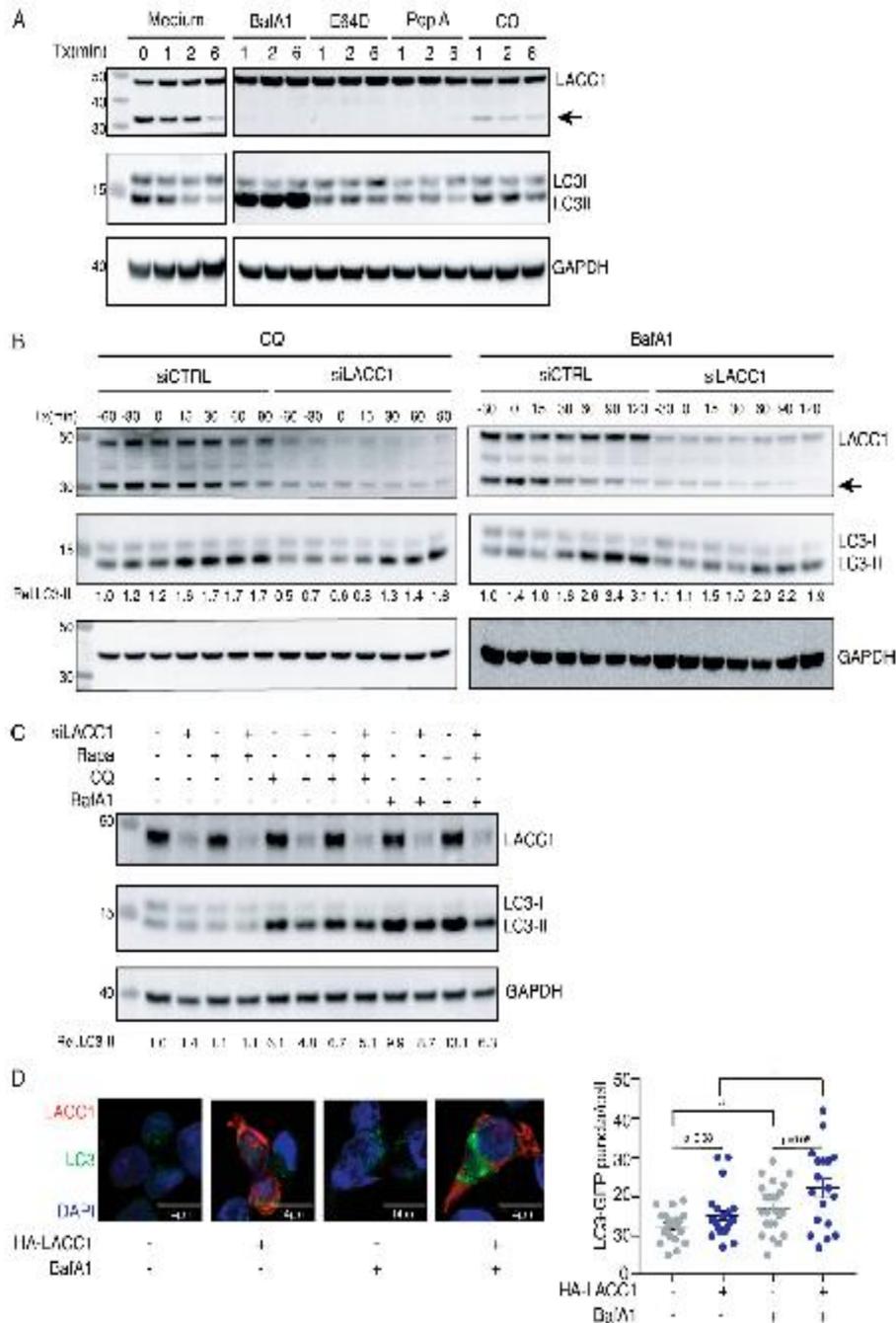


Figure S4. Autophagy-lysosome inhibitors control LACC1 cleavage and confirms LC3-II accumulation defect in the absence of LACC1. (A) Immunoblots of M-CSF macrophages treated with or without lysosome-autophagy inhibitors such as Bafilomycin A1 (BafA1), cathepsin inhibitors E64D and pepstatin A (Pep A) or chloroquine (CQ) at different time points (Tx). (B) Immunoblots of siLACC1 macrophages treated with either chloroquine (n = 2) or BafA1 (n = 3). (C) Immunoblots of siLACC1 macrophages treated with a combination of rapamycin (Rapa), chloroquine, or BafA1 for 2 h (n = 2). (D) Confocal microscopy of HeLa cells stably expressing GFP-LC3 (green) transfected with Flag-LACC1 (red). Nucleus was stained with DAPI (blue; representative of three experiments). Right: Quantification of the number of LC3-GFP dots per cell in the different conditions. *, P < 0.05; **, P < 0.005.

Downloaded from <http://www.jem.org/journal/article-pdf/127/1/108/1084/jem.20201006.pdf> by INSEERM user on 26 February 2021

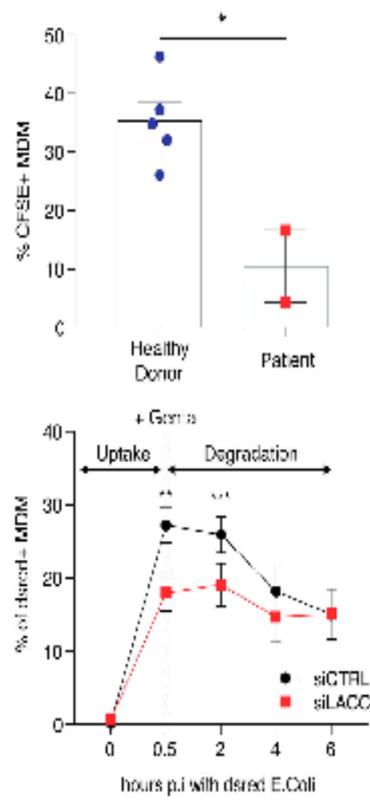


Figure S5. LACC1-deficient macrophages have impaired capacity to clear apoptotic bodies and bacteria. (A) FACS analysis of five control or two LACC1 patients' macrophages preincubated for 4 h with CFSE-stained apoptotic bodies. (B) Control or siLACC1 macrophages were preincubated for 30 min with live DsRed *E. coli* before removal and addition of sterile medium containing antibiotic. Macrophages were analyzed at different time points post infection (p.i.) for bacterial uptake ($n = 4$); $* P < 0.05$, paired t test. MDM, monocyte-derived macrophage.

Downloaded from <http://jexpmed.org/content/318/10/2011> by guest on 09/11/2021. See the Terms and Conditions (<https://www.jem.org/page/info/about/policies/terms.jsp>) on the JEM website.

F. Communications orales et posters

Communications orales :

- **G Quiniou**, O Dinet, C Viret, M Faure, A Rozières. Autophagic flux in human dendritic cells. Flash talk. 8th Scientific Days on Autophagy, CFATG8, du 17 au 19 octobre 2018, La Grande Motte, France.
- **G Quiniou**, O Dinet, G Boschetti, S Nancey, C Viret, M Faure, A Rozières. Autophagic flux modulation during human dendritic cells maturation. Présentation de 20 min. Séminaire du département d'immunologie, CIRI, le 14 mars 2019, Lyon, France.
- **G Quiniou**, O Dinet, G Boschetti, S Nancey, C Viret, M Faure, A Rozières. Modulation of the autophagic flux signature during human dendritic cells maturation. Présentation de 15 min. Séminaire d'unité, CIRI, le 17 mai 2019, Lyon, France.
- **G Quiniou**, O Dinet, G Boschetti, S Nancey, C Viret, M Faure, A Rozières. Modulation of the autophagic flux signature during human dendritic cells maturation. Présentation de 45 min. Séminaire d'unité, CIRI, le 09 octobre 2020, Lyon, France.

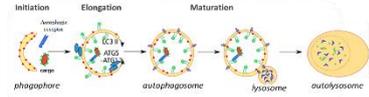
Posters scientifiques :

- **G Quiniou**, O Dinet, G Boschetti, M Clavière, C Viret, S Nancey, M Faure, A Rozières. Modulation of dendritic cells biology by autophagy: development of a cellular model. Retraite du CIRI 2018, du 4 au 6 avril, Vogüé, France.
- **G Quiniou**, O Dinet, C Viret, M Faure, A Rozières. Autophagic flux in human dendritic cells. 8th Scientific Days on Autophagy, CFATG8, du 17 au 19 octobre 2018, La Grande Motte, France.
- **G Quiniou**, O Dinet, G Boschetti, S Nancey, C Viret, M Faure, A Rozières. Identification of autophagic flux signature associated with human dendritic cell maturation. 52nd Annual Meeting of the French Society Immunology, du 12 au 14 Novembre 2019, Nantes, France.

Background

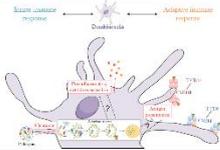
Autophagy is an intracellular degradation mechanism required for cell homeostasis using the lysosomal machinery. This has decade, autophagy emerged also as an essential host cellular process to fight intracellular pathogens especially by regulating the initiation and activation of immune response (Levine et al. 2011). Disruption of autophagy is associated with many human diseases such as neurodegenerative diseases, cancer, infectious diseases and inflammatory diseases as Crohn diseases (Neira Maier et al. 2016). Unfortunately very few studies have been done to evaluate the role of autophagy in immune cells and particularly in dendritic cells (DCs). Classical methods to analyze autophagy dysfunction are limited to the use of cell lines as HeLa cells. Given the key role of DCs as antigen presenting cells in immune response induction and in balance between effector and regulatory immune cells we hypothesize that impaired autophagy flux on antigen presenting cells might be associated with pathophysiology of inflammatory diseases as Crohn diseases (CD). Current models for pathogenesis of Crohn diseases propose that intestinal inflammation results from inappropriate and sustained immune responses toward the luminal flora in genetically susceptible hosts (Diaz et al. 2015). Indeed, genomic analysis has revealed a high association between CD and polymorphisms in autophagy-associated genes including ATG16L1, IRGM and NDP52, which suggests a role for deregulated autophagy in CD pathogenesis associated with defects in host-microbial interactions (Flinghaus et al. 2013; Randall-Demillo et al. 2013). The aim of this project is to decipher the mechanisms involved in autophagy dysfunction in Crohn's Disease patients, by studying several criteria of autophagy-related functions in dendritic cells. To reach this objective we develop a model to study autophagy-related functions in primary dendritic cells using human monocytes derived dendritic cells (MDDCs) modified for LC3 gene with HIV-1 derived lentiviral vectors. Here, we provide preliminary results about the analysis of autophagy flux in human dendritic cells using HIV-1 derived lentiviral vectors method.

Autophagy: an intracellular degradative process

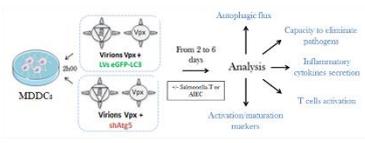


Autophagy is an intracellular degradative mechanism with 3 steps:
 1. **Initiation phase**: formation of an isolated membrane called phagophore, responsible of sequestration of a portion of cytoplasm.
 2. **Elongation phase**: formation of a double membrane structure called autophagosome.
 3. **Maturation phase**: fusion of autophagosomes with lysosomes to form autolysosomes in which degradation occurs. Monitoring of autophagy flux is commonly done thanks to the detection of LC3II.

Main functions of dendritic cells

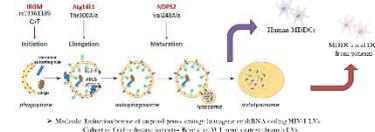


Objective I - Characterization of autophagy flux in dendritic cells



Main objectives of this project

- Objective I - Characterization of autophagy flux in dendritic cells
- Objective II - Impact of genetic variants on autophagy function/dysfunction and dendritic cell function
- Objective III - Crohn Disease and autophagy function/dysfunction



Methods

1) Production of lentiviral vectors derived from HIV-1

According to Berger et al (2011) protocol, we use HIV-1 derived lentiviral vectors (LVs) to transduce monocytes derived dendritic cells. Fused protein eGFP-LC3 was inserted in the transfer plasmid (pLV) using restriction site BamHI-Sall. After digestion and ligation, insertion is confirmed by sequencing. eGFP-LC3 LVs are produced in HEK293T cells with three distinct plasmids (figure 1) using calcium phosphate DNA precipitation method for transfection procedure. Vpx-VLPs are similarly produced using another combination of plasmid (figure 2). These particles are purified by sucrose gradient and treated.

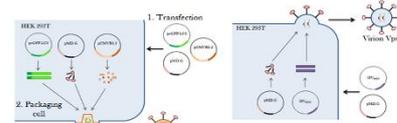


Figure 1: Schematic representation of LVs-eGFP-LC3 and virus Vpx production. HEK293T cells are cotransfected with pCMV8.2 (gag-pol), HIV-1, pMD.C (VSVg Env) and pGFP-LC3 to produce LVs, or pCMV8.2 and HIV-1, Vpx protein to produce Vpx-VLPs.

2) Differentiation and transduction of human monocytes derived dendritic cells

Human monocytes are extracted from blood samples through ficoll/peccoll gradients and they are incubated with GM-CSF and IL-4 (figure 2). After five days of differentiation, monocytes derived dendritic cells (MDDCs) are transduced with several combinations of LV such as eGFP or eGFP-LC3 viruses and Vpx viruses for two hours. Finally cells are analyzed by western-blotting, flow cytometry and confocal microscopy.

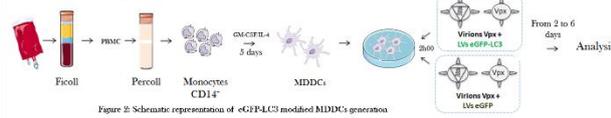


Figure 2: Schematic representation of eGFP-LC3 modified MDDCs generation

3) Modulation of the autophagic flux

To analyze the role of autophagy in MDDCs, we modulate the autophagic flux with two common drugs chloroquine and rapamycin. Chloroquine (C) inhibits autophagy through the blockade of the fusion between autophagosome and lysosome. Rapamycin (R) activates autophagy flux through the inhibition of mTOR which is a regulator of the formation of the initiation complex.

Results

1) Transduction of MDDCs by eGFP-LC3 lentiviral vector

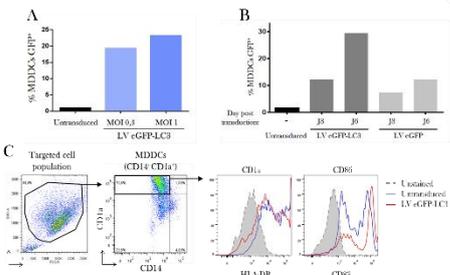


Figure 3: Analysis of transduction efficiency. After five days of differentiation MDDCs cells are transduced with LV-eGFP-LC3 or LV-eGFP, and Vpx viruses. GFP expression is detected by flow cytometry and the percentage of MDDCs GFP+ are represented in histogram (A) and (B). (A) Cells are transduced with viral particles at MOI 0.2 and analyzed 1 day after transduction. (B) Cells are transduced with viral particles at MOI 0.2 and analyzed 2 and 6 days after transduction. Phenotypic analysis of MDDCs by flow cytometry (C). (C) Cells are transduced with viral particles at MOI 1 and analyzed 3 days post-transduction. Cells are labeled with the differentiation markers CD14 and CD14, the co-stimulation markers CD85 and the activation marker CD85. Results are expressed on mean fluorescence intensity (MFI).

2) Monitoring of the autophagic flux in MDDCs

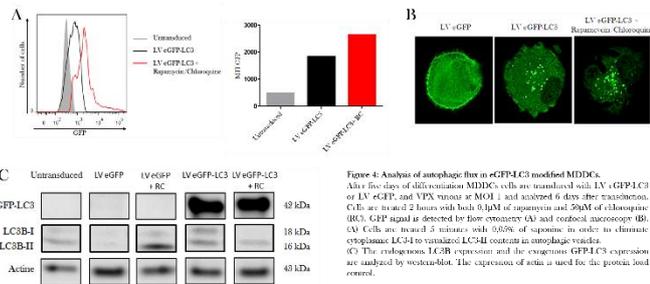


Figure 4: Analysis of autophagy flux in eGFP-LC3 modified MDDCs. After five days of differentiation MDDCs cells are transduced with LV-eGFP-LC3 or LV-eGFP, and Vpx viruses at MOI 1 and analyzed 6 days after transduction. Cells are treated 2 hours with both 0.1mM of rapamycin and 50mM of chloroquine (C). GFP signal is detected by flow cytometry (A) and confocal microscope (B). (A) Cells are treated 5 minutes with 0.5% of rapamycin in order to chronically upregulate LC3-II to visualize LC3-II contents in autophagy vesicles. (C) The endogenous LC3B expression and the exogenous GFP-LC3 expression are analyzed by western-blot. The expression of actin is used for the protein and control.

Conclusion - Perspectives

Preliminary results show that modified DC with LV method is a suitable strategy to monitor autophagy flux in DC. This technical tool will allow for the analysis of autophagy in a more appropriate physiological model than those presently used (e.g. HeLa cells) and will provide new results on pathophysiology of Crohn's Disease.

References

- Berger, G. et al. Nat Prot (2011)
 Flinghaus, D. et al. Gastroenterology (2013)
 Diaz, P. et al. Res Esp Enferm Dig (2015)
 Levine, B. et al. Nature (2011)
 Neira Maier, R. et al. Autophagy (2016)
 Randall-Demillo, S. et al. Front Immunol (2013)

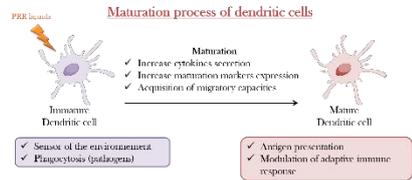
Background

Autophagy is an intracellular catabolic process which allows the degradation of elements such as pathogens using the lysosomal machinery. This process is essential for cellular homeostasis, cell survival and also cellular functions but the specific function of autophagy in specialized cells as dendritic cells remains not well known. Dendritic cells (DCs) are antigen presenting cells which play a central role to control initiation of innate and adaptive immune response and modulate the balance between effector and regulatory immune response. At the basal state dendritic cells are immature cells and able to sense and detect pathogens. Then they become mature dendritic cells specialized in antigen presentation. This has definite autophagy has been described as an important actor to deliver peptides for antigen presentation in APC but the characterization of the link between autophagy and global function of DC needs to be improved. We hypothesize that the quality of the autophagic flux participates to cellular specialization.

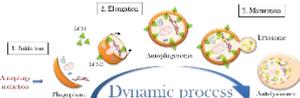
The aim of this project is to decipher the autophagic flux according to dendritic cells status, from an immature to a mature DC. To reach this objective we develop two strategies to study autophagy-related function in primary dendritic cells using human monocytes derived dendritic cells (mDDCs):

- 1) mDDCs modified for LC3 gene with HIV-1 derived lentiviral vectors overexpressing eGFP.
- 2) Detection of LC3-II by western-blot according to the time.

Here we provide results about the detection and the evaluation of the dynamic of the autophagic flux in human dendritic cells.



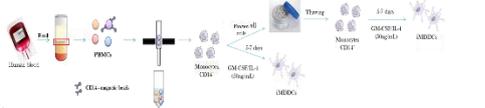
Autophagy: an intracellular degradative process



1. **Initiation phase:** Formation of an isolated membrane called phagophore.
2. **Elongation phase:** Formation of a double membrane structure called autophagosome.
3. **Maturation phase:** Fusion of autophagosomes with lysosomes to form autolysosomes. Monitoring of autophagy flux is commonly done thanks to the detection of LC3II.

General design

Monocyte-derived dendritic cell generation



Modulation of the autophagic flux in mDDCs

To analyze the autophagic flux in mDDCs, we modulate the flux with three drugs chloroquine, bafilomycin and rapamycin.

Chloroquine (C) and bafilomycin (B) inhibits autophagy through the blockade of the fusion between autophagosome and lysosome. Rapamycin (R) activates autophagy flux through the inhibition of an TOR which is a regulator of the formation of the initiation complex.

Following autophagic flux with eGFP-LC3 vectors

Transduction of mDDCs by eGFP-LC3 lentiviral vector

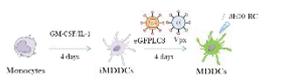


Figure 1: Differentiation and transduction of human monocyte-derived dendritic cells by immature monocyte-derived dendritic cells. Immature monocyte-derived dendritic cells are generated from human monocytes through GM-CSF and IL-4 cytokines. mDDCs are transduced with eGFP-LC3 and VSV lentiviral vectors and harvested 24h before using the medium. eGFP-LC3 protein overexpression is analyzed at 4 days by flow cytometry, western-blot and immunofluorescence. In order to modulate autophagic flux, cells are incubated 360h with rapamycin (R) and chloroquine (C). Protocol adapted from Berger, G. et al. Nat. Prot. 2011.

1. mDDCs transduction efficacy

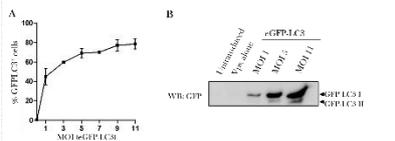


Figure 2: Analysis of transduction efficacy. After 4 days of differentiation mDDCs cells are transduced with LV-eGFP-LC3 and VSV vectors. Cells are analyzed 4 days after transduction. GFP-LC3 expression is detected by flow cytometry (A) and western-blot (B). (A) Representative curve of the percentage of GFP-LC3+ cells according to the multiplicity of infection (MOI). GFP-LC3 expression is detected using flow cytometry method on mDDCs (CD11c⁺ CD11b⁺). (B) GFP-LC3 expression is detected by western-blot with anti-GFP antibody.

2. Following autophagic flux through eGFP-LC3 expression

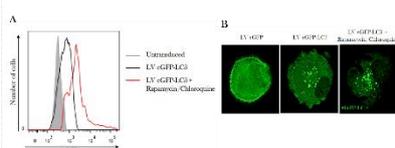


Figure 3: Analysis of autophagic flux in eGFP-LC3 modified mDDCs. After 4 days of differentiation mDDCs cells are transduced with LV-eGFP-LC3 and VSV vectors at MOI 1. Cells are analyzed 4 days after transduction. Cells are treated 3 hours with 50nM of rapamycin and 50nM of chloroquine. GFP-LC3 expression is detected by flow cytometry (A) and confocal microscope (B). (A) Cells are treated 5 minutes with 0.05% of rapamycin in order to stimulate cytoplasmic GFP-LC3 to visualize GFP-LC3II contents in autophagic vesicles.

Evaluation of the autophagic flux in iDC versus mDC

Dynamic of autophagic flux assay

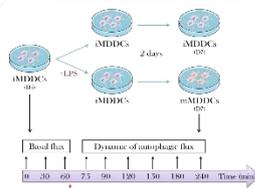


Figure 4: Autophagic flux following in immature and mature mDDCs

Autophagic flux is analyzed on mDDCs at 5 days (D5) and 7 days (D7) of differentiation and mDDCs (LPS treated cells). This flux is analyzed according to a kinetic of time for 4 hours to evaluate basal flux (0 to 60 min) and dynamic-evolution of the flux (60 to 240 min) using an inhibitory treatment chloroquine (CQ) or bafilomycin (Baf). The conversion of LC3-I to LC3-II are detected and analyzed by western-blot and the phenotype of mDDCs by flow cytometry method. Protocol adapted from Lecoq, et al. Autophagy 2011b.

