



HAL
open science

Rôle du complexe ESCRT-III dans l'export cytosolique des antigènes au cours de la présentation croisée par les cellules dendritiques

Marine Gros

► **To cite this version:**

Marine Gros. Rôle du complexe ESCRT-III dans l'export cytosolique des antigènes au cours de la présentation croisée par les cellules dendritiques. Immunologie. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5094 . tel-03783679

HAL Id: tel-03783679

<https://theses.hal.science/tel-03783679>

Submitted on 22 Sep 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.



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES



Université de Paris

Université de Paris

École doctorale *BioSPC (ED562)*

Laboratoire *Dendritic cell and T cell biology*

Rôle du complexe ESCRT-III dans l'export cytosolique des antigènes au cours de la présentation croisée par les cellules dendritiques

Par Marine GROS

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par Sebastian AMIGORENA

Présentée et soutenue publiquement le **27 novembre 2019**

Devant un jury composé de :

Dr. Diana Matheoud	Rapportrice
Dr. Matthieu Piel	Rapporteur
Dr. Mathieu Bertrand	Examineur
Dr. Loredana Saveanu	Examinatrice
Dr. Thomas Wollert	Examineur
Dr. Sebastian Amigorena	Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

« Non quia difficilia sunt non audemus, sed quia non audemus difficilia sunt. »

Ce n'est point parce qu'il est difficile que nous n'osons pas ; c'est parce que nous n'osons pas, qu'il est difficile.

Sénèque le Jeune, Lettres à Lucilius, XVII, 104, 26 (traduction de Joseph Baillard)

À mon Nonno,
À mes parents,
À Yannick

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie chaleureusement le Dr. Diana Matheoud et le Dr. Matthieu Piel pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit ainsi qu'à la rédaction de commentaires et remarques bienveillantes et extrêmement constructives à son propos. Je remercie également le Dr. Mathieu Bertrand, le Dr. Loredana Saveanu et le Dr. Thomas Wollert d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse. Merci à tous d'être présents pour cette soutenance au cours de laquelle vos expertises respectives enrichiront, j'en suis certaine, la discussion autour de cette étude. Je tiens également à remercier vivement les membres de mon comité de thèse, le Dr. Philippe Benaroch, le Dr. Nicolas Manel et le Dr. Franck Perez qui m'ont accompagnée tout au long de ma thèse et dont la vision scientifique et les suggestions expérimentales ont grandement contribué aux travaux présentés ici.

Un très grand merci à mon directeur de thèse, Sebastian, de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son équipe de recherche un peu « à l'aveugle », sans avoir fait de stage de master préalable, de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé une grande autonomie dans la gestion de ce projet de recherche. Les difficultés rencontrées ont été nombreuses, mais je pense que nous avons tout de même réalisé un travail de qualité dont nous pouvons être fiers aujourd'hui. Merci également à Patrycja pour l'initiation de ce projet, le développement des techniques d'export et ses conseils à distance.

Je voudrais remercier tous les ex-membres du Pavillon Pasteur pour l'ambiance et l'entraide qu'ils ont fait régner à cet étage. Je remercie notamment Mario et Joao de m'avoir