1. Characterization of autophagic flux in mDDCs

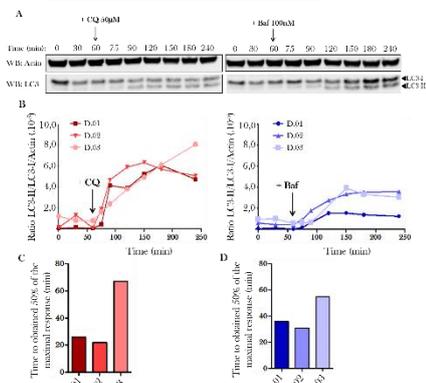


Figure 5: Dynamic of autophagic flux in immature mDDCs. Autophagic flux of immature monocyte-derived dendritic cells (iDC) are followed for 4 hours to evaluate basal flux (0 to 60 min) and dynamic-evolution of the flux (60 to 240 min) using an inhibitory treatment chloroquine (CQ) or bafilomycin (Baf). The conversion of LC3-I to LC3-II are analyzed by western-blot (A) and quantified using ImageJ software (B). (A) The expression of LC3-I is detected using an antibody against LC3B and actin is used for the protein load control. (B) Representative curve of the protein ratio of LC3-II/LC3-I normalized with actin according to the time. (C) and (D) Representative histograms of the time to obtain 50% of the maximal response after chloroquine (C) or bafilomycin (D) treatments.

2. LPS-induced maturation of mDDC is associated with modification of autophagic flux

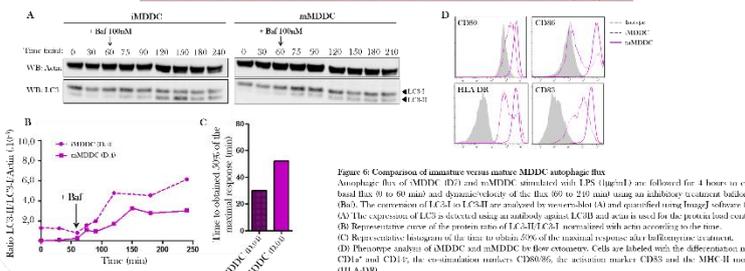


Figure 6: Comparison of immature versus mature mDDC autophagic flux. Autophagic flux of mDDCs (D5) and mDDCs (LPS treated cells) are followed for 4 hours to evaluate basal flux (0 to 60 min) and dynamic-evolution of the flux (60 to 240 min) using an inhibitory treatment bafilomycin (Baf). (A) The expression of LC3-I is detected using an antibody against LC3B and actin is used for the protein load control. (B) Representative curve of the protein ratio of LC3-II/LC3-I normalized with actin according to the time. (C) Representative histogram of the time to obtain 50% of the maximal response after bafilomycin treatment. (D) Phenotype analysis of mDDCs and mDDCs (LPS treated cells) by flow cytometry. Cells are labeled with the differentiation markers CD86 and CD11c, the co-stimulatory markers CD85 and the MHC-II molecules HLA-DR.

Conclusion - Perspectives

We have developed two strategies allowing us to detect, follow and characterized the autophagic flux in human dendritic cells. Moreover we are able to evaluate the dynamic of this flux in both immature and mature dendritic cells. Our preliminary results show that LPS-induced maturation of monocyte-derived dendritic cells seems to be associated to autophagic flux modification. We will follow these investigations in order to determine if the maturation process induced the modification of the flux or if its a TLR-dependent maturation (here LSP is a TLR4 ligand). To do that we wanted to test others stimulation ligands or cytokines to induce maturation of DCs and then evaluate the autophagic flux in these cells. In our model, we used GM-CSF+IL-4 differentiation to generate myeloid DCs. Because there is others polarized dendritic cells, we want to generate them and then evaluate the autophagic flux in order to evaluate if the quality of the autophagic flux participates to cellular specialization.

Background

Autophagy is an intracellular catabolic process which allows the degradation of cytosolic elements using the lysosomal machinery. The dynamic of this process is called autophagic flux and is essential for cellular homeostasis, cell survival and several cellular functions. The specific function of autophagy in specialized cells as dendritic cells remains not well known. Dendritic cells (DCs) are antigen presenting cells (APCs) which have essential functions in the junction of innate and adaptive immune response. The ability of DCs to migrate, transmits depends on their maturation status. In tissues DCs are called "immature" cells and are mostly able to detect pathogens. Upon activation signal, they migrate into secondary lymphoid organs to activate T lymphocytes through the antigen presentation: they are "mature" DCs.

This last decade autophagy flux has been described as an important actor to deliver peptides for antigen presentation in APC. However, the characterization of the link between autophagy and antigen function of DC needs to be improved. We hypothesize that the quality of the autophagic flux participates to dendritic cell functions.

The aim of this project is to describe the autophagic flux according to dendritic cell status, from an immature to a mature DC.

To reach this objective we have developed an innovative strategy based on a monitoring of LC3-II, a key protein of the autophagy process. Here, we provide evidences about the detection and the characterization of the autophagic flux "quality" in human dendritic cells. We also identify distinct autophagic flux signature in immature compared to mature DCs.

Experimental strategy

Monitoring of autophagic flux

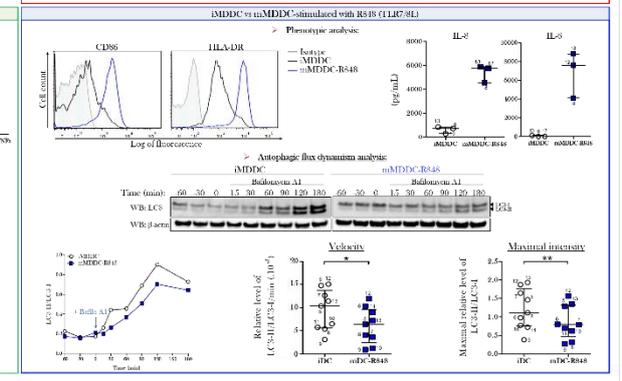
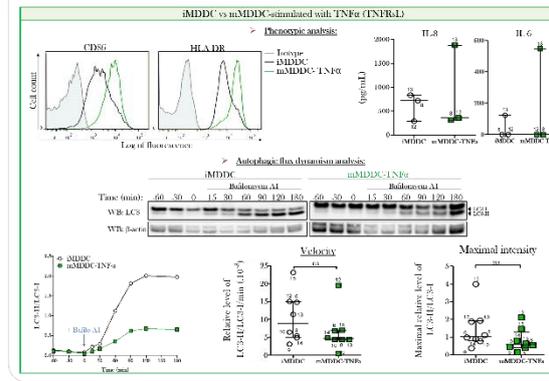
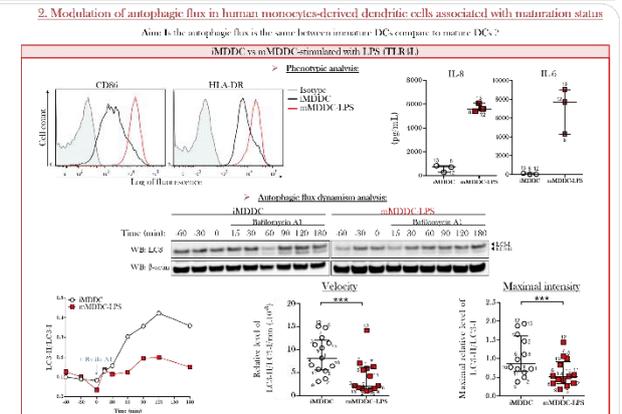
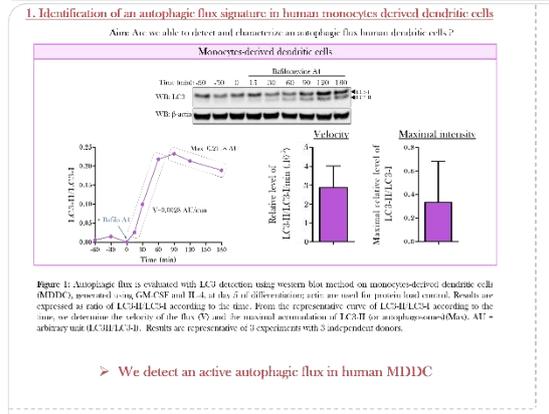
Maturation process of dendritic cells

- Immature Dendritic cell → Mature Dendritic cell
- Immature: Intense cytokines secretion, Intense maturation markers expression, Acquisition of migratory capacities.
- Mature: Antigen presentation, Modulators of adaptive immune response.

Autophagy: an intracellular degradative process

- Initiation phase: formation of an isolated membrane called phagophore
- Elongation phase: formation of a double membrane structure called autophagosome
- Maturation phase: fusion of autophagosomes with lysosomes to form autolysosomes

Results



Conclusions - Perspectives

We demonstrate that we are able to detect and follow the autophagic flux in human monocytes-derived dendritic cells (figure 1). We have identified two different autophagic flux signature in MDDCs upon their maturation state (figure 2). Immature MDDCs are characterized by a "high" autophagic flux signature compare to mature MDDCs which are characterized by a "low" autophagic flux signature. Thus, these results suggest that the mature phenotype of DCs is associated with a lower autophagic flux what could contribute to adapted biological functions in the course of an immune response. We propose next to evaluate the link between the autophagy process and the specific function of human dendritic cells associated to their maturation status.

➤ We identified two different autophagic flux signatures :

- "High" autophagic flux in immature MDDC
- "Low" autophagic flux in mature MDDC

G. Références bibliographiques

- Aar, Angelic M. G. van der, Daisy I. Picavet, Femke J. Muller, Leonie de Boer, Toni M. M. van Capel, Sebastian A. J. Zaat, Jan D. Bos, et al. 2013. « Langerhans Cells Favor Skin Flora Tolerance through Limited Presentation of Bacterial Antigens and Induction of Regulatory T Cells ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (5): 1240-49. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.500>.
- Aar, Angelic M. G. van der, Regien M. R. Sylva-Steenland, Jan D. Bos, Martien L. Kapsenberg, Esther C. de Jong, et Marcel B. M. Teunissen. 2007. « Cutting Edge: Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans Cells Abolishes Bacterial Recognition ». *The Journal of Immunology* 178 (4): 1986-90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.1986>.
- Achachi, Amine, Marc Vocanson, Philippe Bastien, Josette Péguet-Navarro, Sophie Grande, Catherine Goujon, Lionel Breton, Isabelle Castiel-Higounenc, Jean-François Nicolas, et Audrey Gueniche. 2015. « UV Radiation Induces the Epidermal Recruitment of Dendritic Cells That Compensate for the Depletion of Langerhans Cells in Human Skin ». *Journal of Investigative Dermatology* 135 (8): 2058-67. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.118>.
- Ackerman, Anne L., et Peter Cresswell. 2003. « Regulation of MHC Class I Transport in Human Dendritic Cells and the Dendritic-Like Cell Line KG-1 ». *The Journal of Immunology* 170 (8): 4178-88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4178>.
- Adams, Nicholas M., Simon Grassmann, et Joseph C. Sun. 2020. « Clonal Expansion of Innate and Adaptive Lymphocytes ». *Nature Reviews Immunology* 20 (11): 694-707. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0307-4>.
- Ade, Nadège, Diane Antonios, Saadia Kerdine-Romer, Fanny Boisleve, Françoise Rousset, et Marc Pallardy. 2007. « NF-κB Plays a Major Role in the Maturation of Human Dendritic Cells Induced by NiSO₄ but not by DNCB ». *Toxicological Sciences* 99 (2): 488-501. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm178>.
- Ahluwalia, Bani, Luiza Moraes, Maria K. Magnusson, et Lena Öhman. 2018. « Immunopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Mechanisms of Biological Therapies ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 53 (4): 379-89. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1447597>.
- Al-Hassi, H. O., D. Bernardo, A. U. Murugananthan, E. R. Mann, N. R. English, A. Jones, M. A. Kamm, et al. 2013. « A Mechanistic Role for Leptin in Human Dendritic Cell Migration: Differences between Ileum and Colon in Health and Crohn's Disease ». *Mucosal Immunology* 6 (4): 751-61. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.113>.
- Alissafi, Themis, Aggelos Banos, Louis Boon, Tim Sparwasser, Alessandra Ghigo, Kajsa Wing, Dimitrios Vassilopoulos, et al. 2017. « Tregs Restrain Dendritic Cell Autophagy to Ameliorate Autoimmunity ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (7): 2789-2804. <https://doi.org/10.1172/JCI92079>.
- Andersson, Linda I. M., Peter Hellman, et Håkan Eriksson. 2008. « Receptor-Mediated Endocytosis of Particles by Peripheral Dendritic Cells ». *Human Immunology* 69 (10): 625-33. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.07.010>.
- Angel, Catherine E., Chun-Jen J. Chen, Oliver C. Horlacher, Sintia Winkler, Thomas John, Judy Browning, Duncan MacGregor, Jonathan Cebon, et P. Rod Dunbar. 2009. « Distinctive Localization of Antigen-Presenting Cells in Human Lymph Nodes ». *Blood* 113 (6): 1257-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-165266>.
- Angel, Catherine E., Aisha Lala, Chun-Jen J. Chen, Stephen G. Edgar, Lena L. Ostrovsky, et P. Rod Dunbar. 2007. « CD14⁺ Antigen-Presenting Cells in Human Dermis Are Less Mature than Their CD1a⁺ Counterparts ». *International Immunology* 19 (11): 1271-79. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm096>.

- Axe, Elizabeth L., Simon A. Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H. Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, et Nicholas T. Ktistakis. 2008. « Autophagosome Formation from Membrane Compartments Enriched in Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Dynamically Connected to the Endoplasmic Reticulum ». *The Journal of Cell Biology* 182 (4): 685-701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>.
- Ayabe, Tokiyoshi, Donald P. Satchell, Carole L. Wilson, William C. Parks, Michael E. Selsted, et Andre J. Ouellette. 2000. « Secretion of Microbicidal α -Defensins by Intestinal Paneth Cells in Response to Bacteria ». *Nature Immunology* 1 (2): 113-18. <https://doi.org/10.1038/77783>.
- Bach, Markus, Mark Larance, David E. James, et Georg Ramm. 2011. « The Serine/Threonine Kinase ULK1 Is a Target of Multiple Phosphorylation Events ». *The Biochemical Journal* 440 (2): 283-91. <https://doi.org/10.1042/BJ20101894>.
- Bachem, Annabell, Steffen Güttler, Evelyn Hartung, Frédéric Ebstein, Michael Schaefer, Astrid Tannert, Abdulgabar Salama, et al. 2010. « Superior Antigen Cross-Presentation and XCR1 Expression Define Human CD11c+CD141+ Cells as Homologues of Mouse CD8+ Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1273-81. <https://doi.org/10.1084/jem.20100348>.
- Backer, Jonathan M. 2016. « The Intricate Regulation and Complex Functions of the Class III Phosphoinositide 3-Kinase Vps34 ». *The Biochemical Journal* 473 (15): 2251-71. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160170>.
- Baghdadi, Muhammad, Akihiro Yoneda, Tsunaki Yamashina, Hiroko Nagao, Yoshihiro Komohara, Shigenori Nagai, Hisaya Akiba, et al. 2013. « TIM-4 Glycoprotein-Mediated Degradation of Dying Tumor Cells by Autophagy Leads to Reduced Antigen Presentation and Increased Immune Tolerance ». *Immunity* 39 (6): 1070-81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.014>.
- Bakula, Daniela, Amelie J. Müller, Theresia Zuleger, Zsuzsanna Takacs, Mirita Franz-Wachtel, Ann-Katrin Thost, Daniel Brigger, et al. 2017. « WIPI3 and WIPI4 β -Propellers Are Scaffolds for LKB1-AMPK-TSC Signalling Circuits in the Control of Autophagy ». *Nature Communications* 8 (1): 15637. <https://doi.org/10.1038/ncomms15637>.
- Barrett, Jeffrey C., Sarah Hansoul, Dan L. Nicolae, Judy H. Cho, Richard H. Duerr, John D. Rioux, Steven R. Brant, et al. 2008. « Genome-Wide Association Defines More than 30 Distinct Susceptibility Loci for Crohn's Disease ». *Nature Genetics* 40 (8): 955-62. <https://doi.org/10.1038/ng.175>.
- Basit, Farhan, Till Mathan, David Sancho, et I. Jolanda M. de Vries. 2018. « Human Dendritic Cell Subsets Undergo Distinct Metabolic Reprogramming for Immune Response ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02489>.
- Baskaran, Sulochanadevi, Michael J. Ragusa, Evzen Boura, et James H. Hurley. 2012. « Two-Site Recognition of Phosphatidylinositol 3-Phosphate by PROPPINs in Autophagy ». *Molecular Cell* 47 (3): 339-48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.027>.
- Bates, E. E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J. J. Pin, S. M. Zurawski, et al. 1999. « APCs Express DCIR, a Novel C-Type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (4): 1973-83.
- Bazan, Silvia Boschi, Barbara Walch-Rückheim, Manfred J. Schmitt, et Frank Breinig. 2018. « Maturation and Cytokine Pattern of Human Dendritic Cells in Response to Different Yeasts ». *Medical Microbiology and Immunology* 207 (1): 75-81. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0528-8>.
- Bel, Shai, Mihir Pendse, Yuhao Wang, Yun Li, Kelly A. Ruhn, Brian Hassell, Tess Leal, Sebastian E. Winter, Rannik J. Xavier, et Lora V. Hooper. 2017. « Paneth Cells Secrete Lysozyme via Secretory Autophagy during Bacterial Infection of the Intestine ». *Science* 357 (6355): 1047-52. <https://doi.org/10.1126/science.aal4677>.

- Bevan, Michael J. 2004. « Helping the CD8 + T-Cell Response ». *Nature Reviews Immunology* 4 (8): 595-602. <https://doi.org/10.1038/nri1413>.
- Bevins, Charles L., et Nita H. Salzman. 2011. « Paneth Cells, Antimicrobial Peptides and Maintenance of Intestinal Homeostasis ». *Nature Reviews. Microbiology* 9 (5): 356-68. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>.
- Bingol, Baris, Joy S. Tea, Lilian Phu, Mike Reichelt, Corey E. Bakalarski, Qinghua Song, Oded Foreman, Donald S. Kirkpatrick, et Morgan Sheng. 2014. « The Mitochondrial Deubiquitinase USP30 Opposes Parkin-Mediated Mitophagy ». *Nature* 510 (7505): 370-75. <https://doi.org/10.1038/nature13418>.
- Birgisdottir, Ása Birna, Trond Lamark, et Terje Johansen. 2013. « The LIR Motif – Crucial for Selective Autophagy ». *Journal of Cell Science* 126 (15): 3237-47. <https://doi.org/10.1242/jcs.126128>.
- Blanchet, Fabien P., Arnaud Moris, Damjan S. Nikolic, Martin Lehmann, Sylvain Cardinaud, Romaine Stalder, Eduardo Garcia, et al. 2010. « Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses ». *Immunity* 32 (5): 654-69. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.011>.
- Blanco, Patrick, A. Karolina Palucka, Virginia Pascual, et Jacques Banchereau. 2008. « Dendritic Cells and Cytokines in Human Inflammatory and Autoimmune Diseases ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19 (1): 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.004>.
- Borg, Rachael J., Andre L. Samson, Amanda E.-L. Au, Anja Scholzen, Martina Fuchsberger, Ying Y. Kong, Roxann Freeman, Nicole A. Mifsud, Magdalena Plebanski, et Robert L. Medcalf. 2015. « Dendritic Cell-Mediated Phagocytosis but Not Immune Activation Is Enhanced by Plasmin ». *PLoS ONE* 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131216>.
- Boschetti, Gilles, Stephane Nancey, Driffa Moussata, Eddy Cotte, Yves Francois, Bernard Flourié, et Dominique Kaiserlian. 2016. « Enrichment of Circulating and Mucosal Cytotoxic CD8+ T Cells Is Associated with Postoperative Endoscopic Recurrence in Patients with Crohn's Disease ». *Journal of Crohn's & Colitis* 10 (3): 338-45. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv211>.
- Bradley, J. R. 2008. « TNF-Mediated Inflammatory Disease ». *The Journal of Pathology* 214 (2): 149-60. <https://doi.org/10.1002/path.2287>.
- Brandstaetter, Hemma, Chieko Kishi-Itakura, David A. Tumbarello, Dietmar J. Manstein, et Folma Buss. 2014. « Loss of Functional MYO1C/Myosin 1c, a Motor Protein Involved in Lipid Raft Trafficking, Disrupts Autophagosome-Lysosome Fusion ». *Autophagy* 10 (12): 2310-23. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984272>.
- Brest, Patrick, Pierre Lapaquette, Mouloud Souidi, Kevin Lebrigand, Annabelle Cesaro, Valérie Vouret-Craviari, Bernard Mari, et al. 2011. « A Synonymous Variant in IRGM Alters a Binding Site for MiR-196 and Causes Dereglulation of IRGM-Dependent Xenophagy in Crohn's Disease ». *Nature Genetics* 43 (3): 242-45. <https://doi.org/10.1038/ng.762>.
- Breton, Gaëlle, Jaeyop Lee, Yu Jerry Zhou, Joseph J. Schreiber, Tibor Keler, Sarah Puhr, Niroshana Anandasabapathy, et al. 2015. « Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells ». *Journal of Experimental Medicine* 212 (3): 401-13. <https://doi.org/10.1084/jem.20141441>.
- Breton, Gaëlle, Shiwei Zheng, Renan Valieris, Israel Tojal da Silva, Rahul Satija, et Michel C. Nussenzweig. 2016. « Human Dendritic Cells (DCs) Are Derived from Distinct Circulating Precursors That Are Precommitted to Become CD1c+ or CD141+ DCs ». *The Journal of Experimental Medicine* 213 (13): 2861-70. <https://doi.org/10.1084/jem.20161135>.

- Buisson, Anthony, Clara Douadi, Lemlih Ouchchane, Marion Goutte, Jean-Pierre Hugot, Anaëlle Dubois, Régine Minet-Quinard, et al. 2019. « Macrophages Inability to Mediate Adherent-Invasive E. Coli Replication Is Linked to Autophagy in Crohn's Disease Patients ». *Cells* 8 (11). <https://doi.org/10.3390/cells8111394>.
- Burns, S., A. J. Thrasher, M. P. Blundell, L. Machesky, et G. E. Jones. 2001. « Configuration of Human Dendritic Cell Cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS Protein, and Differentiation ». *Blood* 98 (4): 1142-49. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.4.1142>.
- Cadwell, Ken, Khushbu K. Patel, Nicole S. Maloney, Ta-Chiang Liu, Aylwin C. Y. Ng, Chad E. Storer, Richard D. Head, Ramnik Xavier, Thaddeus S. Stappenbeck, et Herbert W. Virgin. 2010. « Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene Atg16L1 Phenotypes in Intestine ». *Cell* 141 (7): 1135-45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.009>.
- Cao, Anthony T., Suxia Yao, Bin Gong, Charles O. Elson, et Yingzi Cong. 2012. « Th17 Cells Upregulate Polymeric Ig Receptor and Intestinal IgA and Contribute to Intestinal Homeostasis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (9): 4666-73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200955>.
- Cao, Yanyan, Yichen Wang, Widian F. Abi Saab, Fajun Yang, Jeffrey E. Pessin, et Jonathan M. Backer. 2014. « NRBF2 regulates macroautophagy as a component of Vps34 Complex I ». *The Biochemical journal* 461 (2): 315-22. <https://doi.org/10.1042/BJ20140515>.
- Cardinaud, Sylvain, Alejandra Urrutia, Angeline Rouers, Pierre-Grégoire Coulon, Jérôme Kervevan, Clémence Richetta, Anne Bet, et al. 2017. « Triggering of TLR-3, -4, NOD2, and DC-SIGN reduces viral replication and increases T-cell activation capacity of HIV-infected human dendritic cells ». *European Journal of Immunology* 47 (5): 818-29. <https://doi.org/10.1002/eji.201646603>.
- Carreras-Torres, Robert, Gemma Ibáñez-Sanz, Mireia Obón-Santacana, Eric J. Duell, et Victor Moreno. 2020. « Identifying Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: A Mendelian Randomization Study ». *Scientific Reports* 10 (1): 19273. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76361-2>.
- Carroll, Kelly Casey, Benoit Viollet, et Jill Suttles. 2013. « AMPK α 1 deficiency amplifies proinflammatory myeloid APC activity and CD40 signaling ». *Journal of Leukocyte Biology* 94 (6): 1113-21. <https://doi.org/10.1189/jlb.0313157>.
- Castell-Rodríguez, Andrés, Gabriela Piñón-Zárate, Miguel Herrera-Enríquez, Katia Jarquín-Yáñez, et Iliana Medina-Solares. 2017. « Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications ». *Biology of Myelomonocytic Cells*, mai. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68352>.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, et J. Banchereau. 1994. « Activation of Human Dendritic Cells through CD40 Cross-Linking ». *The Journal of Experimental Medicine* 180 (4): 1263-72. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1263>.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, et G. Alber. 1996. « Ligation of CD40 on Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity: T-T Help via APC Activation ». *The Journal of Experimental Medicine* 184 (2): 747-52. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.747>.
- Cella, Marina, David Jarrossay, Fabio Facchetti, Olga Alebardi, Hideo Nakajima, Antonio Lanzavecchia, et Marco Colonna. 1999. « Plasmacytoid Monocytes Migrate to Inflamed Lymph Nodes and Produce Large Amounts of Type I Interferon ». *Nature Medicine* 5 (8): 919-23. <https://doi.org/10.1038/11360>.
- Chan, Nickie C., Anna M. Salazar, Anh H. Pham, Michael J. Sweredoski, Natalie J. Kolawa, Robert L. J. Graham, Sonja Hess, et David C. Chan. 2011. « Broad Activation of the Ubiquitin-Proteasome System by Parkin Is Critical for Mitophagy ». *Human Molecular*

- Genetics* 20 (9): 1726-37. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr048>.
- Chang, Lufen, et Michael Karin. 2001. « Mammalian MAP Kinase Signalling Cascades ». *Nature* 410 (6824): 37-40. <https://doi.org/10.1038/35065000>.
- Chanut, Romain, et Virginie Petrilli. 2019. « Détection de l'ADN cytosolique par la voie cGAS-STING - De l'immunité innée vers le contrôle de la tumorigenèse ». *médecine/sciences* 35 (6-7): 527-34. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019095>.
- Chapoval, Andrei I., Jian Ni, Julie S. Lau, Ryan A. Wilcox, Dallas B. Flies, Ding Liu, Haidong Dong, et al. 2001. « B7-H3: A Costimulatory Molecule for T Cell Activation and IFN- γ Production ». *Nature Immunology* 2 (3): 269-74. <https://doi.org/10.1038/85339>.
- Chelakkot, Chaithanya, Jaewang Ghim, et Sung Ho Ryu. 2018. « Mechanisms Regulating Intestinal Barrier Integrity and Its Pathological Implications ». *Experimental & Molecular Medicine* 50 (8): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>.
- Chemnitz, Jens M., Richard V. Parry, Kim E. Nichols, Carl H. June, et James L. Riley. 2004. « SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation ». *The Journal of Immunology* 173 (2): 945-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.945>.
- Chen, Grace, Michael H. Shaw, Yun-Gi Kim, et Gabriel Nuñez. 2009. « NOD-like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease ». *Annual Review of Pathology* 4: 365-98. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239>.
- Chen, Guo, Zhe Han, Du Feng, Yanfang Chen, Linbo Chen, Hao Wu, Li Huang, et al. 2014. « A Regulatory Signaling Loop Comprising the PGAM5 Phosphatase and CK2 Controls Receptor-Mediated Mitophagy ». *Molecular Cell* 54 (3): 362-77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.034>.
- Cheng, Jing, Airi M. Palva, Willem M. de Vos, et Reetta Satokari. 2013. « Contribution of the Intestinal Microbiota to Human Health: From Birth to 100 Years of Age ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 358: 323-46. https://doi.org/10.1007/82_2011_189.
- Chiang, H. L., et J. F. Dice. 1988. « Peptide Sequences That Target Proteins for Enhanced Degradation during Serum Withdrawal ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (14): 6797-6805.
- Chiang, H. L., Terlecky, C. P. Plant, et J. F. Dice. 1989. « A Role for a 70-Kilodalton Heat Shock Protein in Lysosomal Degradation of Intracellular Proteins ». *Science* 246 (4928): 382-85. <https://doi.org/10.1126/science.2799391>.
- Chittaranjan, Suganthi, Svetlana Bortnik, et Sharon M. Gorski. 2015. « Monitoring Autophagic Flux by Using Lysosomal Inhibitors and Western Blotting of Endogenous MAP1LC3B ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2015 (8): pdb.prot086256. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot086256>.
- Cho, Mi-La, Jung-Won Kang, Young-Mee Moon, Hyo-Jung Nam, Joo-Yeon Jhun, Seong-Beom Heo, Hyun-Tak Jin, et al. 2006. « STAT3 and NF-KappaB Signal Pathway Is Required for IL-23-Mediated IL-17 Production in Spontaneous Arthritis Animal Model IL-1 Receptor Antagonist-Deficient Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (9): 5652-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5652>.
- Chow, Amy, Derek Toomre, Wendy Garrett, et Ira Mellman. 2002. « Dendritic Cell Maturation Triggers Retrograde MHC Class II Transport from Lysosomes to the Plasma Membrane ». *Nature* 418 (6901): 988-94. <https://doi.org/10.1038/nature01006>.
- Chu, Chung-Ching, Niwa Ali, Panagiotis Karagiannis, Paola Di Meglio, Ania Skowera, Luca Napolitano, Guillermo Barinaga, et al. 2012. « Resident CD141 (BDCA3)+ Dendritic Cells in Human Skin Produce IL-10 and Induce Regulatory T Cells That Suppress Skin Inflammation ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (5): 935-45.

- <https://doi.org/10.1084/jem.20112583>.
- Chu, Hiutung, Arya Khosravi, Indah P. Kusumawardhani, Alice H. K. Kwon, Anilton C. Vasconcelos, Larissa D. Cunha, Anne E. Mayer, et al. 2016. « Gene-Microbiota Interactions Contribute to the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 352 (6289): 1116-20. <https://doi.org/10.1126/science.aad9948>.
- Clark, Sam L. 1957. « CELLULAR DIFFERENTIATION IN THE KIDNEYS OF NEWBORN MICE STUDIED WITH THE ELECTRON MICROSCOPE ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 3 (3): 349-62.
- Coccia, Eliana M., Martina Severa, Elena Giacomini, Danièle Monneron, Maria Elena Remoli, Ilkka Julkunen, Marina Cella, Roberto Lande, et Gilles Uzé. 2004. « Viral Infection and Toll-like Receptor Agonists Induce a Differential Expression of Type I and Lambda Interferons in Human Plasmacytoid and Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *European Journal of Immunology* 34 (3): 796-805. <https://doi.org/10.1002/eji.200324610>.
- Cohn, Lillian, Bithi Chatterjee, Filipp Esselborn, Anna Smed-Sörensen, Norihiro Nakamura, Cécile Chalouni, Byoung-Chul Lee, et al. 2013. « Antigen Delivery to Early Endosomes Eliminates the Superiority of Human Blood BDCA3⁺ Dendritic Cells at Cross Presentation ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (5): 1049-63. <https://doi.org/10.1084/jem.20121251>.
- Collin, Matthew, et Venetia Bigley. 2018. « Human dendritic cell subsets: an update ». *Immunology* 154 (1): 3-20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>.
- Collins, Mary, Vincent Ling, et Beatriz M Carreno. 2005. « The B7 family of immune-regulatory ligands ». *Genome Biology* 6 (6): 223. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-6-223>.
- Cooney, Rachel, John Baker, Oliver Brain, Benedicte Danis, Tica Pichulik, Philip Allan, David J. P. Ferguson, Barry J. Campbell, Derek Jewell, et Alison Simmons. 2010. « NOD2 Stimulation Induces Autophagy in Dendritic Cells Influencing Bacterial Handling and Antigen Presentation ». *Nature Medicine* 16 (1): 90-97. <https://doi.org/10.1038/nm.2069>.
- Copetti, Tamara, Cosetta Bertoli, Emiliano Dalla, Francesca Demarchi, et Claudio Schneider. 2009. « P65/RelA Modulates BECN1 Transcription and Autophagy ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (10): 2594-2608. <https://doi.org/10.1128/MCB.01396-08>.
- Cornelissen, Tom, Dominik Haddad, Fieke Wauters, Cindy Van Humbeek, Wim Mandemakers, Brianada Koentjoro, Carolyn Sue, et al. 2014. « The Deubiquitinase USP15 Antagonizes Parkin-Mediated Mitochondrial Ubiquitination and Mitophagy ». *Human Molecular Genetics* 23 (19): 5227-42. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu244>.
- Corridoni, Daniele, et Alison Simmons. 2019. « Innate Immune Receptors for Cross-Presentation: The Expanding Role of NLRs ». *Molecular Immunology, EMBO Workshop on Antigen Processing and Presentation, Salamanca, Spain, 2017*, 113 (septembre): 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.11.028>.
- Coulon, Pierre-Grégoire, Clémence Richetta, Angéline Rouers, Fabien P. Blanchet, Alejandra Urrutia, Mathilde Guerbois, Vincent Pigué, et al. 2016. « HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II-Restricted Antigens to HIV-Specific CD4⁺ T Cells ». *The Journal of Immunology*, juin. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600286>.
- Crozat, Karine, Rachel Guiton, Vanessa Contreras, Vincent Feuillet, Charles-Antoine Dutertre, Erwan Ventre, Thien-Phong Vu Manh, et al. 2010. « The XC Chemokine Receptor 1 Is a Conserved Selective Marker of Mammalian Cells Homologous to Mouse CD8alpha⁺ Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1283-92. <https://doi.org/10.1084/jem.20100223>.
- Cuervo, A. M., et J. F. Dice. 2000. « Regulation of Lamp2a Levels in the Lysosomal Membrane ». *Traffic* 1 (7): 570-83. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010707.x>.

- Cuervo, Ana Maria, et J. Fred Dice. 1996. « A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes ». *Science* 273 (5274): 501-3. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.501>.
- Cypowyj, Sophie, Capucine Picard, Laszlo Marodi, Jean-Laurent Casanova, et Anne Puel. 2012. « Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans ». *European journal of immunology* 42 (9): 2246-54. <https://doi.org/10.1002/eji.201242605>.
- Dalod, Marc, Rabie Chelbi, Bernard Malissen, et Toby Lawrence. 2014. « Dendritic Cell Maturation: Functional Specialization through Signaling Specificity and Transcriptional Programming ». *The EMBO Journal* 33 (10): 1104-16. <https://doi.org/10.1002/emboj.201488027>.
- Darfeuille-Michaud, Arlette, Jérôme Boudeau, Philippe Bulois, Christel Neut, Anne-Lise Glasser, Nicolas Barnich, Marie-Agnès Bringer, Alexander Swidsinski, Laurent Beaugerie, et Jean-Frédéric Colombel. 2004. « High Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia Coli Associated with Ileal Mucosa in Crohn's Disease ». *Gastroenterology* 127 (2): 412-21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>.
- De Gassart, Aude, Voahirana Camosseto, Jacques Thibodeau, Maurizio Ceppi, Nadia Catalan, Philippe Pierre, et Evelina Gatti. 2008. « MHC Class II Stabilization at the Surface of Human Dendritic Cells Is the Result of Maturation-Dependent MARCH I down-Regulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (9): 3491-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708874105>.
- Delespesse, Guy, Yusei Ohshima, Uno Shu, Liang-Peng Yang, Christian Demeure, Chang-You Wu, Dae-Gyoo Byun, et Marika Sarfati. 1997. « Differentiation of Naive Human CD4 T Cells into TH2/TH1 Effectors ». *Allergology International* 46 (2): 63-72. <https://doi.org/10.2332/allergolint.46.63>.
- Demers, Corey R., Morgan A. Reuter, et Michael R. Betts. 2013. « CD8(+) T-Cell Effector Function and Transcriptional Regulation during HIV Pathogenesis ». *Immunological Reviews* 254 (1): 190-206. <https://doi.org/10.1111/imr.12069>.
- Dempsey, Alan, et Andrew G. Bowie. 2015. « Innate Immune Recognition of DNA: A Recent History ». *Virology* 479-480 (mai): 146-52. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.013>.
- Denzin, Lisa K., Jennifer L. Fallas, Maria Prendes, et Woelsung Yi. 2005. « Right Place, Right Time, Right Peptide: DO Keeps DM Focused ». *Immunological Reviews* 207 (octobre): 279-92. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00302.x>.
- Deretic, Vojo. 2012. « Autophagy as an Innate Immunity Paradigm: Expanding the Scope and Repertoire of Pattern Recognition Receptors ». *Current Opinion in Immunology* 24 (1): 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.10.006>.
- Di Bartolomeo, Sabrina, Marco Corazzari, Francesca Nazio, Serafina Oliverio, Gaia Lisi, Manuela Antonioli, Vittoria Pagliarini, et al. 2010. « The Dynamic Interaction of AMBRA1 with the Dynein Motor Complex Regulates Mammalian Autophagy ». *The Journal of Cell Biology* 191 (1): 155-68. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002100>.
- Di Pucchio, Tiziana, Bithi Chatterjee, Anna Smed-Sørensen, Sandra Clayton, Adam Palazzo, Monica Montes, Yaming Xue, Ira Mellman, Jacques Banchereau, et John E. Connolly. 2008. « Direct Proteasome-Independent Cross-Presentation of Viral Antigen by Plasmacytoid Dendritic Cells on Major Histocompatibility Complex Class I ». *Nature Immunology* 9 (5): 551-57. <https://doi.org/10.1038/ni.1602>.
- Diao, Jiajie, Rong Liu, Yueguang Rong, Minglei Zhao, Jing Zhang, Ying Lai, Qiangjun Zhou, et al. 2015. « ATG14 Promotes Membrane Tethering and Fusion of Autophagosomes to Endolysosomes ». *Nature* 520 (7548): 563-66. <https://doi.org/10.1038/nature14147>.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Aït-Yahia, F. Brière, A. Zlotnik, S. Lebecque, et C. Caux. 1998. « Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (2): 373-86.

- <https://doi.org/10.1084/jem.188.2.373>.
- Dinther, Dieke van, Dorian A. Stolk, Rieneke van de Ven, Yvette van Kooyk, Tanja D. de Gruijl, et Joke M. M. den Haan. 2017. « Targeting C-Type Lectin Receptors: A High-Carbohydrate Diet for Dendritic Cells to Improve Cancer Vaccines ». *Journal of Leukocyte Biology* 102 (4): 1017-34. <https://doi.org/10.1189/jlb.5MR0217-059RR>.
- Dn, Hart, et Fabre Jw. 1981. « Demonstration and Characterization of Ia-Positive Dendritic Cells in the Interstitial Connective Tissues of Rat Heart and Other Tissues, but Not Brain. » *The Journal of Experimental Medicine* 154 (2): 347-61. <https://doi.org/10.1084/jem.154.2.347>.
- Dooley, Hannah C., Minoo Razi, Hannah E. J. Polson, Stephen E. Girardin, Michael I. Wilson, et Sharon A. Tooze. 2014. « WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1 ». *Molecular Cell* 55 (2): 238-52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.021>.
- Dörfel, Daniela, Silke Appel, Frank Grünebach, Markus M. Weck, Martin R. Müller, Annkristin Heine, et Peter Brossart. 2005. « Processing and Presentation of HLA Class I and II Epitopes by Dendritic Cells after Transfection with in Vitro-Transcribed MUC1 RNA ». *Blood* 105 (8): 3199-3205. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3556>.
- Döring, Marius, Hanna Blees, Nicole Koller, Sabine Tischer-Zimmermann, Mathias Müsken, Frederik Henrich, Jennifer Becker, et al. 2019. « Modulation of TAP-dependent antigen compartmentalization during human monocyte-to-DC differentiation ». *Blood Advances* 3 (6): 839-50. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018027268>.
- Dowdle, William E., Beat Nyfeler, Jane Nagel, Robert A. Elling, Shanming Liu, Ellen Triantafellow, Suchithra Menon, et al. 2014. « Selective VPS34 Inhibitor Blocks Autophagy and Uncovers a Role for NCOA4 in Ferritin Degradation and Iron Homeostasis in Vivo ». *Nature Cell Biology* 16 (11): 1069-79. <https://doi.org/10.1038/ncb3053>.
- Dubouloz, Frédérique, Olivier Deloche, Valeria Wanke, Elisabetta Cameroni, et Claudio De Virgilio. 2005. « The TOR and EGO Protein Complexes Orchestrate Microautophagy in Yeast ». *Molecular Cell* 19 (1): 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.05.020>.
- Duerr, Richard H., Kent D. Taylor, Steven R. Brant, John D. Rioux, Mark S. Silverberg, Mark J. Daly, A. Hillary Steinhart, et al. 2006. « A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene ». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5804): 1461-63. <https://doi.org/10.1126/science.1135245>.
- Durcan, Thomas M., Matthew Y. Tang, Joëlle R. Pérusse, Eman A. Dashti, Miguel A. Aguilera, Gian-Luca McLelland, Priti Gros, et al. 2014. « USP8 Regulates Mitophagy by Removing K6-Linked Ubiquitin Conjugates from Parkin ». *The EMBO Journal* 33 (21): 2473-91. <https://doi.org/10.15252/embj.201489729>.
- Dutta, Amit Kumar, et Ashok Chacko. 2016. « Influence of environmental factors on the onset and course of inflammatory bowel disease ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (3): 1088-1100. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1088>.
- Duve, C. de, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, et F. Appelmans. 1955. « Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue ». *Biochemical Journal* 60 (4): 604-17.
- Dzionic, A., A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck, et J. Schmitz. 2000. « BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (11): 6037-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6037>.
- Dzionic, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Günther, et al. 2001. « BDCA-2, a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell-Specific Type II C-Type Lectin, Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon Alpha/Beta Induction ». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (12): 1823-34.

- <https://doi.org/10.1084/jem.194.12.1823>.
- Dzopalic, Tanja, Ivan Rajkovic, Ana Dragicevic, et Miodrag Colic. 2012. « The Response of Human Dendritic Cells to Co-Ligation of Pattern-Recognition Receptors ». *Immunologic Research* 52 (1-2): 20-33. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8279-5>.
- El-Awady, Ahmed R., Brodie Miles, Elizabeth Scisci, Zoya B. Kurago, Chithra D. Palani, Roger M. Arce, Jennifer L. Waller, et al. 2015. « Porphyromonas Gingivalis Evasion of Autophagy and Intracellular Killing by Human Myeloid Dendritic Cells Involves DC-SIGN-TLR2 Crosstalk ». *PLoS Pathogens* 10 (2): e1004647. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004647>.
- El-Zayat, Salwa Refat, Hiba Sibaii, et Fathia A. Manna. 2019. « Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview ». *Bulletin of the National Research Centre* 43 (1): 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>.
- Eskelinen, Eeva-Liisa, Anna Lena Illert, Yoshitaka Tanaka, Günter Schwarzmann, Judith Blanz, Kurt von Figura, et Paul Saftig. 2002. « Role of LAMP-2 in Lysosome Biogenesis and Autophagy ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (9): 3355-68. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0114>.
- Eskelinen, Eeva-Liisa, Christine Katrin Schmidt, Silja Neu, Marion Willenborg, Graciela Fuertes, Natalia Salvador, Yoshitaka Tanaka, et al. 2004. « Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-Deficient Fibroblasts ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (7): 3132-45. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0103>.
- Fader, Claudio Marcelo, Diego Germán Sánchez, María Belén Mestre, et María Isabel Colombo. 2009. « TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/Cellubrevin: Two v-SNARE Proteins Involved in Specific Steps of the Autophagy/Multivesicular Body Pathways ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793 (12): 1901-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.011>.
- Faini, Marco, Rainer Beck, Felix T. Wieland, et John A. G. Briggs. 2013. « Vesicle Coats: Structure, Function, and General Principles of Assembly ». *Trends in Cell Biology* 23 (6): 279-88. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.01.005>.
- Fan, Xiaoli, Ruoting Men, Chen Huang, Mengyi Shen, Tingting Wang, Yasmeen Ghnewa, Yun Ma, Tinghong Ye, et Li Yang. 2020. « Critical Roles of Conventional Dendritic Cells in Autoimmune Hepatitis via Autophagy Regulation ». *Cell Death & Disease* 11 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2217-6>.
- Fekete, Tünde, Dora Bencze, Attila Szabo, Eszter Csoma, Tamas Biro, Attila Bacsi, et Kitti Pazmandi. 2018. « Regulatory NLRs Control the RLR-Mediated Type I Interferon and Inflammatory Responses in Human Dendritic Cells ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02314>.
- Feng, Y., B. Press, et A. Wandinger-Ness. 1995. « Rab 7: An Important Regulator of Late Endocytic Membrane Traffic ». *The Journal of Cell Biology* 131 (6 Pt 1): 1435-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1435>.
- Ferreira, Isabel, Joana Liberal, Joao D. Martins, Ana Silva, Bruno Miguel Neves, et Maria Teresa Cruz. 2017. « Inflammasome in Dendritic Cells Immunobiology: Implications to Diseases and Therapeutic Strategies ». *Current Drug Targets* 18 (9): 1003-18. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160921144830>.
- Figdor, Carl G., Yvette van Kooyk, et Gosse J. Adema. 2002. « C-Type Lectin Receptors on Dendritic Cells and Langerhans Cells ». *Nature Reviews Immunology* 2 (2): 77-84. <https://doi.org/10.1038/nri723>.
- Flacher, Vincent, Marielle Bouschbacher, Estelle Verronèse, Catherine Massacrier, Vanja Sisirak, Odile Berthier-Vergnes, Blandine de Saint-Vis, et al. 2006. « Human Langerhans Cells Express a Specific TLR Profile and Differentially Respond to Viruses and Gram-Positive Bacteria ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (11):

- 7959-67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7959>.
- Florey, Oliver, Sung Eun Kim, Cynthia P. Sandoval, Cole M. Haynes, et Michael Overholtzer. 2011. « Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes ». *Nature Cell Biology* 13 (11): 1335-43. <https://doi.org/10.1038/ncb2363>.
- Franchi, Luigi, Neil Warner, Kyle Viani, et Gabriel Nuñez. 2009. « Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense ». *Immunological reviews* 227 (1): 106-28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x>.
- Franchimont, D., S. Vermeire, H. El Housni, M. Pierik, K. Van Steen, T. Gustot, E. Quertinmont, et al. 2004. « Deficient Host-Bacteria Interactions in Inflammatory Bowel Disease? The Toll-like Receptor (TLR)-4 Asp299gly Polymorphism Is Associated with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis ». *Gut* 53 (7): 987-92. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.030205>.
- Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, et Y. Fujiiyama. 2003. « Increased Expression of Interleukin 17 in Inflammatory Bowel Disease ». *Gut* 52 (1): 65-70. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.65>.
- Fujita, Hideki, Kristine E. Nograles, Toyoko Kikuchi, Juana Gonzalez, John A. Carucci, et James G. Krueger. 2009. « Human Langerhans Cells Induce Distinct IL-22-Producing CD4+ T Cells Lacking IL-17 Production ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51): 21795-800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911472106>.
- « Full Text PDF ». s. d. Consulté le 31 décembre 2020. <https://www.nature.com/articles/cmi20182.pdf>.
- Furio, Laetitia, Isabelle Briotet, Alexandra Journeaux, Hermine Billard, et Josette Péguet-Navarro. 2010. « Human Langerhans Cells Are More Efficient than CD14(-)CD1c(+) Dermal Dendritic Cells at Priming Naive CD4(+) T Cells ». *The Journal of Investigative Dermatology* 130 (5): 1345-54. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.424>.
- Gálvez, Julio. 2014. « Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD ». Review Article. *ISRN Inflammation*. Hindawi. 25 mars 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/928461>.
- Ganguly, Dipyaman, Georgios Chamilos, Roberto Lande, Josh Gregorio, Stephan Meller, Valeria Facchinetti, Bernhard Homey, Franck J. Barrat, Tomasz Zal, et Michel Gilliet. 2009. « Self-RNA-Antimicrobial Peptide Complexes Activate Human Dendritic Cells through TLR7 and TLR8 ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (9): 1983-94. <https://doi.org/10.1084/jem.20090480>.
- Ganley, Ian G., Du H. Lam, Junru Wang, Xiaojun Ding, She Chen, et Xuejun Jiang. 2009. « ULK1.ATG13.FIP200 Complex Mediates MTOR Signaling and Is Essential for Autophagy ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (18): 12297-305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>.
- Gardet, Agnès, Yair Benita, Chun Li, Bruce E. Sands, Isabel Ballester, Christine Stevens, Joshua R. Korzenik, et al. 2010. « LRRK2 Is Involved in the IFN-Gamma Response and Host Response to Pathogens ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (9): 5577-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000548>.
- Gaugel, Anja, Daniela Bakula, Anneliese Hoffmann, et Tassula Proikas-Cezanne. 2012. « Defining Regulatory and Phosphoinositide-Binding Sites in the Human WIPI-1 β -Propeller Responsible for Autophagosomal Membrane Localization Downstream of MTORC1 Inhibition ». *Journal of Molecular Signaling* 7 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-7-16>.
- Gay, Nicholas J., et Monique Gangloff. 2007. « Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands ». *Annual Review of Biochemistry* 76: 141-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318>.
- Ge, Liang, David Melville, Min Zhang, et Randy Schekman. 2013. « The ER-Golgi

- intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis ». Édité par Beth Levine. *eLife* 2 (août): e00947. <https://doi.org/10.7554/eLife.00947>.
- Ge, Liang, Min Zhang, et Randy Schekman. 2014. « Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment ». Édité par Noboru Mizushima. *eLife* 3 (novembre): e04135. <https://doi.org/10.7554/eLife.04135>.
- Geginat, Jens, Giulia Nizzoli, Moira Paroni, Stefano Maglie, Paola Larghi, Steve Pascolo, et Sergio Abrignani. 2015. « Immunity to Pathogens Taught by Specialized Human Dendritic Cell Subsets ». *Frontiers in Immunology* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00527>.
- Geijtenbeek, Teunis B. H., et Sonja I. Gringhuis. 2009. « Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses ». *Nature Reviews Immunology* 9 (7): 465-79. <https://doi.org/10.1038/nri2569>.
- Geissmann, F., M.C. Dieu-Nosjean, C. Dezutter, J. Valladeau, S. Kayal, M. Leborgne, N. Brousse, S. Saeland, et J. Davoust. 2002. « Accumulation of Immature Langerhans Cells in Human Lymph Nodes Draining Chronically Inflamed Skin ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (4): 417-30. <https://doi.org/10.1084/jem.20020018>.
- Ghislat, Ghita, et Toby Lawrence. 2018. « Autophagy in Dendritic Cells ». *Cellular & Molecular Immunology* 15 (11): 944-52. <https://doi.org/10.1038/cmi.2018.2>.
- Gilliet, Michel, et Yong-Jun Liu. 2002. « Generation of Human CD8 T Regulatory Cells by CD40 Ligand-Activated Plasmacytoid Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (6): 695-704. <https://doi.org/10.1084/jem.20011603>.
- Glasser, A. L., J. Boudeau, N. Barnich, M. H. Perruchot, J. F. Colombel, et A. Darfeuille-Michaud. 2001. « Adherent Invasive Escherichia Coli Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death ». *Infection and Immunity* 69 (9): 5529-37. <https://doi.org/10.1128/iai.69.9.5529-5537.2001>.
- Glocker, Erik-Oliver, Daniel Kotlarz, Kaan Boztug, E. Michael Gertz, Alejandro A. Schäffer, Fatih Noyan, Mario Perro, et al. 2009. « Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor ». *The New England Journal of Medicine* 361 (21): 2033-45. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907206>.
- Grégoire, Isabel Pombo, Clémence Richetta, Laurène Meyniel-Schicklin, Sophie Borel, Fabrine Pradezynski, Olivier Diaz, Alexandre Deloire, et al. 2011. « IRGM Is a Common Target of RNA Viruses That Subvert the Autophagy Network ». *PLOS Pathogens* 7 (12): e1002422. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002422>.
- Grouard, Géraldine, Marie-Clotilde Risoan, Luis Filgueira, Isabelle Durand, Jacques Banchereau, et Yong-Jun Liu. 1997. « The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand ». *The Journal of Experimental Medicine* 185 (6): 1101-12.
- Groves, E., A. E. Dart, V. Covarelli, et E. Caron. 2008. « Molecular Mechanisms of Phagocytic Uptake in Mammalian Cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (13): 1957-76. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7578-4>.
- Guglani, Lokesh, et Shabaana A. Khader. 2010. « Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation ». *Current opinion in HIV and AIDS* 5 (2): 120-27. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328335c2f6>.
- Gutierrez, Maximiliano G., Daniela B. Munafó, Walter Berón, et María I. Colombo. 2004. « Rab7 Is Required for the Normal Progression of the Autophagic Pathway in Mammalian Cells ». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 13): 2687-97. <https://doi.org/10.1242/jcs.01114>.
- Hailey, Dale W., Angelika S. Rambold, Prasanna Satpute-Krishnan, Kasturi Mitra, Rachid

- Sougrat, Peter K. Kim, et Jennifer Lippincott-Schwartz. 2010. « Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation ». *Cell* 141 (4): 656-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.009>.
- Halfvarson, Jonas, Lennart Bodin, Curt Tysk, Eva Lindberg, et Gunnar Järnerot. 2003. « Inflammatory Bowel Disease in a Swedish Twin Cohort: A Long-Term Follow-up of Concordance and Clinical Characteristics ». *Gastroenterology* 124 (7): 1767-73. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00385-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00385-8).
- Hamasaki, Maho, Nobunichi Furuta, Atsushi Matsuda, Akiko Nezu, Akitsugu Yamamoto, Naonobu Fujita, Hiroko Oomori, et al. 2013. « Autophagosomes Form at ER-Mitochondria Contact Sites ». *Nature* 495 (7441): 389-93. <https://doi.org/10.1038/nature11910>.
- Hampe, Jochen, Andre Franke, Philip Rosenstiel, Andreas Till, Markus Teuber, Klaus Huse, Mario Albrecht, et al. 2007. « A Genome-Wide Association Scan of Nonsynonymous SNPs Identifies a Susceptibility Variant for Crohn Disease in ATG16L1 ». *Nature Genetics* 39 (2): 207-11. <https://doi.org/10.1038/ng1954>.
- Haniffa, Muzlifah, Florent Ginhoux, Xiao-Nong Wang, Venetia Bigley, Michal Abel, Ian Dimmick, Sarah Bullock, et al. 2009. « Differential Rates of Replacement of Human Dermal Dendritic Cells and Macrophages during Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (2): 371-85. <https://doi.org/10.1084/jem.20081633>.
- Haniffa, Muzlifah, Amanda Shin, Venetia Bigley, Naomi McGovern, Pearline Teo, Peter See, Pavandip Singh Wasan, et al. 2012. « Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells ». *Immunity* 37 (1): 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.012>.
- Hänsel, Anja, Claudia Günther, Jens Ingwersen, Josephine Starke, Marc Schmitz, Michael Bachmann, Michael Meurer, Ernst Peter Rieber, et Knut Schäkel. 2011. « Human Slan (6-Sulfo LacNAc) Dendritic Cells Are Inflammatory Dermal Dendritic Cells in Psoriasis and Drive Strong TH17/TH1 T-Cell Responses ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (3): 787-794.e1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.009>.
- Hara, Taichi, Akito Takamura, Chieko Kishi, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Jun-Lin Guan, et Noboru Mizushima. 2008. « FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells ». *The Journal of Cell Biology* 181 (3): 497-510. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712064>.
- Harris, Greg, Rhonda KuoLee, et Wangxue Chen. 2006. « Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract ». *World Journal of Gastroenterology: WJG* 12 (14): 2149-60. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i14.2149>.
- Hart, Ailsa L., Hafid Omar Al-Hassi, Rachael J. Rigby, Sally J. Bell, Anton V. Emmanuel, Stella C. Knight, Michael A. Kamm, et Andrew J. Stagg. 2005. « Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases ». *Gastroenterology* 129 (1): 50-65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>.
- Haspel, Jeffrey, Rahamthulla S Shaik, Emeka Ifedigbo, Kiichi Nakahira, Tamas Dolinay, Joshua A Englert, et Augustine M K Choi. 2011. « Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay ». *Autophagy* 7 (6): 629-42. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15100>.
- Heath, William R., et Francis R. Carbone. 2001. « Cross-Presentation in Viral Immunity and Self-Tolerance ». *Nature Reviews Immunology* 1 (2): 126-34. <https://doi.org/10.1038/35100512>.
- Heesters, Balthasar A., Priyadarshini Chatterjee, Young-A. Kim, Santiago F. Gonzalez, Michael P. Kuligowski, Tomas Kirchhausen, et Michael C. Carroll. 2013. « Endocytosis and Recycling of Immune Complexes by Follicular Dendritic Cells Enhances B Cell

- Antigen Binding and Activation ». *Immunity* 38 (6): 1164-75.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.023>.
- Hémont, Caroline, Antoine Neel, Michèle Heslan, Cécile Braudeau, et Régis Josien. 2013. « Human Blood MDC Subsets Exhibit Distinct TLR Repertoire and Responsiveness ». *Journal of Leukocyte Biology* 93 (4): 599-609. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912452>.
- Henault, Jill, Jennifer Martinez, Jeffrey M. Riggs, Jane Tian, Payal Mehta, Lorraine Clarke, Miwa Sasai, et al. 2012. « Noncanonical Autophagy Is Required for Type I Interferon Secretion in Response to DNA-Immune Complexes ». *Immunity* 37 (6): 986-97.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.014>.
- Henckaerts, Liesbet, Isabelle Cleynen, Marko Brinar, Jestinah Mahachie John, Kristel Van Steen, Paul Rutgeerts, et Séverine Vermeire. 2011. « Genetic Variation in the Autophagy Gene ULK1 and Risk of Crohn's Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 17 (6): 1392-97. <https://doi.org/10.1002/ibd.21486>.
- Henderson, R. A., S. C. Watkins, et J. L. Flynn. 1997. « Activation of Human Dendritic Cells Following Infection with Mycobacterium Tuberculosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (2): 635-43.
- Henkart, P. A. 1994. « Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity: Two Pathways and Multiple Effector Molecules ». *Immunity* 1 (5): 343-46. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90063-9](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90063-9).
- Heo, Jin-Mi, Alban Ordureau, Joao A. Paulo, Jesse Rinehart, et J. Wade Harper. 2015. « The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy ». *Molecular Cell* 60 (1): 7-20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.016>.
- Hertoghs, Nina, Angelic M. G. van der Aar, Laurentia C. Setiawan, Neeltje A. Kootstra, Sonja I. Gringhuis, et Teunis B. H. Geijtenbeek. 2015. « SAMHD1 Degradation Enhances Active Suppression of Dendritic Cell Maturation by HIV-1 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (9): 4431-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403016>.
- Heuzé, Mélina L., Pablo Vargas, Mélanie Chabaud, Maël Le Berre, Yan-Jun Liu, Olivier Collin, Paola Solanes, Raphaël Voituriez, Matthieu Piel, et Ana-Maria Lennon-Duménil. 2013. « Migration of Dendritic Cells: Physical Principles, Molecular Mechanisms, and Functional Implications ». *Immunological Reviews* 256 (1): 240-54.
<https://doi.org/10.1111/imr.12108>.
- Hilligan, Kerry L., et Franca Ronchese. 2020. « Antigen Presentation by Dendritic Cells and Their Instruction of CD4+ T Helper Cell Responses ». *Cellular & Molecular Immunology* 17 (6): 587-99. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0465-0>.
- Homer, Craig R., Amy L. Richmond, Nancy A. Rebert, Jean-Paul Achkar, et Christine McDonald. 2010. « ATG16L1 and NOD2 Interact in an Autophagy-Dependent Antibacterial Pathway Implicated in Crohn's Disease Pathogenesis ». *Gastroenterology* 139 (5): 1630-41, 1641.e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.006>.
- Hosokawa, Nao, Taichi Hara, Takeshi Kaizuka, Chieko Kishi, Akito Takamura, Yutaka Miura, Shun-ichiro Iemura, et al. 2009. « Nutrient-Dependent MTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (7): 1981-91. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>.
- Hoving, J. Claire, Gillian J. Wilson, et Gordon D. Brown. 2014. « Signalling C-Type Lectin Receptors, Microbial Recognition and Immunity ». *Cellular Microbiology* 16 (2): 185-94. <https://doi.org/10.1111/cmi.12249>.
- Huang, Hailiang, Ming Fang, Luke Jostins, Maša Umičević Mirkov, Gabrielle Boucher, Carl A. Anderson, Vibeke Andersen, et al. 2017. « Fine-Mapping Inflammatory Bowel Disease Loci to Single-Variant Resolution ». *Nature* 547 (7662): 173-78.
<https://doi.org/10.1038/nature22969>.

- Hubo, Mario, Bettina Trinschek, Fanny Kryczanowsky, Andrea Tuettenberg, Kerstin Steinbrink, et Helmut Jonuleit. 2013. « Costimulatory Molecules on Immunogenic Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells ». *Frontiers in Immunology* 4 (avril). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00082>.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, et al. 2001. « Association of NOD2 Leucine-Rich Repeat Variants with Susceptibility to Crohn's Disease ». *Nature* 411 (6837): 599-603. <https://doi.org/10.1038/35079107>.
- Hulpke, Sabine, et Robert Tampé. 2013. « The MHC I Loading Complex: A Multitasking Machinery in Adaptive Immunity ». *Trends in Biochemical Sciences* 38 (8): 412-20. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.06.003>.
- Huttenhower, Curtis, Aleksandar D. Kostic, et Ramnik J. Xavier. 2014. « Inflammatory Bowel Disease as a Model for Translating the Microbiome ». *Immunity* 40 (6): 843-54. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.013>.
- Huysamen, Cristal, Janet A. Willment, Kevin M. Dennehy, et Gordon D. Brown. 2008. « CLEC9A Is a Novel Activation C-type Lectin-like Receptor Expressed on BDCA3+ Dendritic Cells and a Subset of Monocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (24): 16693-701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709923200>.
- Iida, Tomoya, Kei Onodera, et Hiroshi Nakase. 2017. « Role of autophagy in the pathogenesis of inflammatory bowel disease ». *World Journal of Gastroenterology* 23 (11): 1944-53. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i11.1944>.
- Itakura, Eisuke, Chieko Kishi, Kinji Inoue, et Noboru Mizushima. 2008. « Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (12): 5360-72. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0080>.
- Itakura, Eisuke, Chieko Kishi-Itakura, et Noboru Mizushima. 2012. « The Hairpin-Type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes ». *Cell* 151 (6): 1256-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>.
- Ito, Tomoki, Maria Yang, Yui-Hsi Wang, Roberto Lande, Josh Gregorio, Olivia A Perng, Xiao-Feng Qin, Yong-Jun Liu, et Michel Gilliet. 2007. « Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (1): 105-15. <https://doi.org/10.1084/jem.20061660>.
- Jacquin, Elise, Stéphanie Leclerc-Mercier, Celine Judon, Emmanuelle Blanchard, Sylvie Fraitag, et Oliver Florey. 2017. « Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway driving unconventional LC3 lipidation ». *Autophagy* 13 (5): 854-67. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1287653>.
- Jäger, Stefanie, Cecilia Bucci, Isei Tanida, Takashi Ueno, Eiki Kominami, Paul Saftig, et Eeva-Liisa Eskelinen. 2004. « Role for Rab7 in Maturation of Late Autophagic Vacuoles ». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 20): 4837-48. <https://doi.org/10.1242/jcs.01370>.
- Jiang, Peidu, Taki Nishimura, Yuriko Sakamaki, Eisuke Itakura, Tomohisa Hatta, Tohru Natsume, et Noboru Mizushima. 2014. « The HOPS Complex Mediates Autophagosome-Lysosome Fusion through Interaction with Syntaxin 17 ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (8): 1327-37. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0447>.
- Jiang, Xiao, Xinyi Wang, Xianming Ding, Mengjie Du, Boran Li, Xialian Weng, Jingzi Zhang, et al. 2020. « FAM134B Oligomerization Drives Endoplasmic Reticulum Membrane Scission for ER-Phagy ». *The EMBO Journal* 39 (5): e102608. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102608>.
- Joffre, Olivier P., Elodie Segura, Ariel Savina, et Sebastian Amigorena. 2012. « Cross-Presentation by Dendritic Cells ». *Nature Reviews Immunology* 12 (8): 557-69. <https://doi.org/10.1038/nri3254>.

- Jongbloed, Sarah L., Andrew J. Kassianos, Kylie J. McDonald, Georgina J. Clark, Xinsheng Ju, Catherine E. Angel, Chun-Jen J. Chen, et al. 2010. « Human CD141+ (BDCA-3)+ Dendritic Cells (DCs) Represent a Unique Myeloid DC Subset That Cross-Presents Necrotic Cell Antigens ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1247-60. <https://doi.org/10.1084/jem.20092140>.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, et A. H. Enk. 2000. « Induction of Interleukin 10-Producing, Nonproliferating CD4(+) T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (9): 1213-22. <https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1213>.
- Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts, et J. Neefjes. 2001. « The Rab7 Effector Protein RILP Controls Lysosomal Transport by Inducing the Recruitment of Dynein-Dynactin Motors ». *Current Biology: CB* 11 (21): 1680-85. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00531-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00531-0).
- Josefowicz, Steven Z., Li-Fan Lu, et Alexander Y. Rudensky. 2012. « Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function ». *Annual Review of Immunology* 30: 531-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>.
- Julien, Louis-André, et Philippe P. Roux. 2010. « mTOR, la cible fonctionnelle de la rapamycine ». *médecine/sciences* 26 (12): 1056-60. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026121056>.
- Jung, Chang Hwa, Chang Bong Jun, Seung-Hyun Ro, Young-Mi Kim, Neil Michael Otto, Jing Cao, Mondira Kundu, et Do-Hyung Kim. 2009. « ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate MTOR Signaling to the Autophagy Machinery ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (7): 1992-2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2000. « LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosomal Membranes after Processing ». *The EMBO Journal* 19 (21): 5720-28. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>.
- Kabeya, Yukiko, Noboru Mizushima, Akitsugu Yamamoto, Satsuki Oshitani-Okamoto, Yoshinori Ohsumi, et Tamotsu Yoshimori. 2004. « LC3, GABARAP and GATE16 Localize to Autophagosomal Membrane Depending on Form-II Formation ». *Journal of Cell Science* 117 (13): 2805-12. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>.
- Kadowaki, Norimitsu. 2007. « Dendritic Cells—A Conductor of T Cell Differentiation— ». *Allergology International* 56 (3): 193-99. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-07-146>.
- Kapsenberg, Martien L. 2003. « Dendritic-Cell Control of Pathogen-Driven T-Cell Polarization ». *Nature Reviews Immunology* 3 (12): 984-93. <https://doi.org/10.1038/nri1246>.
- Kast, David J., et Roberto Dominguez. 2017. « The Cytoskeleton-Autophagy Connection ». *Current Biology: CB* 27 (8): R318-26. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.061>.
- Kawai, T., et S. Akira. 2006. « TLR Signaling ». *Cell Death & Differentiation* 13 (5): 816-25. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2009. « The Roles of TLRs, RLRs and NLRs in Pathogen Recognition ». *International Immunology* 21 (4): 317-37. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017>.
- . 2010. « The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors ». *Nature Immunology* 11 (5): 373-84. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- Kawai, Taro, Shintaro Sato, Ken J. Ishii, Cevayir Coban, Hiroaki Hemmi, Masahiro Yamamoto, Kenta Terai, et al. 2004. « Interferon- α Induction through Toll-like Receptors Involves a Direct Interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6 ». *Nature Immunology* 5 (10): 1061-68. <https://doi.org/10.1038/ni1118>.
- Kawai, Taro, Ken Takahashi, Shintaro Sato, Cevayir Coban, Himanshu Kumar, Hiroki Kato,

- Ken J. Ishii, Osamu Takeuchi, et Shizuo Akira. 2005. « IPS-1, an Adaptor Triggering RIG-I- and Mda5-Mediated Type I Interferon Induction ». *Nature Immunology* 6 (10): 981-88. <https://doi.org/10.1038/ni1243>.
- Kehl, Stephanie R., Brandy-Lee A. Soos, Bhaskar Saha, Seong Won Choi, Anthony W. Herren, Terje Johansen, et Michael A. Mandell. 2019. « TAK1 Converts Sequestosome 1/P62 from an Autophagy Receptor to a Signaling Platform ». *EMBO Reports* 20 (9): e46238. <https://doi.org/10.15252/embr.201846238>.
- Keir, Mary E., Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, et Arlene H. Sharpe. 2008. « PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity ». *Annual Review of Immunology* 26: 677-704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>.
- Khaminets, Aliaksandr, Theresa Heinrich, Muriel Mari, Paolo Grumati, Antje K. Huebner, Masato Akutsu, Lutz Liebmann, et al. 2015. « Regulation of Endoplasmic Reticulum Turnover by Selective Autophagy ». *Nature* 522 (7556): 354-58. <https://doi.org/10.1038/nature14498>.
- Kim, Joungmok, Mondira Kundu, Benoit Viollet, et Kun-Liang Guan. 2011. « AMPK and MTOR Regulate Autophagy through Direct Phosphorylation of Ulk1 ». *Nature Cell Biology* 13 (2): 132-41. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>.
- Kim, Young-Mi, Chang Hwa Jung, Minchul Seo, Eun Kyoung Kim, Ji-Man Park, Sun Sik Bae, et Do-Hyung Kim. 2015. « MTORC1 Phosphorylates UVRAG to Negatively Regulate Autophagosome and Endosome Maturation ». *Molecular Cell* 57 (2): 207-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.013>.
- Kirkin, Vladimir, Trond Lamark, Yu-Shin Sou, Geir Bjørkøy, Jennifer L. Nunn, Jack-Ansgar Bruun, Elena Shvets, et al. 2009. « A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates ». *Molecular Cell* 33 (4): 505-16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.020>.
- Klechevsky, Eynav, Rimpei Morita, Maochang Liu, Yanying Cao, Sebastien Coquery, LuAnn Thompson-Snipes, Francine Briere, et al. 2008. « Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells ». *Immunity* 29 (3): 497-510. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.013>.
- Kleijmeer, M., G. Ramm, D. Schuurhuis, J. Griffith, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Y. Rudensky, et al. 2001. « Reorganization of Multivesicular Bodies Regulates MHC Class II Antigen Presentation by Dendritic Cells ». *The Journal of Cell Biology* 155 (1): 53-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200103071>.
- Klionsky, Daniel J, Kotb Abdelmohsen, Akihisa Abe, Md Joynal Abedin, Hagai Abeliovich, Abraham Acevedo Arozena, Hiroaki Adachi, et al. 2016. « Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) ». *Autophagy* 12 (1): 1-222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>.
- Knoop, Kathryn A., et Rodney D. Newberry. 2018. « Goblet Cells: Multifaceted Players in Immunity at Mucosal Surfaces ». *Mucosal Immunology* 11 (6): 1551-57. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0039-y>.
- Knorr, Roland L, Reinhard Lipowsky, et Rumiana Dimova. 2015. « Autophagosome closure requires membrane scission ». *Autophagy* 11 (11): 2134-37. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091552>.
- Köchli, Robert, Xiao Wen Hu, Edmond Y. W. Chan, et Sharon A. Tooze. 2006. « Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7 (2): 129-45. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x>.
- Kondylis, Vangelis, Hezder E. van Nispen tot Panneerden, Suzanne van Dijk, Toine ten Broeke, Richard Wubbolts, Willie J. Geerts, Cor Seinen, Tuna Mutis, et Harry F.G. Heijnen. 2013. « Endosome-mediated autophagy ». *Autophagy* 9 (6): 861-80. <https://doi.org/10.4161/auto.24111>.

- Kondylis, Vangelis, Hezder E. van Nispen Tot Panterden, Suzanne van Dijk, Toine Ten Broeke, Richard Wubbolts, Willie J. Geerts, Cor Seinen, Tuna Mutis, et Harry F. G. Heijnen. 2013. « Endosome-Mediated Autophagy: An Unconventional MIIC-Driven Autophagic Pathway Operational in Dendritic Cells ». *Autophagy* 9 (6): 861-80. <https://doi.org/10.4161/auto.24111>.
- Koopmann, J. O., M. Post, J. J. Neefjes, G. J. Hämmerling, et F. Momburg. 1996. « Translocation of Long Peptides by Transporters Associated with Antigen Processing (TAP) ». *European Journal of Immunology* 26 (8): 1720-28. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260809>.
- Krawczyk, Connie M., Thomas Holowka, Jie Sun, Julianna Blagih, Eyal Amiel, Ralph J. DeBerardinis, Justin R. Cross, et al. 2010. « Toll-like Receptor-Induced Changes in Glycolytic Metabolism Regulate Dendritic Cell Activation ». *Blood* 115 (23): 4742-49. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-249540>.
- Kroczek, Richard A., et Volker Henn. 2012. « The Role of XCR1 and its Ligand XCL1 in Antigen Cross-Presentation by Murine and Human Dendritic Cells ». *Frontiers in Immunology* 3 (février). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00014>.
- Kuballa, Petric, Alan Huett, John D. Rioux, Mark J. Daly, et Rannik J. Xavier. 2008. « Impaired Autophagy of an Intracellular Pathogen Induced by a Crohn's Disease Associated ATG16L1 Variant ». *PLoS One* 3 (10): e3391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003391>.
- Kumar, Himanshu, Taro Kawai, et Shizuo Akira. 2011. « Pathogen Recognition by the Innate Immune System ». *International Reviews of Immunology* 30 (1): 16-34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>.
- Kushwah, Rahul, et Jim Hu. 2011. « Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells ». *Cell & Bioscience* 1 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-1-20>.
- Laar, Lianne van de, Aniek van den Bosch, Sandra W. van der Kooij, Harry L. A. Janssen, Paul J. Coffey, Cees van Kooten, et Andrea M. Woltman. 2010. « A Nonredundant Role for Canonical NF- κ B in Human Myeloid Dendritic Cell Development and Function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (12): 7252-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000672>.
- Land, Walter Gottlieb. 2018. « Antigen Uptake, Processing, and Presentation by Dendritic Cells ». In *Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Volume 1: Injury-Induced Innate Immune Responses*, édité par Walter Gottlieb Land, 723-48. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78655-1_31.
- Lange, Katrina M. de, Loukas Moutsianas, James C. Lee, Christopher A. Lamb, Yang Luo, Nicholas A. Kennedy, Luke Jostins, et al. 2017. « Genome-Wide Association Study Implicates Immune Activation of Multiple Integrin Genes in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Genetics* 49 (2): 256-61. <https://doi.org/10.1038/ng.3760>.
- Lanzavecchia, A., et F. Sallusto. 2001. « The Instructive Role of Dendritic Cells on T Cell Responses: Lineages, Plasticity and Kinetics ». *Current Opinion in Immunology* 13 (3): 291-98. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00218-1](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00218-1).
- Lapaquette, Pierre, Marie-Agnès Bringer, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2012. « Defects in Autophagy Favour Adherent-Invasive Escherichia Coli Persistence within Macrophages Leading to Increased pro-Inflammatory Response ». *Cellular Microbiology* 14 (6): 791-807. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01768.x>.
- Lapaquette, Pierre, Anne-Lise Glasser, Alan Huett, Rannik J. Xavier, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2010. « Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive E. Coli Are Selectively Favoured by Impaired Autophagy to Replicate Intracellularly ». *Cellular Microbiology* 12 (1): 99-113. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01381.x>.
- Larabi, Anaïs, Nicolas Barnich, et Hang Thi Thu Nguyen. 2020. « New Insights into the

- Interplay between Autophagy, Gut Microbiota and Inflammatory Responses in IBD ». *Autophagy* 16 (1): 38-51. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1635384>.
- Larabi, Anaïs, Guillaume Dalmasso, Julien Delmas, Nicolas Barnich, et Hang Thi Thu Nguyen. 2020. « Exosomes Transfer MiRNAs from Cell-to-Cell to Inhibit Autophagy during Infection with Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive E. Coli ». *Gut Microbes* 11 (6): 1677-94. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1771985>.
- Lassen, Kara G., Petric Kuballa, Kara L. Conway, Khushbu K. Patel, Christine E. Becker, Joanna M. Peloquin, Eduardo J. Villablanca, et al. 2014. « Atg16L1 T300A Variant Decreases Selective Autophagy Resulting in Altered Cytokine Signaling and Decreased Antibacterial Defense ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (21): 7741-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407001111>.
- Laukoetter, Mike G., Matthias Bruewer, et Asma Nusrat. 2006. « Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier by the Apical Junctional Complex ». *Current Opinion in Gastroenterology* 22 (2): 85-89. <https://doi.org/10.1097/01.mog.0000203864.48255.4f>.
- Lavoie, Sydney, Kara L. Conway, Kara G. Lassen, Humberto B. Jijon, Hui Pan, Eunyoung Chun, Monia Michaud, et al. 2019. « The Crohn's Disease Polymorphism, ATG16L1 T300A, Alters the Gut Microbiota and Enhances the Local Th1/Th17 Response ». *ELife* 8 (janvier). <https://doi.org/10.7554/eLife.39982>.
- Lawrence, Toby. 2009. « The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
- Lazarou, Michael, Danielle A. Sliter, Lesley A. Kane, Shireen A. Sarraf, Chunxin Wang, Jonathon L. Burman, Dionisia P. Sideris, Adam I. Fogel, et Richard J. Youle. 2015. « The Ubiquitin Kinase PINK1 Recruits Autophagy Receptors to Induce Mitophagy ». *Nature* 524 (7565): 309-14. <https://doi.org/10.1038/nature14893>.
- Leal, Marcelo Cerf, et Jan Däbritz. 2015. « Immunoregulatory Role of Myeloid-Derived Cells in Inflammatory Bowel Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (12): 2936-47. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000511>.
- Leal Rojas, Ingrid M., Wai-Hong Mok, Frances E. Pearson, Yoshihito Minoda, Tony J. Kenna, Ross T. Barnard, et Kristen J. Radford. 2017. « Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Promote Th1 and Th17 Effector Function in Memory CD4+ T Cells ». *Frontiers in Immunology* 8 (août). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00971>.
- Lee, Jong Woo, Sungman Park, Yoshinori Takahashi, et Hong-Gang Wang. 2010. « The Association of AMPK with ULK1 Regulates Autophagy ». *PLoS One* 5 (11): e15394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015394>.
- Lees, C. W., J. C. Barrett, M. Parkes, et J. Satsangi. 2011. « New IBD Genetics: Common Pathways with Other Diseases ». *Gut* 60 (12): 1739-53. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.199679>.
- Lelouard, Hugues, Vincent Ferrand, Didier Marguet, Jacek Bania, Voahirana Camosseto, Alexandre David, Evelina Gatti, et Philippe Pierre. 2004. « Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins ». *The Journal of Cell Biology* 164 (5): 667-75. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312073>.
- Lelouard, Hugues, Evelina Gatti, Fanny Cappello, Olivia Gresser, Voahirana Camosseto, et Philippe Pierre. 2002. « Transient Aggregation of Ubiquitinated Proteins during Dendritic Cell Maturation ». *Nature* 417 (6885): 177-82. <https://doi.org/10.1038/417177a>.
- Lemoine, Roxane, Florence Velge-Roussel, Florence Herr, Romain Felix, Hubert Nivet, Yvon Lebranchu, et Christophe Baron. 2010. « Interferon Gamma Licensing of Human Dendritic Cells in T-Helper-Independent CD8+ Alloimmunity ». *Blood* 116 (16): 3089-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-268623>.
- León, Beatriz, María López-Bravo, et Carlos Ardavín. 2005. « Monocyte-Derived Dendritic

- Cells ». *Seminars in Immunology* 17 (4): 313-18.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.05.013>.
- . 2007. « Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania* ». *Immunity* 26 (4): 519-31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.017>.
- Levin, Alon D., Pim J. Koelink, Felicia M. Bloemendaal, Anne Christine W. Vos, Geert R. D'Haens, Gijs R. van den Brink, et Manon E. Wildenberg. 2016. « Autophagy Contributes to the Induction of Anti-TNF Induced Macrophages ». *Journal of Crohn's & Colitis* 10 (3): 323-29. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv174>.
- Li, B., R. Alli, P. Vogel, et T. L. Geiger. 2014. « IL-10 Modulates DSS-Induced Colitis through a Macrophage-ROS-NO Axis ». *Mucosal Immunology* 7 (4): 869-78.
<https://doi.org/10.1038/mi.2013.103>.
- Li, D.-D., L.-L. Wang, R. Deng, J. Tang, Y. Shen, J.-F. Guo, Y. Wang, et al. 2009. « The Pivotal Role of C-Jun NH2-Terminal Kinase-Mediated Beclin 1 Expression during Anticancer Agents-Induced Autophagy in Cancer Cells ». *Oncogene* 28 (6): 886-98.
<https://doi.org/10.1038/onc.2008.441>.
- Li, Ming O., et Richard A. Flavell. 2008. « Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor-Beta and Interleukin-10 ». *Immunity* 28 (4): 468-76.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.003>.
- Li, Wenming, Jinqiu Zhu, Juan Dou, Hua She, Kai Tao, Haidong Xu, Qian Yang, et Zixu Mao. 2017. « Phosphorylation of LAMP2A by P38 MAPK Couples ER Stress to Chaperone-Mediated Autophagy ». *Nature Communications* 8 (1): 1763.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01609-x>.
- Li, Wen-wen, Jian Li, et Jin-ku Bao. 2012. « Microautophagy: Lesser-Known Self-Eating ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (7): 1125-36.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>.
- Liang, Chengyu, Jong-soo Lee, Kyung-soo Inn, Michaela U. Gack, Qinglin Li, Esteban A. Roberts, Isabelle Vergne, et al. 2008. « Beclin1-Binding UVRAG Targets the Class C Vps Complex to Coordinate Autophagosome Maturation and Endocytic Trafficking ». *Nature Cell Biology* 10 (7): 776-87. <https://doi.org/10.1038/ncb1740>.
- Lim, Jet Phey, et Paul A. Gleeson. 2011. « Macropinocytosis: An Endocytic Pathway for Internalising Large Gulps ». *Immunology and Cell Biology* 89 (8): 836-43.
<https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>.
- Lin, Mary G., et James H. Hurley. 2016. « Structure and Function of the ULK1 Complex in Autophagy ». *Current Opinion in Cell Biology* 39 (avril): 61-68.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.02.010>.
- Ling, Jianhua, Ya'an Kang, Ruiying Zhao, Qianghua Xia, Dung-Fang Lee, Zhe Chang, Jin Li, et al. 2012. « KrasG12D-Induced IKK2/ β /NF-KB Activation by IL-1 α and P62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Cancer Cell* 21 (1): 105-20.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.006>.
- Liu, Chin-Chih, Yu-Ching Lin, Yu-Hsuan Chen, Chun-Ming Chen, Liang-Yu Pang, Hsuan-An Chen, Pei-Rung Wu, et al. 2016. « Cul3-KLHL20 Ubiquitin Ligase Governs the Turnover of ULK1 and VPS34 Complexes to Control Autophagy Termination ». *Molecular Cell* 61 (1): 84-97. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.001>.
- Liu, Elizabeth, Jennifer Van Grol, et Carlos S. Subauste. 2015. « Atg5 but Not Atg7 in Dendritic Cells Enhances IL-2 and IFN- γ Production by *Toxoplasma Gondii*-Reactive CD4⁺ T Cells ». *Microbes and Infection* 17 (4): 275-84.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.008>.
- Liu, Junli, Hongguang Xia, Minsu Kim, Lihua Xu, Ying Li, Lihong Zhang, Yu Cai, et al. 2011.

- « Beclin1 Controls the Levels of P53 by Regulating the Deubiquitination Activity of USP10 and USP13 ». *Cell* 147 (1): 223-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.037>.
- Liu, Lei, Du Feng, Guo Chen, Ming Chen, Qiaoxia Zheng, Pingping Song, Qi Ma, et al. 2012. « Mitochondrial Outer-Membrane Protein FUNDC1 Mediates Hypoxia-Induced Mitophagy in Mammalian Cells ». *Nature Cell Biology* 14 (2): 177-85. <https://doi.org/10.1038/ncb2422>.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, et Shao-Cong Sun. 2017. « NF- κ B Signaling in Inflammation ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- Liu, Wei Jing, Lin Ye, Wei Fang Huang, Lin Jie Guo, Zi Gan Xu, Hong Luan Wu, Chen Yang, et Hua Feng Liu. 2016b. « p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation ». *Cellular & Molecular Biology Letters* 21 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0031-z>.
- Liu, Zhenzhen, et Paul A. Roche. 2015. « Macropinocytosis in Phagocytes: Regulation of MHC Class-II-Restricted Antigen Presentation in Dendritic Cells ». *Frontiers in Physiology* 6: 1. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00001>.
- Liu, Zhihua, Jinwoo Lee, Scott Krummey, Wei Lu, Huaibin Cai, et Michael J. Lenardo. 2011b. « Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) regulates inflammatory bowel disease through the Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) ». *Nature immunology* 12 (11): 1063-70. <https://doi.org/10.1038/ni.2113>.
- Loo, Yueh-Ming, et Michael Gale. 2011. « Immune Signaling by RIG-I-like Receptors ». *Immunity* 34 (5): 680-92. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>.
- Loos, Ben, André du Toit, et Jan-Hendrik S Hofmeyr. 2014. « Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality ». *Autophagy* 10 (11): 2087-96. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.973338>.
- Lu, Jiahong, Liqiang He, Christian Behrends, Masatake Araki, Kimi Araki, Qing Jun Wang, Joseph M. Catanzaro, et al. 2014. « NRBF2 Regulates Autophagy and Prevents Liver Injury by Modulating Atg14L-Linked Phosphatidylinositol-3 Kinase III Activity ». *Nature Communications* 5 (1): 3920. <https://doi.org/10.1038/ncomms4920>.
- Lundberg, Kristina, Frida Rydnert, Lennart Greiff, et Malin Lindstedt. 2014. « Human Blood Dendritic Cell Subsets Exhibit Discriminative Pattern Recognition Receptor Profiles ». *Immunology* 142 (2): 279-88. <https://doi.org/10.1111/imm.12252>.
- Ma, Daphne Y., et Edward A. Clark. 2009. « The role of CD40 and CD40L in Dendritic Cells ». *Seminars in immunology* 21 (5): 265-72. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.010>.
- Ma, Xi, Shen Zhang, Long He, Yueguang Rong, Livia Wilz Brier, Qiming Sun, Rong Liu, et al. 2017. « mTORC1-Mediated NRBF2 Phosphorylation Functions as a Switch for the Class III PtdIns3K and Autophagy ». *Autophagy* 13 (3): 592-607. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1269988>.
- MacDonald, Kelli P. A., David J. Munster, Georgina J. Clark, Andrzej Dzionek, Juergen Schmitz, et Derek N. J. Hart. 2002. « Characterization of Human Blood Dendritic Cell Subsets ». *Blood* 100 (13): 4512-20. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-11-0097>.
- MacDonald, Thomas T., Ivan Monteleone, Massimo Claudio Fantini, et Giovanni Monteleone. 2011. « Regulation of Homeostasis and Inflammation in the Intestine ». *Gastroenterology* 140 (6): 1768-75. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.047>.
- MacGregor, Heather L., et Pamela S. Ohashi. 2017. « Molecular Pathways: Evaluating the Potential for B7-H4 as an Immunoregulatory Target ». *Clinical Cancer Research* 23 (12): 2934-41. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2440>.
- Maloy, Kevin J., et Fiona Powrie. 2011. « Intestinal Homeostasis and Its Breakdown in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature* 474 (7351): 298-306. <https://doi.org/10.1038/nature10208>.

- Mancias, Joseph D., Xiaoxu Wang, Steven P. Gygi, J. Wade Harper, et Alec C. Kimmelman. 2014. « Quantitative Proteomics Identifies NCOA4 as the Cargo Receptor Mediating Ferritinophagy ». *Nature* 509 (7498): 105-9. <https://doi.org/10.1038/nature13148>.
- Mantegazza, Adriana R., Susan H. Guttentag, Jamel El-Benna, Miwa Sasai, Akiko Iwasaki, Hao Shen, Terri M. Laufer, et Michael S. Marks. 2012. « Adaptor protein-3 is required in dendritic cells for optimal Toll-like receptor signaling from phagosomes and antigen presentation to CD4⁺ T cells ». *Immunity* 36 (5): 782-94. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.018>.
- Manuse, Mary J., Caitlin M. Briggs, et Griffith D. Parks. 2010. « Replication-Independent Activation of Human Plasmacytoid Dendritic Cells by the Paramyxovirus SV5 Requires TLR7 and Autophagy Pathways ». *Virology* 405 (2): 383-89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.023>.
- Martinez, Jennifer, Johann Almendinger, Andrew Oberst, Rachel Ness, Christopher P. Dillon, Patrick Fitzgerald, Michael O. Hengartner, et Douglas R. Green. 2011. « Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha (LC3)-Associated Phagocytosis Is Required for the Efficient Clearance of Dead Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (42): 17396-401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113421108>.
- Massey, D. C. O., F. Bredin, et M. Parkes. 2008. « Use of Sirolimus (Rapamycin) to Treat Refractory Crohn's Disease ». *Gut* 57 (9): 1294-96. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.157297>.
- Mathan, Till S. M. Manuel, Carl G. Figdor, et Sonja I. Buschow. 2013. « Human Plasmacytoid Dendritic Cells: From Molecules to Intercellular Communication Network ». *Frontiers in Immunology* 4: 372. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00372>.
- Mathers, Alicia R., Brian M. Janelsins, Joseph P. Rubin, Olga A. Tkacheva, William J. Shufesky, Simon C. Watkins, Adrian E. Morelli, et Adriana T. Larregina. 2009. « Differential Capability of Human Cutaneous Dendritic Cell Subsets to Initiate Th17 Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (2): 921-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.921>.
- Matoba, Kazuaki, Tetsuya Kotani, Akihisa Tsutsumi, Takuma Tsuji, Takaharu Mori, Daisuke Noshiro, Yuji Sugita, et al. 2020. « Atg9 Is a Lipid Scramblase That Mediates Autophagosomal Membrane Expansion ». *Nature Structural & Molecular Biology* 27 (12): 1185-93. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00518-w>.
- Matricon, Julien. 2010. « Immunopathogenèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ». *médecine/sciences* 26 (4): 405-10. <https://doi.org/10.1051/medsci/2010264405>.
- Matsuda, Noriyuki, Shigeto Sato, Kahori Shiba, Kei Okatsu, Keiko Saisho, Clement A. Gautier, Yu-Shin Sou, et al. 2010. « PINK1 Stabilized by Mitochondrial Depolarization Recruits Parkin to Damaged Mitochondria and Activates Latent Parkin for Mitophagy ». *The Journal of Cell Biology* 189 (2): 211-21. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910140>.
- Mauthe, Mario, Idil Orhon, Cecilia Rocchi, Xingdong Zhou, Morten Luhr, Kerst-Jan Hijlkema, Robert P. Coppes, Nikolai Engedal, Muriel Mari, et Fulvio Reggiori. 2018. « Chloroquine Inhibits Autophagic Flux by Decreasing Autophagosome-Lysosome Fusion ». *Autophagy* 14 (8): 1435-55. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
- McCarroll, Steven A., Alan Huett, Petric Kuballa, Shannon D. Chilewski, Aimee Landry, Philippe Goyette, Michael C. Zody, et al. 2008. « Deletion Polymorphism Upstream of IRGM Associated with Altered IRGM Expression and Crohn's Disease ». *Nature Genetics* 40 (9): 1107-12. <https://doi.org/10.1038/ng.215>.
- McEwan, David G., Doris Popovic, Andrea Gubas, Seigo Terawaki, Hironori Suzuki, Daniela Stadel, Fraser P. Coxon, et al. 2015. « PLEKHM1 Regulates Autophagosome-Lysosome Fusion through HOPS Complex and LC3/GABARAP Proteins ». *Molecular Cell* 57 (1): 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.006>.

- McGovern, Naomi, Andreas Schlitzer, Merry Gunawan, Laura Jardine, Amanda Shin, Elizabeth Poyner, Kile Green, et al. 2014. « Human Dermal CD14⁺ Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages ». *Immunity* 41 (3): 465-77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.006>.
- McLellan, A. D., G. C. Starling, L. A. Williams, B. D. Hock, et D. N. Hart. 1995. « Activation of Human Peripheral Blood Dendritic Cells Induces the CD86 Co-Stimulatory Molecule ». *European Journal of Immunology* 25 (7): 2064-68. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250739>.
- McLellan, Alexander D., Rüdiger V. Sorg, Lisa A. Williams, et Derek N. J. Hart. 1996. « Human Dendritic Cells Activate T Lymphocytes via a CD40: CD40 Ligand-Dependent Pathway ». *European Journal of Immunology* 26 (6): 1204-10. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260603>.
- McMahon, Harvey T., et Emmanuel Boucrot. 2011. « Molecular Mechanism and Physiological Functions of Clathrin-Mediated Endocytosis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (8): 517-33. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>.
- Medzhitov, Ruslan, et Charles A. Janeway. 2002. « Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5566): 298-300. <https://doi.org/10.1126/science.1068883>.
- Mellman, I., et R. M. Steinman. 2001. « Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines ». *Cell* 106 (3): 255-58. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00449-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00449-4).
- Merad, Miriam, Markus G. Manz, Holger Karsunky, Amy Wagers, Wendy Peters, Israel Charo, Irving L. Weissman, Jason G. Cyster, et Edgar G. Engleman. 2002. « Langerhans Cells Renew in the Skin throughout Life under Steady-State Conditions ». *Nature Immunology* 3 (12): 1135-41. <https://doi.org/10.1038/ni852>.
- Merad, Miriam, Priyanka Sathe, Julie Helft, Jennifer Miller, et Arthur Mortha. 2013. « The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting ». *Annual Review of Immunology* 31: 563-604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>.
- Michiels, A., K. Breckpot, J. Corthals, S. Tuyaeerts, A. Bonehill, C. Heirman, K. Thielemans, et J. L. Aerts. 2006. « Induction of Antigen-Specific CD8⁺ Cytotoxic T Cells by Dendritic Cells Co-Electroporated with a DsRNA Analogue and Tumor Antigen mRNA ». *Gene Therapy* 13 (13): 1027-36. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302750>.
- Min, Yan, Wenxi Xu, Dan Liu, Suqin Shen, Yunzhi Lu, Lu Zhang, et Honghai Wang. 2010. « Autophagy Promotes BCG-Induced Maturation of Human Dendritic Cells ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 42 (3): 177-82. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq006>.
- Mintern, Justine D., Christophe Macri, Wei Jin Chin, Scott E. Panozza, Elodie Segura, Natalie L. Patterson, Peter Zeller, et al. 2015. « Differential Use of Autophagy by Primary Dendritic Cells Specialized in Cross-Presentation ». *Autophagy* 11 (6): 906-17. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1045178>.
- Mittag, Diana, Anna I. Proietto, Thomas Loudovaris, Stuart I. Mannering, David Vremec, Ken Shortman, Li Wu, et Leonard C. Harrison. 2011. « Human Dendritic Cell Subsets from Spleen and Blood Are Similar in Phenotype and Function but Modified by Donor Health Status ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (11): 6207-17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002632>.
- Miyara, Makoto, Yumiko Yoshioka, Akihiko Kitoh, Tomoko Shima, Kajsa Wing, Akira Niwa, Christophe Parizot, et al. 2009. « Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor ». *Immunity* 30 (6): 899-911. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.019>.
- Mizushima, N., H. Sugita, T. Yoshimori, et Y. Ohsumi. 1998. « A New Protein Conjugation System in Human. The Counterpart of the Yeast Apg12p Conjugation System Essential

- for Autophagy ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (51): 33889-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.33889>.
- Mizushima, Noboru, Akiko Kuma, Yoshinori Kobayashi, Akitsugu Yamamoto, Masami Matsubae, Toshifumi Takao, Tohru Natsume, Yoshinori Ohsumi, et Tamotsu Yoshimori. 2003. « Mouse Apg16L, a Novel WD-Repeat Protein, Targets to the Autophagic Isolation Membrane with the Apg12-Apg5 Conjugate ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 9): 1679-88. <https://doi.org/10.1242/jcs.00381>.
- Mizushima, Noboru, Tamotsu Yoshimori, et Beth Levine. 2010. « Methods in Mammalian Autophagy Research ». *Cell* 140 (3): 313-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>.
- Moehle, Christoph, Nikolaus Ackermann, Thomas Langmann, Charalampos Aslanidis, Alexander Kel, Olga Kel-Margoulis, Anna Schmitz-Madry, Alexandra Zahn, Wolfgang Stremmel, et Gerd Schmitz. 2006. « Aberrant Intestinal Expression and Allelic Variants of Mucin Genes Associated with Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 84 (12): 1055-66. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0100-2>.
- Montagna, Daniela, Patrizia Sommi, Vittorio Necchi, Agostina Vitali, Enrica Montini, Ilaria Turin, Daniela Ferraro, Vittorio Ricci, et Enrico Solcia. 2017. « Different Polyubiquitinated Bodies in Human Dendritic Cells: IL-4 Causes PaCS During Differentiation While LPS or IFN α Induces DALIS During Maturation ». *Scientific Reports* 7 (1): 1844. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02090-8>.
- Montfoort, Nadine van, Evelyn van der Aa, et Andrea M. Woltman. 2014. « Understanding MHC Class I Presentation of Viral Antigens by Human Dendritic Cells as a Basis for Rational Design of Therapeutic Vaccines ». *Frontiers in Immunology* 5: 182. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00182>.
- Moore, Andrew S., et Erika L. F. Holzbaur. 2016. « Dynamic Recruitment and Activation of ALS-Associated TBK1 with Its Target Optineurin Are Required for Efficient Mitophagy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (24): E3349-3358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523810113>.
- Morelli, Adrian E., J. Peter Rubin, Geza Erdos, Olga A. Tkacheva, Alicia R. Mathers, Alan F. Zahorchak, Angus W. Thomson, Louis D. Falo, et Adriana T. Larregina. 2005. « CD4⁺ T Cell Responses Elicited by Different Subsets of Human Skin Migratory Dendritic Cells ». *The Journal of Immunology* 175 (12): 7905-15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7905>.
- Moretti, Julien, et J. Magarian Blander. 2014. « Insights into Phagocytosis-Coupled Activation of Pattern Recognition Receptors and Inflammasomes ». *Current Opinion in Immunology* 26 (février): 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.11.003>.
- Morgan, Angharad R., Wen-Jiun Lam, Dug-Yeo Han, Alan G. Fraser, et Lynnette R. Ferguson. 2012. « Association Analysis of ULK1 with Crohn's Disease in a New Zealand Population ». *Gastroenterology Research and Practice* 2012: 715309. <https://doi.org/10.1155/2012/715309>.
- Morgan, Xochitl C., Timothy L. Tickle, Harry Sokol, Dirk Gevers, Kathryn L. Devaney, Doyle V. Ward, Joshua A. Reyes, et al. 2012. « Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment ». *Genome Biology* 13 (9): R79. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>.
- Moseman, E. Ashley, Xueqing Liang, Amanda J. Dawson, Angela Panoskaltis-Mortari, Arthur M. Krieg, Yong-Jun Liu, Bruce R. Blazar, et Wei Chen. 2004. « Human Plasmacytoid Dendritic Cells Activated by CpG Oligodeoxynucleotides Induce the Generation of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (7): 4433-42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4433>.
- Mowat, Allan McL. 2003. « Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens ». *Nature Reviews Immunology* 3 (4): 331-41. <https://doi.org/10.1038/nri1057>.

- Mullen, Alan C., Frances A. High, Anne S. Hutchins, Hubert W. Lee, Alejandro V. Villarino, David M. Livingston, Andrew L. Kung, et al. 2001. « Role of T-Bet in Commitment of TH1 Cells Before IL-12-Dependent Selection ». *Science* 292 (5523): 1907-10. <https://doi.org/10.1126/science.1059835>.
- Münz, Christian. 2016. « Autophagy Proteins in Antigen Processing for Presentation on MHC Molecules ». *Immunological Reviews* 272 (1): 17-27. <https://doi.org/10.1111/imr.12422>.
- Murthy, Aditya, Yun Li, Ivan Peng, Mike Reichelt, Anand Kumar Katakam, Rajkumar Noubade, Merone Roose-Girma, et al. 2014. « A Crohn's Disease Variant in Atg16l1 Enhances Its Degradation by Caspase 3 ». *Nature* 506 (7489): 456-62. <https://doi.org/10.1038/nature13044>.
- Mutalib, Mohamed, Osvaldo Borrelli, Sarah Blackstock, Fevronia Kiparissi, Mamoun Elawad, Neil Shah, et Keith Lindley. 2014. « The use of sirolimus (rapamycin) in the management of refractory inflammatory bowel disease in children ». *Journal of Crohn's and Colitis* 8 (12): 1730-34. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.08.014>.
- Na, So Young, Sung Sup Park, et Jeong Kee Seo. 2015. « Genetic Polymorphisms in Autophagy-Associated Genes in Korean Children With Early-Onset Crohn Disease ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 61 (3): 285-91. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000796>.
- Nagl, Markus, Laco Kacani, Brigitte Müllauer, Eva-Maria Lemberger, Heribert Stoiber, Georg M. Sprinzl, Harald Schemmach, et Manfred P. Dierich. 2002. « Phagocytosis and Killing of Bacteria by Professional Phagocytes and Dendritic Cells ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9 (6): 1165-68. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1165-1168.2002>.
- Nakahara, Takeshi, Yoichi Moroi, Hiroshi Uchi, et Masutaka Furue. 2006. « Differential Role of MAPK Signaling in Human Dendritic Cell Maturation and Th1/Th2 Engagement ». *Journal of Dermatological Science* 42 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.11.004>.
- Nancey, Stéphane, Sébastien Holvöet, Ivan Graber, Grégoire Joubert, David Philippe, Stefan Martin, Jean-François Nicolas, Pierre Desreumaux, Bernard Flourié, et Dominique Kaiserlian. 2006. « CD8+ Cytotoxic T Cells Induce Relapsing Colitis in Normal Mice ». *Gastroenterology* 131 (2): 485-96. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.05.018>.
- Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, et Richard J. Youle. 2008. « Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy ». *The Journal of Cell Biology* 183 (5): 795-803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>.
- Nazio, Francesca, Flavie Strappazon, Manuela Antonioli, Pamela Bielli, Valentina Cianfanelli, Matteo Bordi, Christine Gretzmeier, et al. 2013. « mTOR Inhibits Autophagy by Controlling ULK1 Ubiquitylation, Self-Association and Function through AMBRA1 and TRAF6 ». *Nature Cell Biology* 15 (4): 406-16. <https://doi.org/10.1038/ncb2708>.
- Nemoto, Takahiro, Isei Tanida, Emiko Tanida-Miyake, Naoko Minematsu-Ikeguchi, Masahiro Yokota, Mariko Ohsumi, Takashi Ueno, et Eiki Kominami. 2003. « The Mouse APG10 Homologue, an E2-like Enzyme for Apg12p Conjugation, Facilitates MAP-LC3 Modification ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (41): 39517-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.m300550200>.
- Nestle, F. O., X. G. Zheng, C. B. Thompson, L. A. Turka, et B. J. Nickoloff. 1993. « Characterization of Dermal Dendritic Cells Obtained from Normal Human Skin Reveals Phenotypic and Functionally Distinctive Subsets ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 151 (11): 6535-45.
- Neurath, Markus F. 2014. « Cytokines in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Reviews Immunology* 14 (5): 329-42. <https://doi.org/10.1038/nri3661>.
- Nguyen, Hang Thi Thu, Guillaume Dalmasso, Stefan Müller, Jessica Carrière, Frank Seibold, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2014. « Crohn's Disease-Associated Adherent Invasive

- Escherichia Coli Modulate Levels of MicroRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy ». *Gastroenterology* 146 (2): 508-19. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.021>.
- Nguyen, Thanh N., Benjamin S. Padman, et Michael Lazarou. 2016. « Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy ». *Trends in Cell Biology* 26 (10): 733-44. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>.
- Nizzoli, Giulia, Jana Krietsch, Anja Weick, Svenja Steinfelder, Federica Facciotti, Paola Gruarin, Annalisa Bianco, et al. 2013. « Human CD1c+ Dendritic Cells Secrete High Levels of IL-12 and Potently Prime Cytotoxic T-Cell Responses ». *Blood* 122 (6): 932-42. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495424>.
- Nizzoli, Giulia, Paola Larghi, Moira Paroni, Maria Cristina Crosti, Monica Moro, Petra Neddermann, Flavio Caprioli, et al. 2016. « IL-10 Promotes Homeostatic Proliferation of Human CD8(+) Memory T Cells and, When Produced by CD1c(+) DCs, Shapes Naive CD8(+) T-Cell Priming ». *European Journal of Immunology* 46 (7): 1622-32. <https://doi.org/10.1002/eji.201546136>.
- Novak, Ivana, Vladimir Kirkin, David G. McEwan, Ji Zhang, Philipp Wild, Alexis Rozenknop, Vladimir Rogov, et al. 2010. « Nix Is a Selective Autophagy Receptor for Mitochondrial Clearance ». *EMBO Reports* 11 (1): 45-51. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.256>.
- Novikoff, Alex B., H. Beaufay, et C. de Duve. 1956. « ELECTRON MICROSCOPY OF LYSOSOME-RICH FRACTIONS FROM RAT LIVER ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 (4): 179-84.
- O'Doherty, U, M Peng, S Gezelter, W J Swiggard, M Betjes, N Bhardwaj, et R M Steinman. 1994. « Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. » *Immunology* 82 (3): 487-93.
- Ohshima, Y., Y. Tanaka, H. Tozawa, Y. Takahashi, C. Maliszewski, et G. Delespesse. 1997. « Expression and Function of OX40 Ligand on Human Dendritic Cells. » *The Journal of Immunology* 159 (8): 3838-48.
- Omarjee, Omar, Anne-Laure Mathieu, Gaëlle Quiniou, Marion Moreews, Michelle Ainouze, Cécile Frachette, Isabelle Melki, et al. 2021. « LACC1 deficiency links juvenile arthritis with autophagy and metabolism in macrophages ». *Journal of Experimental Medicine* 218 (e20201006). <https://doi.org/10.1084/jem.20201006>.
- Orsi, A., M. Razi, H. C. Dooley, D. Robinson, A. E. Weston, L. M. Collinson, et S. A. Tooze. 2012. « Dynamic and Transient Interactions of Atg9 with Autophagosomes, but Not Membrane Integration, Are Required for Autophagy ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (10): 1860-73. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0746>.
- Pajares, Marta, Ana I Rojo, Esperanza Arias, Antonio Díaz-Carretero, Ana María Cuervo, et Antonio Cuadrado. 2018. « Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A ». *Autophagy* 14 (8): 1310-22. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474992>.
- Palomino-Morales, R. J., J. Oliver, M. Gómez-García, M. A. López-Nevot, L. Rodrigo, A. Nieto, B. Z. Alizadeh, et J. Martín. 2009. « Association of ATG16L1 and IRGM Genes Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis Approach ». *Genes & Immunity* 10 (4): 356-64. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.25>.
- Pankiv, Serhiy, Endalkachew A. Alemu, Andreas Brech, Jack-Ansgar Bruun, Trond Lamark, Aud Overvatn, Geir Bjørkøy, et Terje Johansen. 2010. « FYCO1 Is a Rab7 Effector That Binds to LC3 and PI3P to Mediate Microtubule plus End-Directed Vesicle Transport ». *The Journal of Cell Biology* 188 (2): 253-69. <https://doi.org/10.1083/jcb.200907015>.
- Pankiv, Serhiy, Terje Høyvarde Clausen, Trond Lamark, Andreas Brech, Jack-Ansgar Bruun, Heidi Outzen, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, et Terje Johansen. 2007. « P62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein

- Aggregates by Autophagy ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (33): 24131-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>.
- Papinski, Daniel, et Claudine Kraft. 2016. « Regulation of Autophagy By Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex ». *Journal of Molecular Biology* 428 (9 Pt A): 1725-41. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.030>.
- Park, Sungwoo, Seon-Guk Choi, Seung-Min Yoo, Jin H. Son, et Yong-Keun Jung. 2014. « Choline Dehydrogenase Interacts with SQSTM1/P62 to Recruit LC3 and Stimulate Mitophagy ». *Autophagy* 10 (11): 1906-20. <https://doi.org/10.4161/auto.32177>.
- Parkes, Miles, Jeffrey C. Barrett, Natalie J. Prescott, Mark Tremelling, Carl A. Anderson, Sheila A. Fisher, Roland G. Roberts, et al. 2007. « Sequence Variants in the Autophagy Gene IRGM and Multiple Other Replicating Loci Contribute to Crohn's Disease Susceptibility ». *Nature Genetics* 39 (7): 830-32. <https://doi.org/10.1038/ng2061>.
- Pattingre, Sophie, Amina Tassa, Xueping Qu, Rita Garuti, Xiao Huan Liang, Noboru Mizushima, Milton Packer, Michael D. Schneider, et Beth Levine. 2005. « Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy ». *Cell* 122 (6): 927-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>.
- Pearce, Edward J., et Bart Everts. 2015. « Dendritic cell metabolism ». *Nature reviews. Immunology* 15 (1): 18-29. <https://doi.org/10.1038/nri3771>.
- Petiot, A., E. Ogier-Denis, E. F. Blommaert, A. J. Meijer, et P. Codogno. 2000. « Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in HT-29 Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2): 992-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.992>.
- Pierre, Philippe. 2005. « Dendritic Cells, DRiPs, and DALIS in the Control of Antigen Processing ». *Immunological Reviews* 207 (octobre): 184-90. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00300.x>.
- Platt, Craig D., Jessica K. Ma, Cécile Chaloui, Melanie Ebersold, Hani Bou-Reslan, Richard A. D. Carano, Ira Mellman, et Lélia Delamarre. 2010. « Mature Dendritic Cells Use Endocytic Receptors to Capture and Present Antigens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (9): 4287-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910609107>.
- Polson, Hannah E. J., Jane de Lartigue, Daniel J. Rigden, Marco Reedijk, Sylvie Urbé, Michael J. Clague, et Sharon A. Tooze. 2010. « Mammalian Atg18 (WIPI2) Localizes to Omegasome-Anchored Phagophores and Positively Regulates LC3 Lipidation ». *Autophagy* 6 (4): 506-22. <https://doi.org/10.4161/auto.6.4.11863>.
- Puente, Cindy, Ronald C. Hendrickson, et Xuejun Jiang. 2016. « Nutrient-Regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-Induced Autophagy ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (11): 6026-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689646>.
- Pufnock, Jeffrey S., Melinda Cigal, Lisa S. Rolczynski, Erica Andersen-Nissen, Mathias Wolfl, M. Juliana McElrath, et Philip D. Greenberg. 2011. « Priming CD8+ T Cells with Dendritic Cells Matured Using TLR4 and TLR7/8 Ligands Together Enhances Generation of CD8+ T Cells Retaining CD28 ». *Blood* 117 (24): 6542-51. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317966>.
- Puig-Kröger, Amaya, Miguel Relloso, Oskar Fernández-Capetillo, Ana Zubiaga, Augusto Silva, Carmelo Bernabéu, et Angel L. Corbí. 2001. « Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells ». *Blood* 98 (7): 2175-82. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.7.2175>.
- Puri, Claudia, Maurizio Renna, Carla F. Bento, Kevin Moreau, et David C. Rubinsztein. 2013. « Diverse Autophagosomal Membrane Sources Coalesce in Recycling Endosomes ». *Cell* 154 (6): 1285-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.044>.
- Qasem, Ahmad, Seela Ramesh, et Saleh A. Naser. 2019. « Genetic Polymorphisms in Tumour

- Necrosis Factor Receptors (TNFRSF1A/1B) Illustrate Differential Treatment Response to TNF α Inhibitors in Patients with Crohn's Disease ». *BMJ Open Gastroenterology* 6 (1): e000246. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2018-000246>.
- Qi, Shiqian, Do Jin Kim, Goran Stjepanovic, et James H. Hurley. 2015. « Structure of the Human Atg13-Atg101 HORMA Heterodimer: An Interaction Hub within the ULK1 Complex ». *Structure (London, England: 1993)* 23 (10): 1848-57. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.07.011>.
- Qin, Lei, Tayab C. Waseem, Anupama Sahoo, Shayahati Bieerkehazhi, Hong Zhou, Elena V. Galkina, et Roza Nurieva. 2018. « Insights Into the Molecular Mechanisms of T Follicular Helper-Mediated Immunity and Pathology ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01884>.
- Rahmouni, Oumaira, Laurent Dubuquoy, Pierre Desreumaux, et Christel Neut. 2016. « Microbiote intestinal et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ». *médecine/sciences* 32 (11): 968-73. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163211012>.
- Ravikumar, Brinda, Abraham Acevedo-Arozena, Sara Imarisio, Zdenek Berger, Coralie Vacher, Cahir J. O'Kane, Steve D. M. Brown, et David C. Rubinsztein. 2005. « Dynein Mutations Impair Autophagic Clearance of Aggregate-Prone Proteins ». *Nature Genetics* 37 (7): 771-76. <https://doi.org/10.1038/ng1591>.
- Ravikumar, Brinda, Kevin Moreau, Luca Jahreiss, Claudia Puri, et David C. Rubinsztein. 2010. « Plasma Membrane Contributes to the Formation of Pre-Autophagosomal Structures ». *Nature Cell Biology* 12 (8): 747-57. <https://doi.org/10.1038/ncb2078>.
- Reddy, A., M. Sapp, M. Feldman, M. Subklewe, et N. Bhardwaj. 1997. « A Monocyte Conditioned Medium Is More Effective than Defined Cytokines in Mediating the Terminal Maturation of Human Dendritic Cells ». *Blood* 90 (9): 3640-46.
- Reggiori, Fulvio, Katherine A. Tucker, Per E. Stromhaug, et Daniel J. Klionsky. 2004. « The Atg1-Atg13 Complex Regulates Atg9 and Atg23 Retrieval Transport from the Pre-Autophagosomal Structure ». *Developmental Cell* 6 (1): 79-90. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00402-7).
- Rezinciuc, Svetlana, Lavanya Bezavada, Azadeh Bahadoran, Susu Duan, Ruoning Wang, Daniel Lopez-Ferrer, David Finkelstein, et al. 2020. « Dynamic Metabolic Reprogramming in Dendritic Cells: An Early Response to Influenza Infection That Is Essential for Effector Function ». *PLOS Pathogens* 16 (10): e1008957. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008957>.
- Rioux, John D., Rannik J. Xavier, Kent D. Taylor, Mark S. Silverberg, Philippe Goyette, Alan Huett, Todd Green, et al. 2007. « Genome-Wide Association Study Identifies New Susceptibility Loci for Crohn Disease and Implicates Autophagy in Disease Pathogenesis ». *Nature Genetics* 39 (5): 596-604. <https://doi.org/10.1038/ng2032>.
- Robbins, Scott H., Thierry Walzer, Doulaye Dembélé, Christelle Thibault, Axel Defays, Gilles Bessou, Huichun Xu, et al. 2008. « Novel Insights into the Relationships between Dendritic Cell Subsets in Human and Mouse Revealed by Genome-Wide Expression Profiling ». *Genome Biology* 9 (1): R17. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r17>.
- Roberts, Rebecca, et Nicholas T. Ktistakis. 2013. « Omeasomes: PI3P Platforms That Manufacture Autophagosomes ». *Essays in Biochemistry* 55: 17-27. <https://doi.org/10.1042/bse0550017>.
- Roche, Paul A., et Peter Cresswell. 1990. « Invariant Chain Association with HLA-DR Molecules Inhibits Immunogenic Peptide Binding ». *Nature* 345 (6276): 615-18. <https://doi.org/10.1038/345615a0>.
- Roche, Paul A., et Kazuyuki Furuta. 2015. « The Ins and Outs of MHC Class II-Mediated Antigen Processing and Presentation ». *Nature Reviews Immunology* 15 (4): 203-16. <https://doi.org/10.1038/nri3818>.

- Roda, Giulia, Siew Chien Ng, Paulo Gustavo Kotze, Marjorie Argollo, Remo Panaccione, Antonino Spinelli, Arthur Kaser, Laurent Peyrin-Biroulet, et Silvio Danese. 2020. « Crohn's Disease ». *Nature Reviews. Disease Primers* 6 (1): 22. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>.
- Rodriguez-Fernandez, Silvia, Irma Pujol-Autonell, Ferran Brianso, David Perna-Barrull, Mary Cano-Sarabia, Sonia Garcia-Jimeno, Adrian Villalba, et al. 2018. « Phosphatidylserine-Liposomes Promote Tolerogenic Features on Dendritic Cells in Human Type 1 Diabetes by Apoptotic Mimicry ». *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00253>.
- Romao, Susana, Nathalie Gasser, Andrea C. Becker, Bruno Guhl, Milica Bajagic, Danusia Vanoaica, Urs Ziegler, et al. 2013. « Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing ». *The Journal of Cell Biology* 203 (5): 757-66. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308173>.
- Romao, Susana, et Christian Münz. 2014. « LC3-Associated Phagocytosis ». *Autophagy* 10 (3): 526-28. <https://doi.org/10.4161/auto.27606>.
- Russell, Ryan C., Ye Tian, Haixin Yuan, Hyun Woo Park, Yu-Yun Chang, Joungmok Kim, Haerin Kim, Thomas P. Neufeld, Andrew Dillin, et Kun-Liang Guan. 2013. « ULK1 Induces Autophagy by Phosphorylating Beclin-1 and Activating VPS34 Lipid Kinase ». *Nature Cell Biology* 15 (7): 741-50. <https://doi.org/10.1038/ncb2757>.
- Rusten, Tor Erik, et Harald Stenmark. 2009. « How Do ESCRT Proteins Control Autophagy? ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 13): 2179-83. <https://doi.org/10.1242/jcs.050021>.
- Sadaghian Sadabad, Mehdi, Anouk Regeling, Marcus C. de Goffau, Tjasso Blokzijl, Rinse K. Weersma, John Penders, Klaas Nico Faber, Hermie J. M. Harmsen, et Gerard Dijkstra. 2015. « The ATG16L1-T300A Allele Impairs Clearance of Pathosymbionts in the Inflamed Ileal Mucosa of Crohn's Disease Patients ». *Gut* 64 (10): 1546-52. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307289>.
- Said, André, Stephanie Bock, Trim Lajqi, Gerrit Müller, et Günther Weindl. 2014. « Chloroquine Promotes IL-17 Production by CD4+ T Cells via P38-Dependent IL-23 Release by Monocyte-Derived Langerhans-like Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (12): 6135-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303276>.
- Sakai, Y., A. Koller, L. K. Rangell, G. A. Keller, et S. Subramani. 1998. « Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia Pastoris*: Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates ». *The Journal of Cell Biology* 141 (3): 625-36. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.3.625>.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, et 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 ». *The Journal of Experimental Medicine* 182 (2): 389-400. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.389>.
- Sallusto, F., et A. Lanzavecchia. 1994. « Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor Alpha ». *The Journal of Experimental Medicine* 179 (4): 1109-18. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1109>.
- Sallusto, Federica, Patrick Schaerli, Pius Loetscher, Christoph Schaniel, Danielle Lenig, Charles R. Mackay, Shixin Qin, et Antonio Lanzavecchia. 1998. « Rapid and Coordinated Switch in Chemokine Receptor Expression during Dendritic Cell Maturation ». *European Journal of Immunology* 28 (9): 2760-69. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199809\)28:09<2760::AID-IMMU2760>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2760::AID-IMMU2760>3.0.CO;2-N).

- Sancho, David, Olivier P. Joffre, Anna M. Keller, Neil C. Rogers, Dolores Martínez, Patricia Hernanz-Falcón, Ian Rosewell, et Caetano Reis e Sousa. 2009. « Identification of a Dendritic Cell Receptor That Couples Sensing of Necrosis to Immunity ». *Nature* 458 (7240): 899-903. <https://doi.org/10.1038/nature07750>.
- Sandoval, Hector, Perumal Thiagarajan, Swapan K. Dasgupta, Armin Schumacher, Josef T. Prchal, Min Chen, et Jin Wang. 2008. « Essential Role for Nix in Autophagic Maturation of Erythroid Cells ». *Nature* 454 (7201): 232-35. <https://doi.org/10.1038/nature07006>.
- Sanjuan, Miguel A., Christopher P. Dillon, Stephen W. G. Tait, Simon Moshiah, Frank Dorsey, Samuel Connell, Masaaki Komatsu, et al. 2007. « Toll-like Receptor Signalling in Macrophages Links the Autophagy Pathway to Phagocytosis ». *Nature* 450 (7173): 1253-57. <https://doi.org/10.1038/nature06421>.
- Sanjuan, Miguel A., Sandra Milasta, et Douglas R. Green. 2009. « Toll-like Receptor Signaling in the Lysosomal Pathways ». *Immunological Reviews* 227 (1): 203-20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00732.x>.
- Santarelli, Roberta, Roberta Gonnella, Giulia Di Giovenale, Laura Cuomo, Angela Capobianchi, Marisa Granato, Giuseppe Gentile, Alberto Faggioni, et Mara Cirone. 2014. « STAT3 Activation by KSHV Correlates with IL-10, IL-6 and IL-23 Release and an Autophagic Block in Dendritic Cells ». *Scientific Reports* 4 (1): 4241. <https://doi.org/10.1038/srep04241>.
- Santeford, Andrea, Luke A. Wiley, Sunmin Park, Sonya Bamba, Rei Nakamura, Abdelaziz Gdoura, Thomas A. Ferguson, et al. 2016. « Impaired Autophagy in Macrophages Promotes Inflammatory Eye Disease ». *Autophagy* 12 (10): 1876-85. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1207857>.
- Saric, Anra, Victoria E. B. Hipolito, Jason G. Kay, Johnathan Canton, Costin N. Antonescu, et Roberto J. Botelho. 2016. « MTOR Controls Lysosome Tubulation and Antigen Presentation in Macrophages and Dendritic Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (2): 321-33. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0272>.
- Sashio, Hiroko, Kazuo Tamura, Reiko Ito, Yoshihiro Yamamoto, Hiroko Bamba, Tadashi Kosaka, Shin Fukui, et al. 2002. « Polymorphisms of the TNF Gene and the TNF Receptor Superfamily Member 1B Gene Are Associated with Susceptibility to Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, Respectively ». *Immunogenetics* 53 (12): 1020-27. <https://doi.org/10.1007/s00251-001-0423-7>.
- Savina, Ariel, et Sebastian Amigorena. 2007. « Phagocytosis and Antigen Presentation in Dendritic Cells ». *Immunological Reviews* 219 (octobre): 143-56. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x>.
- Savina, Ariel, Carolina Jancic, Stephanie Hugues, Pierre Guernonprez, Pablo Vargas, Ivan Cruz Moura, Ana-Maria Lennon-Duménil, Miguel C. Seabra, Graça Raposo, et Sebastian Amigorena. 2006. « NOX2 Controls Phagosomal PH to Regulate Antigen Processing during Crosspresentation by Dendritic Cells ». *Cell* 126 (1): 205-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.035>.
- Schlottmann, Silke, Franziska Buback, Bettina Stahl, Rainer Meierhenrich, Paul Walter, Michael Georgieff, et Uwe Senfleben. 2008. « Prolonged Classical NF-KappaB Activation Prevents Autophagy upon E. Coli Stimulation in Vitro: A Potential Resolving Mechanism of Inflammation ». *Mediators of Inflammation* 2008: 725854. <https://doi.org/10.1155/2008/725854>.
- Schmid, Dorothee, Marc Pypaert, et Christian Münz. 2007. « MHC class II antigen loading compartments continuously receive input from autophagosomes ». *Immunity* 26 (1): 79-92. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.018>.
- Schmitt, Nathalie, Yang Liu, Salah-Eddine Bentebibel, Indira Munagala, Laure Bourdery, K. Venuprasad, Jacques Banchereau, et Hideki Ueno. 2014. « The Cytokine TGF-β Co-

- Opts Signaling via STAT3-STAT4 to Promote the Differentiation of Human TFH Cells ». *Nature Immunology* 15 (9): 856-65. <https://doi.org/10.1038/ni.2947>.
- Schöneberg, Johannes, Mark Remec Pavlin, Shannon Yan, Maurizio Righini, Il-Hyung Lee, Lars-Anders Carlson, Amir Houshang Bahrami, et al. 2018. « ATP-Dependent Force Generation and Membrane Scission by ESCRT-III and Vps4 ». *Science* 362 (6421): 1423-28. <https://doi.org/10.1126/science.aat1839>.
- Schulzke, Joerg D., Svenja Ploeger, Maren Amasheh, Anja Fromm, Sebastian Zeissig, Hanno Troeger, Jan Richter, Christian Bojarski, Michael Schumann, et Michael Fromm. 2009. « Epithelial Tight Junctions in Intestinal Inflammation ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165 (mai): 294-300. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04062.x>.
- Schulzke, Joerg-Dieter, Christian Bojarski, Sebastian Zeissig, Frank Heller, Alfred H. Gitter, et Michael Fromm. 2006. « Disrupted Barrier Function through Epithelial Cell Apoptosis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072 (août): 288-99. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.027>.
- Segura, Elodie, et Sebastian Amigorena. 2013. « Identification of human inflammatory dendritic cells ». *Oncoimmunology* 2 (5). <https://doi.org/10.4161/onci.23851>.
- Segura, Elodie, Mélanie Durand, et Sebastian Amigorena. 2013. « Similar Antigen Cross-Presentation Capacity and Phagocytic Functions in All Freshly Isolated Human Lymphoid Organ-Resident Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (5): 1035-47. <https://doi.org/10.1084/jem.20121103>.
- Segura, Elodie, Maxime Touzot, Armelle Bohineust, Antonio Cappuccio, Gilles Chiocchia, Anne Hosmalin, Marc Dalod, Vassili Soumelis, et Sebastian Amigorena. 2013b. « Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation ». *Immunity* 38 (2): 336-48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.018>.
- Segura, Elodie, Jenny Valladeau-Guilemond, Marie-Hélène Donnadieu, Xavier Sastre-Garau, Vassili Soumelis, et Sebastian Amigorena. 2012. « Characterization of Resident and Migratory Dendritic Cells in Human Lymph Nodes ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (4): 653-60. <https://doi.org/10.1084/jem.20111457>.
- Seneschal, Julien, Rachael A. Clark, Ahmed Gehad, Clare M. Baecher-Allan, et Thomas S. Kupper. 2012. « Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells ». *Immunity* 36 (5): 873-84. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.018>.
- Severa, Martina, Elena Giacomini, Valerie Gafa, Eleni Anastasiadou, Fabiana Rizzo, Marco Corazzari, Alessandra Romagnoli, Pankaj Trivedi, Gian Maria Fimia, et Eliana Marina Coccia. 2013. « EBV Stimulates TLR- and Autophagy-Dependent Pathways and Impairs Maturation in Plasmacytoid Dendritic Cells: Implications for Viral Immune Escape ». *European Journal of Immunology* 43 (1): 147-58. <https://doi.org/10.1002/eji.201242552>.
- Shakushihiro, Kohsuke, Yasuomi Yamasaki, Makiya Nishikawa, et Yoshinobu Takakura. 2004. « Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells ». *Immunology* 112 (2): 211-18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01871.x>.
- Shang, Libin, et Xiaodong Wang. 2011. « AMPK and MTOR Coordinate the Regulation of Ulk1 and Mammalian Autophagy Initiation ». *Autophagy* 7 (8): 924-26. <https://doi.org/10.4161/auto.7.8.15860>.
- Shen, Wen-Chuan, Hwei-Ying Li, Guang-Chao Chen, Yijuang Chern, et Pang-Hsien Tu. 2015. « Mutations in the Ubiquitin-Binding Domain of OPTN/Optineurin Interfere with Autophagy-Mediated Degradation of Misfolded Proteins by a Dominant-Negative Mechanism ». *Autophagy* 11 (4): 685-700. <https://doi.org/10.4161/auto.36098>.
- Shen, Yue, Maria Letizia Giardino Torchia, Gregory W. Lawson, Christopher L. Karp,

- Jonathan D. Ashwell, et Sarkis K. Mazmanian. 2012. « Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection ». *Cell Host & Microbe* 12 (4): 509-20. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.004>.
- Shpilka, Tomer, Hilla Weidberg, Shmuel Pietrokovski, et Zvulun Elazar. 2011. « Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family ». *Genome Biology* 12 (7): 226. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-7-226>.
- Sica, Gabriel L, In-Hak Choi, Gefeng Zhu, Koji Tamada, Sheng-Dian Wang, Hideto Tamura, Andrei I Chapoval, Dallas B Flies, Jürgen Bajorath, et Lieping Chen. 2003. « B7-H4, a Molecule of the B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity ». *Immunity* 18 (6): 849-61. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00152-3).
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, et Y. J. Liu. 1999. « The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5421): 1835-37. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1835>.
- Sim, Wen Jing, Frano Malinarich, Anna-Marie Fairhurst, et John Edward Connolly. 2016. « Generation of Immature, Mature and Tolerogenic Dendritic Cells with Differing Metabolic Phenotypes ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 112 (juin). <https://doi.org/10.3791/54128>.
- Singh, Sudha B., Alexander S. Davis, Gregory A. Taylor, et Vojo Deretic. 2006. « Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria ». *Science* 313 (5792): 1438-41. <https://doi.org/10.1126/science.1129577>.
- Sittig, Simone P., Ghaith Bakdash, Jorieke Weiden, Annette E. Sköld, Jurjen Tel, Carl G. Figdor, I. Jolanda M. de Vries, et Gerty Schreiber. 2016. « A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets ». *Mediators of Inflammation* 2016: 3605643. <https://doi.org/10.1155/2016/3605643>.
- Sivanesan, Durga, Claudine Beauchamp, Christiane Quinou, Jonathan Lee, Sylvie Lesage, Sylvain Chemtob, John D. Rioux, et Stephen W. Michnick. 2016. « IL23R (Interleukin 23 Receptor) Variants Protective against Inflammatory Bowel Diseases (IBD) Display Loss of Function Due to Impaired Protein Stability and Intracellular Trafficking ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (16): 8673-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.715870>.
- Smrekar, Natasa, David Drobne, Lojze M. Smid, Ivan Ferkolj, Borut Stabuc, Alojz Ihan, et Andreja Natasa Kopitar. 2018. « Dendritic Cell Profiles in the Inflamed Colonic Mucosa Predict the Responses to Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibitors in Inflammatory Bowel Disease ». *Radiology and Oncology* 52 (4): 443-52. <https://doi.org/10.2478/raon-2018-0045>.
- « Snapshot ». s. d. Consulté le 31 décembre 2020. <https://www.nature.com/articles/cmi20182>.
- Snyder, Julia P., et Eyal Amiel. 2019. « Regulation of Dendritic Cell Immune Function and Metabolism by Cellular Nutrient Sensor Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ». *Frontiers in Immunology* 9 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03145>.
- Soares-Silva, Mercedes, Flavia F. Diniz, Gabriela N. Gomes, et Diana Bahia. 2016. « The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids ». *Frontiers in Microbiology* 7: 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>.
- Sokol, Harry, Bénédicte Pigneur, Laurie Watterlot, Omar Lakhdari, Luis G. Bermúdez-Humarán, Jean-Jacques Gratadoux, Sébastien Blugeon, et al. 2008. « Faecalibacterium Prausnitzii Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patients ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (43): 16731-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>.

- Solano-Gálvez, Sandra Georgina, Sonia Margarita Tovar-Torres, María Sofía Tron-Gómez, Ariane Estrella Weiser-Smeke, Diego Abelardo Álvarez-Hernández, Giorgio Alberto Franyuti-Kelly, Mijail Tapia-Moreno, Antonio Ibarra, Laila Gutiérrez-Kobeh, et Rosalino Vázquez-López. 2018. « Human Dendritic Cells: Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease ». *Medical Sciences* 6 (4). <https://doi.org/10.3390/medsci6040088>.
- Sonnenberg, Gregory F., et David Artis. 2015. « Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation ». *Nature medicine* 21 (7): 698-708. <https://doi.org/10.1038/nm.3892>.
- Sorbara, Matthew T., Lisa K. Ellison, Mahendrasingh Ramjeet, Leonardo H. Travassos, Nicola L. Jones, Stephen E. Girardin, et Dana J. Philpott. 2013. « The Protein ATG16L1 Suppresses Inflammatory Cytokines Induced by the Intracellular Sensors Nod1 and Nod2 in an Autophagy-Independent Manner ». *Immunity* 39 (5): 858-73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.013>.
- Spadaro, Francesca, Caterina Lapenta, Simona Donati, Laura Abalsamo, Vincenzo Barnaba, Filippo Belardelli, Stefano M. Santini, et Maria Ferrantini. 2012. « IFN- α enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing ». *Blood* 119 (6): 1407-17. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-363564>.
- Spellberg, Brad, et John E. Edwards Jr. 2001. « Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases ». *Clinical Infectious Diseases* 32 (1): 76-102. <https://doi.org/10.1086/317537>.
- Steinman, R. M., et Z. A. Cohn. 1973. « Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution ». *The Journal of Experimental Medicine* 137 (5): 1142-62. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>.
- Steinman, R. M., et H. Hemmi. 2006. « Dendritic Cells: Translating Innate to Adaptive Immunity ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 311: 17-58. https://doi.org/10.1007/3-540-32636-7_2.
- Steinman, R. M., K. Inaba, S. Turley, P. Pierre, et I. Mellman. 1999. « Antigen Capture, Processing, and Presentation by Dendritic Cells: Recent Cell Biological Studies ». *Human Immunology* 60 (7): 562-67. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(99\)00030-0](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(99)00030-0).
- Stenmark, Harald. 2009. « Rab GTPases as Coordinators of Vesicle Traffic ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (8): 513-25. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>.
- Strisciuglio, Caterina, Marjolijn Duijvestein, Auke P. Verhaar, Anne Christine W. Vos, Gijs R. van den Brink, Daniel W. Hommes, et Manon E. Wildenberg. 2013. « Impaired Autophagy Leads to Abnormal Dendritic Cell-Epithelial Cell Interactions ». *Journal of Crohn's & Colitis* 7 (7): 534-41. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.08.009>.
- Strober, W., et T. Watanabe. 2011. « NOD2, an Intracellular Innate Immune Sensor Involved in Host Defense and Crohn's Disease ». *Mucosal Immunology* 4 (5): 484-95. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.29>.
- Sun, Lijun, Jiayi Wu, Fenghe Du, Xiang Chen, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway ». *Science* 339 (6121): 786-91. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>.
- Sun, Shao-Cong. 2017. « The Non-Canonical NF-KB Pathway in Immunity and Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 17 (9): 545-58. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>.
- Sun, Ting, DanDan Li, Linlin Wang, LiangPing Xia, JianGuo Ma, Zhong Guan, GongKan Feng, et XiaoFeng Zhu. 2011. « C-Jun NH2-Terminal Kinase Activation Is Essential for up-Regulation of LC3 during Ceramide-Induced Autophagy in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells ». *Journal of Translational Medicine* 9 (septembre): 161. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-161>.

- Suzuki, Hironori, Takeshi Kaizuka, Noboru Mizushima, et Nobuo N. Noda. 2015. « Structure of the Atg101-Atg13 Complex Reveals Essential Roles of Atg101 in Autophagy Initiation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (7): 572-80. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3036>.
- Szabo, Attila, et Eva Rajnavolgyi. 2013. « Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses ». *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* 2 (3): 195-207.
- Tabata, Keisuke, Kohichi Matsunaga, Ayuko Sakane, Takuya Sasaki, Takeshi Noda, et Tamotsu Yoshimori. 2010. « Rubicon and PLEKHM1 Negatively Regulate the Endocytic/Autophagic Pathway via a Novel Rab7-binding Domain ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (23): 4162-72. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-06-0495>.
- Takagawa, Tetsuya, Atsushi Kitani, Ivan Fuss, Beth Levine, Steven R. Brant, Inga Peter, Masaki Tajima, Shiro Nakamura, et Warren Strober. 2018. « An Increase in LRRK2 Suppresses Autophagy and Enhances Dectin-1-Induced Immunity in a Mouse Model of Colitis ». *Science Translational Medicine* 10 (444). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8162>.
- Takahama, Michihiro, Shizuo Akira, et Tatsuya Saitoh. 2018. « Autophagy Limits Activation of the Inflammasomes ». *Immunological Reviews* 281 (1): 62-73. <https://doi.org/10.1111/imr.12613>.
- Takeuchi, Osamu, et Shizuo Akira. 2010. « Pattern Recognition Receptors and Inflammation ». *Cell* 140 (6): 805-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- Tan, Jeanne M. M., Esther S. P. Wong, Donald S. Kirkpatrick, Olga Pletnikova, Han Seok Ko, Shiam-Peng Tay, Michelle W. L. Ho, et al. 2008. « Lysine 63-Linked Ubiquitination Promotes the Formation and Autophagic Clearance of Protein Inclusions Associated with Neurodegenerative Diseases ». *Human Molecular Genetics* 17 (3): 431-39. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm320>.
- Tanaka, Atsushi, Megan M. Cleland, Shan Xu, Derek P. Narendra, Der-Fen Suen, Mariusz Karbowski, et Richard J. Youle. 2010. « Proteasome and P97 Mediate Mitophagy and Degradation of Mitofusins Induced by Parkin ». *The Journal of Cell Biology* 191 (7): 1367-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007013>.
- Tanaka, H., C. E. Demeure, M. Rubio, G. Delespesse, et M. Sarfati. 2000. « Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Induce Naive T Cell Differentiation into T Helper Cell Type 2 (Th2) or Th1/Th2 Effectors. Role of Stimulator/Responder Ratio ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (3): 405-12. <https://doi.org/10.1084/jem.192.3.405>.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lüllmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura, et P. Saftig. 2000b. « Accumulation of Autophagic Vacuoles and Cardiomyopathy in LAMP-2-Deficient Mice ». *Nature* 406 (6798): 902-6. <https://doi.org/10.1038/35022595>.
- Tang-Huau, Tsing-Lee, Paul Gueguen, Christel Goudot, Mélanie Durand, Mylène Bohec, Sylvain Baulande, Benoit Pasquier, Sebastian Amigorena, et Elodie Segura. 2018. « Human in Vivo-Generated Monocyte-Derived Dendritic Cells and Macrophages Cross-Present Antigens through a Vacuolar Pathway ». *Nature Communications* 9 (1): 2570. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04985-0>.
- Tanida, I., E. Tanida-Miyake, T. Ueno, et E. Kominami. 2001. « The Human Homolog of *Saccharomyces Cerevisiae* Apg7p Is a Protein-Activating Enzyme for Multiple Substrates Including Human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (3): 1701-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000752200>.
- Tanida, Isei, Emiko Tanida-Miyake, Masaaki Komatsu, Takashi Ueno, et Eiki Kominami. 2002. « Human Apg3p/Aut1p Homologue Is an Authentic E2 Enzyme for Multiple

- Substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and Facilitates the Conjugation of HAp_{g12p} to HAp_{g5p} ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 13739-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200385200>.
- Tanida, Isei, Takashi Ueno, et Eiki Kominami. 2004. « Human Light Chain 3/MAP1LC3B Is Cleaved at Its Carboxyl-Terminal Met121 to Expose Gly120 for Lipidation and Targeting to Autophagosomal Membranes ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (46): 47704-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407016200>.
- Tas, Sander W., Margriet J. Vervoordeldonk, Najat Hajji, Joost H. N. Schuitemaker, Koen F. van der Sluijs, Michael J. May, Sankar Ghosh, Martien L. Kapsenberg, Paul P. Tak, et Esther C. de Jong. 2007. « Noncanonical NF-KappaB Signaling in Dendritic Cells Is Required for Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Induction and Immune Regulation ». *Blood* 110 (5): 1540-49. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-056010>.
- Tel, Jurjen, Gerty Schreibelt, Simone P. Sittig, Till S. M. Mathan, Sonja I. Buschow, Luis J. Cruz, Annechien J. A. Lambeck, Carl G. Figdor, et I. Jolanda M. 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): 459-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435644>.
- Tel, Jurjen, Simone P. Sittig, Rebecca A. M. Blom, Luis J. Cruz, Gerty Schreibelt, Carl G. Figdor, et I. Jolanda M. de Vries. 2013b. « Targeting Uptake Receptors on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Antigen Cross-Presentation and Robust Type I IFN Secretion ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (10): 5005-12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300787>.
- Terawaki, Seigo, Voahirana Camosseto, Francesca Prete, Till Wenger, Alexia Papadopoulos, Christiane Rondeau, Alexis Combes, et al. 2015. « RUN and FYVE Domain-Containing Protein 4 Enhances Autophagy and Lysosome Tethering in Response to Interleukin-4 ». *The Journal of Cell Biology* 210 (7): 1133-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501059>.
- Terpstra Valeska, van Amersfoort Edwin S., van Velzen Agnes G., Kuiper Johan, et van Berkel Theo J. C. 2000. « Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (8): 1860-72. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.8.1860>.
- Tey, Siok-Keen, et Rajiv Khanna. 2012. « Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway ». *Blood* 120 (5): 994-1004. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402404>.
- Tiberio, Laura, Annalisa Del Prete, Tiziana Schioppa, Francesca Sozio, Daniela Bosisio, et Silvano Sozzani. 2018. « Chemokine and Chemotactic Signals in Dendritic Cell Migration ». *Cellular & Molecular Immunology* 15 (4): 346-52. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0005-3>.
- Toit, Andre du, Jan-Hendrik S. Hofmeyr, Thomas J. Gniadek, et Ben Loos. 2018. « Measuring autophagosome flux ». *Autophagy* 14 (6): 1060-71. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1469590>.
- Travassos, Leonardo H., Leticia A. M. Carneiro, Mahendrasingh Ramjeet, Seamus Hussey, Yun-Gi Kim, João G. Magalhães, Linda Yuan, et al. 2010. « Nod1 and Nod2 Direct Autophagy by Recruiting ATG16L1 to the Plasma Membrane at the Site of Bacterial Entry ». *Nature Immunology* 11 (1): 55-62. <https://doi.org/10.1038/ni.1823>.
- Trombetta, E. Sergio, Melanie Ebersold, Wendy Garrett, Marc Pypaert, et Ira Mellman. 2003. « Activation of Lysosomal Function during Dendritic Cell Maturation ». *Science (New York, N.Y.)* 299 (5611): 1400-1403. <https://doi.org/10.1126/science.1080106>.
- Tsukada, M., et Y. Ohsumi. 1993. « Isolation and Characterization of Autophagy-Defective Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *FEBS Letters* 333 (1-2): 169-74. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-e).

- Tumbarello, David A., Bennett J. Waxse, Susan D. Arden, Nicholas A. Bright, John Kendrick-Jones, et Folma Buss. 2012. « Autophagy-receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome ». *Nature cell biology* 14 (10): 1024-35. <https://doi.org/10.1038/ncb2589>.
- Uhl, M., O. Kepp, H. Jusforgues-Saklani, J.-M. Vicencio, G. Kroemer, et M. L. Albert. 2009. « Autophagy within the Antigen Donor Cell Facilitates Efficient Antigen Cross-Priming of Virus-Specific CD8⁺ T Cells ». *Cell Death and Differentiation* 16 (7): 991-1005. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.8>.
- Valečka, Jan, Catarina R. Almeida, Bing Su, Philippe Pierre, et Evelina Gatti. 2018. « Autophagy and MHC-Restricted Antigen Presentation ». *Molecular Immunology* 99 (juillet): 163-70. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.009>.
- Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, et al. 2000. « Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor That Induces the Formation of Birbeck Granules ». *Immunity* 12 (1): 71-81. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80160-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80160-0).
- Valladeau, J., et S. Saeland. 2000b. « La Langerine et les granules de Birbeck des cellules de Langerhans. » *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974], 2000, Vol. 16, N° 8-9; p.979-80*. <https://doi.org/10.4267/10608/1769>.
- Valladeau, Jenny. 2006. « Les cellules de Langerhans ». *médecine/sciences* 22 (2): 144-48. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006222144>.
- Valladeau, Jenny, et Sem Saeland. 2005. « Cutaneous Dendritic Cells ». *Seminars in Immunology* 17 (4): 273-83. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.05.009>.
- Van Voorhis, WC, LS Hair, RM Steinman, et G Kaplan. 1982. « Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood ». *The Journal of Experimental Medicine* 155 (4): 1172-87.
- Vazeille, Emilie, Anthony Buisson, Marie-Agnès Bringer, Marion Goutte, Lemlih Ouchchane, Jean-Pierre Hugot, Amélie de Vallée, Nicolas Barnich, Gilles Bommelaer, et Arlette Darfeuille-Michaud. 2015. « Monocyte-Derived Macrophages from Crohn's Disease Patients Are Impaired in the Ability to Control Intracellular Adherent-Invasive Escherichia Coli and Exhibit Disordered Cytokine Secretion Profile ». *Journal of Crohn's & Colitis* 9 (5): 410-20. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv053>.
- Velikkakath, Anoop Kumar G., Taki Nishimura, Eiko Oita, Naotada Ishihara, et Noboru Mizushima. 2012. « Mammalian Atg2 Proteins Are Essential for Autophagosome Formation and Important for Regulation of Size and Distribution of Lipid Droplets ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (5): 896-909. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0785>.
- Ven, Rieneke van de, Mari F. C. M. van den Hout, Jelle J. Lindenberg, Berbel J. R. Sluijter, Paul A. M. van Leeuwen, Sinéad M. Loughheed, Sybren Meijer, M. Petrousjka van den Tol, Rik J. Scheper, et Tanja D. de Gruijl. 2011. « Characterization of Four Conventional Dendritic Cell Subsets in Human Skin-Draining Lymph Nodes in Relation to T-Cell Activation ». *Blood* 118 (9): 2502-10. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-344838>.
- Verboogen, Danielle R. J., Ilse Dingjan, Natalia H. Revelo, Linda J. Visser, Martin ter Beest, et Geert van den Bogaart. 2016. « The Dendritic Cell Side of the Immunological Synapse ». *Biomolecular Concepts* 7 (1): 17-28. <https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0028>.
- Verdijk, Pauline, Peter A. van Veelen, Arnoud H. de Ru, Paul J. Hensbergen, Kensaku Mizuno, Henk K. Koerten, Frits Koning, Cornelis P. Tensen, et A. Mieke Mommaas. 2004. « Morphological Changes during Dendritic Cell Maturation Correlate with Cofilin Activation and Translocation to the Cell Membrane ». *European Journal of Immunology* 34 (1): 156-64. <https://doi.org/10.1002/eji.200324241>.

- Verlhac, Pauline, Isabel P. Grégoire, Olga Azocar, Denitsa S. Petkova, Joël Baguet, Christophe Viret, et Mathias Faure. 2015. « Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation ». *Cell Host & Microbe* 17 (4): 515-25. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.008>.
- Vidalain, Pierre-Olivier, Olga Azocar, Christine Servet-Delprat, Chantal Rabourdin-Combe, Denis Gerlier, et Serge Manié. 2000. « CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts ». *The EMBO Journal* 19 (13): 3304-13. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3304>.
- Villablanca, Eduardo J., et Jorge R. Mora. 2008. « A Two-Step Model for Langerhans Cell Migration to Skin-Draining LN ». *European Journal of Immunology* 38 (11): 2975-80. <https://doi.org/10.1002/eji.200838919>.
- Viret, Christophe, et Mathias Faure. 2019. « Regulation of Syntaxin 17 during Autophagosome Maturation ». *Trends in Cell Biology* 29 (1): 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.003>.
- Voss, Eske, Jan Wehkamp, Kai Wehkamp, Eduard F. Stange, Jens M. Schröder, et Jürgen Harder. 2006. « NOD2/CARD15 Mediates Induction of the Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin-2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (4): 2005-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511044200>.
- Vulcano, Marisa, Stefano Dusi, Daniele Lissandrini, Raffaele Badolato, Paola Mazzi, Elena Riboldi, Elena Borroni, et al. 2004. « Toll Receptor-Mediated Regulation of NADPH Oxidase in Human Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (9): 5749-56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5749>.
- Vyas, Jatin M., You-Me Kim, Katerina Artavanis-Tsakonas, J. Christopher Love, Annemarie G. Van der Veen, et Hidde L. Ploegh. 2007. « Tubulation of Class II MHC Compartments Is Microtubule Dependent and Involves Multiple Endolysosomal Membrane Proteins in Primary Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (11): 7199-7210. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.7199>.
- Wan, Wei, Zhiyuan You, Li Zhou, Yinfeng Xu, Chao Peng, Tianhua Zhou, Cong Yi, Yin Shi, et Wei Liu. 2018. « MTORC1-Regulated and HUWE1-Mediated WIPI2 Degradation Controls Autophagy Flux ». *Molecular Cell* 72 (2): 303-315.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.017>.
- Wang, Yi-Ting, et Guang-Chao Chen. 2016. « The Role of Ubiquitin System in Autophagy ». *Autophagy in Current Trends in Cellular Physiology and Pathology*, novembre. <https://doi.org/10.5772/64728>.
- Wang, Yuqing, Mauro Serricchio, Miluska Jauregui, Riya Shanbhag, Tasha Stoltz, Caitlin T. Di Paolo, Peter K. Kim, et G. Angus McQuibban. 2015. « Deubiquitinating Enzymes Regulate PARK2-Mediated Mitophagy ». *Autophagy* 11 (4): 595-606. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034408>.
- Wang, Zheng, Guangyan Miao, Xue Xue, Xiangyang Guo, Chongzhen Yuan, Zhaoyu Wang, Gangming Zhang, et al. 2016. « The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector That Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes ». *Molecular Cell* 63 (5): 781-95. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.021>.
- Wartosch, Lena, Ufuk Günesdogan, Stephen C. Graham, et J. Paul Luzio. 2015. « Recruitment of VPS33A to HOPS by VPS16 Is Required for Lysosome Fusion with Endosomes and Autophagosomes ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16 (7): 727-42. <https://doi.org/10.1111/tra.12283>.
- Watanabe, Tomohiro, Atsushi Kitani, Peter J. Murray, et Warren Strober. 2004. « NOD2 Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor 2-Mediated T Helper Type 1 Responses ». *Nature Immunology* 5 (8): 800-808. <https://doi.org/10.1038/ni1092>.
- Watchmaker, Payal B., Katharina Lahl, Mike Lee, Dirk Baumjohann, John Morton, Sun Jung

- Kim, Ruizhu Zeng, et al. 2014. « Comparative Transcriptional and Functional Profiling Defines Conserved Programs of Intestinal DC Differentiation in Humans and Mice ». *Nature Immunology* 15 (1): 98-108. <https://doi.org/10.1038/ni.2768>.
- Wculek, Stefanie K., Sofia C. Khouili, Elena Priego, Ignacio Heras-Murillo, et David Sancho. 2019. « Metabolic Control of Dendritic Cell Functions: Digesting Information ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00775>.
- Weber, D. A., B. D. Evavold, et P. E. Jensen. 1996. « Enhanced Dissociation of HLA-DR-Bound Peptides in the Presence of HLA-DM ». *Science (New York, N.Y.)* 274 (5287): 618-20. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.618>.
- Wehkamp, J., J. Harder, M. Weichenthal, M. Schwab, E. Schäffeler, M. Schlee, K. R. Herrlinger, et al. 2004. « NOD2 (CARD15) Mutations in Crohn's Disease Are Associated with Diminished Mucosal Alpha-Defensin Expression ». *Gut* 53 (11): 1658-64. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.032805>.
- Weidberg, Hilla, Elena Shvets, Tomer Shpilka, Frida Shimron, Vera Shinder, et Zvulun Elazar. 2010. « LC3 and GATE-16/GABARAP Subfamilies Are Both Essential yet Act Differently in Autophagosome Biogenesis ». *The EMBO Journal* 29 (11): 1792-1802. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.74>.
- Weindel, Chi G., Lauren J. Richey, Abhiruchi J. Mehta, Mansi Shah, et Brigitte T. Huber. 2017. « Autophagy in Dendritic Cells and B Cells Is Critical for the Inflammatory State of TLR7-Mediated Autoimmunity ». *The Journal of Immunology* 198 (3): 1081-92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601307>.
- West, M. A., A. R. Prescott, E. L. Eskelinen, A. J. Ridley, et C. Watts. 2000. « Rac Is Required for Constitutive Macropinocytosis by Dendritic Cells but Does Not Control Its Downregulation ». *Current Biology: CB* 10 (14): 839-48. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00595-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00595-9).
- West, Michele A., Robert P. A. Wallin, Stephen P. Matthews, Henrik G. Svensson, Rossana Zaru, Hans-Gustaf Ljunggren, Alan R. Prescott, et Colin Watts. 2004. « Enhanced Dendritic Cell Antigen Capture via Toll-like Receptor-Induced Actin Remodeling ». *Science (New York, N.Y.)* 305 (5687): 1153-57. <https://doi.org/10.1126/science.1099153>.
- Wieczorek, Marek, Esam T. Abualrous, Jana Sticht, Miguel Álvaro-Benito, Sebastian Stolzenberg, Frank Noé, et Christian Freund. 2017. « Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation ». *Frontiers in Immunology* 8: 292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>.
- Wijdeven, Ruud H., Hans Janssen, Leila Nahidiazar, Lennert Janssen, Kees Jalink, Ilana Berlin, et Jacques Neefjes. 2016. « Cholesterol and ORP1L-Mediated ER Contact Sites Control Autophagosome Transport and Fusion with the Endocytic Pathway ». *Nature Communications* 7 (juin): 11808. <https://doi.org/10.1038/ncomms11808>.
- Wild, Philipp, Hesso Farhan, David G. McEwan, Sebastian Wagner, Vladimir V. Rogov, Nathan R. Brady, Benjamin Richter, et al. 2011. « Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth ». *Science* 333 (6039): 228-33. <https://doi.org/10.1126/science.1205405>.
- Wildenberg, M. E., P. J. Koelink, K. Diederren, A. A. Te Velde, S. C. S. Wolfkamp, V. J. Nuij, M. P. Peppelenbosch, et al. 2017. « The ATG16L1 Risk Allele Associated with Crohn's Disease Results in a Rac1-Dependent Defect in Dendritic Cell Migration That Is Corrected by Thiopurines ». *Mucosal Immunology* 10 (2): 352-60. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.65>.
- Wildenberg, Manon E., Anne Christine W. Vos, Simone C. S. Wolfkamp, Marjolijn Duijvestein, Auke P. Verhaar, Anje A. Te Velde, Gijs R. van den Brink, et Daniel W. Hommes. 2012. « Autophagy Attenuates the Adaptive Immune Response by

- Destabilizing the Immunologic Synapse ». *Gastroenterology* 142 (7): 1493-1503.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.034>.
- Wilson, A. G., J. A. Symons, T. L. McDowell, H. O. McDevitt, et G. W. Duff. 1997. « Effects of a Polymorphism in the Human Tumor Necrosis Factor Alpha Promoter on Transcriptional Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (7): 3195-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3195>.
- Wold, Mitchell S., Junghyun Lim, Véronik Lachance, Zhiqiang Deng, et Zhenyu Yue. 2016. « ULK1-mediated phosphorylation of ATG14 promotes autophagy and is impaired in Huntington's disease models ». *Molecular Neurodegeneration* 11 (décembre). <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0141-0>.
- Wollenberg, A., S. Kraft, D. Hanau, et T. Bieber. 1996. « Immunomorphological and Ultrastructural Characterization of Langerhans Cells and a Novel, Inflammatory Dendritic Epidermal Cell (IDEC) Population in Lesional Skin of Atopic Eczema ». *The Journal of Investigative Dermatology* 106 (3): 446-53. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12343596>.
- Wollenberg, Andreas, Mieke Mommaas, Tilmann Oppel, Eva-Maria Schottdorf, Sandra Günther, et Martina Moderer. 2002. « Expression and Function of the Mannose Receptor CD206 on Epidermal Dendritic Cells in Inflammatory Skin Diseases ». *The Journal of Investigative Dermatology* 118 (2): 327-34. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x>.
- Worbs, Tim, Swantje I. Hammerschmidt, et Reinhold Förster. 2017. « Dendritic Cell Migration in Health and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 17 (1): 30-48. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.116>.
- Xia, Shenglong, Daguang Zhang, Shuzi Zheng, Chaoqun Wu, Qianru Lin, Shijie Ying, Xiaoxiao Shao, et Yi Jiang. 2019. « Association of Crohn's disease with Foxp3 gene polymorphisms and its colonic expression in Chinese patients ». *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 33 (4). <https://doi.org/10.1002/jcla.22835>.
- Xia, Yu, Jun Dai, Peirong Lu, Yong Huang, Yipei Zhu, et Xueguang Zhang. 2008. « Distinct Effect of CD40 and TNF-Signaling on the Chemokine/Chemokine Receptor Expression and Function of the Human Monocyte-Derived Dendritic Cells ». *Cellular & Molecular Immunology* 5 (2): 121-31. <https://doi.org/10.1038/cmi.2008.15>.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, et Y. Tashiro. 1998. « Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells ». *Cell Structure and Function* 23 (1): 33-42. <https://doi.org/10.1247/csf.23.33>.
- Yamano, Koji, Adam I. Fogel, Chunxin Wang, Alexander M. van der Blik, et Richard J. Youle. 2014. « Mitochondrial Rab GAPs Govern Autophagosome Biogenesis during Mitophagy ». *ELife* 3 (février): e01612. <https://doi.org/10.7554/eLife.01612>.
- Yanagihara, S., E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai, et Y. Yamaguchi. 1998. « EBI1/CCR7 Is a New Member of Dendritic Cell Chemokine Receptor That Is up-Regulated upon Maturation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (6): 3096-3102.
- Yau, Richard, et Michael Rape. 2016. « The Increasing Complexity of the Ubiquitin Code ». *Nature Cell Biology* 18 (6): 579-86. <https://doi.org/10.1038/ncb3358>.
- Yin, Zhangyuan, Clarence Pascual, et Daniel J. Klionsky. 2016. « Autophagy: Machinery and Regulation ». *Microbial Cell* 3 (12): 588-96. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>.
- Yoshimori, T., A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai, et Y. Tashiro. 1991. « Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-Type H(+)-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (26): 17707-12.
- Young, Andrew R. J., Edmond Y. W. Chan, Xiao Wen Hu, Robert Köchl, Samuel G. Crawshaw, Stephen High, Dale W. Hailey, Jennifer Lippincott-Schwartz, et Sharon A.

- Tooze. 2006. « Starvation and ULK1-Dependent Cycling of Mammalian Atg9 between the TGN and Endosomes ». *Journal of Cell Science* 119 (18): 3888-3900. <https://doi.org/10.1242/jcs.03172>.
- Yu, Zhong-Qiu, Tao Ni, Bing Hong, Hai-Yan Wang, Fen-Jun Jiang, Shenshen Zou, Yong Chen, et al. 2012. « Dual Roles of Atg8-PE Deconjugation by Atg4 in Autophagy ». *Autophagy* 8 (6): 883-92. <https://doi.org/10.4161/auto.19652>.
- Yuan, Hai-Xin, Ryan C. Russell, et Kun-Liang Guan. 2013. « Regulation of PIK3C3/VPS34 Complexes by MTOR in Nutrient Stress-Induced Autophagy ». *Autophagy* 9 (12): 1983-95. <https://doi.org/10.4161/auto.26058>.
- Yuan, Yang, Yanrong Zheng, Xiangnan Zhang, Ying Chen, Xiaoli Wu, Jiaying Wu, Zhe Shen, et al. 2017. « BNIP3L/NIX-Mediated Mitophagy Protects against Ischemic Brain Injury Independent of PARK2 ». *Autophagy* 13 (10): 1754-66. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1357792>.
- Zaba, Lisa C., Irma Cardinale, Patricia Gilleaudeau, Mary Sullivan-Whalen, Mayte Suárez-Fariñas, Mayte Suárez Fariñas, Judilyn Fuentes-Duculan, et al. 2007. « Amelioration of Epidermal Hyperplasia by TNF Inhibition Is Associated with Reduced Th17 Responses ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (13): 3183-94. <https://doi.org/10.1084/jem.20071094>.
- Zaba, Lisa C., Judilyn Fuentes-Duculan, Narat John Eungdamrong, Maria Veronica Abello, Inna Novitskaya, Katherine C. Pierson, Juana Gonzalez, James G. Krueger, et Michelle A. Lowes. 2009. « Psoriasis Is Characterized by Accumulation of Immunostimulatory and Th1/Th17 Cell-Polarizing Myeloid Dendritic Cells ». *The Journal of Investigative Dermatology* 129 (1): 79-88. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.194>.
- Zalckvar, Einat, Hanna Berissi, Liat Mizrachy, Yulia Idelchuk, Itay Koren, Miriam Eisenstein, Helena Sabanay, Ronit Pinkas-Kramarski, et Adi Kimchi. 2009. « DAP-Kinase-Mediated Phosphorylation on the BH3 Domain of Beclin 1 Promotes Dissociation of Beclin 1 from Bcl-XL and Induction of Autophagy ». *EMBO Reports* 10 (3): 285-92. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.246>.
- Zhang, Ziyang, Rajat Singh, et Michael Aschner. 2016. « Methods for the Detection of Autophagy in Mammalian Cells ». *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]* 69 (août): 20.12.1-20.12.26. <https://doi.org/10.1002/cptx.11>.
- Zhong, Yun, Qing Jun Wang, Xianting Li, Ying Yan, Jonathan M. Backer, Brian T. Chait, Nathaniel Heintz, et Zhenyu Yue. 2009. « Distinct Regulation of Autophagic Activity by Atg14L and Rubicon Associated with Beclin 1-Phosphatidylinositol-3-Kinase Complex ». *Nature Cell Biology* 11 (4): 468-76. <https://doi.org/10.1038/ncb1854>.
- Zhou, Dejiang, Kyung Hee Kang, et Stephen A. Spector. 2012. « Production of Interferon α by Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Is Dependent on Induction of Autophagy ». *The Journal of Infectious Diseases* 205 (8): 1258-67. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis187>.
- Ziegler-Heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N. Hart, Pieter J. M. Leenen, et al. 2010. « Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood ». *Blood* 116 (16): e74-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>.
- Zigmond, Ehud, Chen Varol, Julia Farache, Elinor Elmaliyah, Ansuman T. Satpathy, Gilgi Friedlander, Matthias Mack, et al. 2012. « Ly6C Hi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells ». *Immunity* 37 (6): 1076-90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026>.
- Zindl, Carlene L., Jen-Feng Lai, Yun Kyung Lee, Craig L. Maynard, Stacey N. Harbour, Wenjun Ouyang, David D. Chaplin, et Casey T. Weaver. 2013. « IL-22-Producing Neutrophils Contribute to Antimicrobial Defense and Restitution of Colonic Epithelial

Integrity during Colitis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (31): 12768-73.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1300318110>.

Zouiten-Mekki, Lilia, Meriem Serghini, Monia Fekih, Lamia Kallel, Samira Matri, Nadia Ben Mustapha, Jalel Boubaker, et Azza Filali. 2013. « Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ». *médecine/sciences* 29 (12): 1145-50. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912019>.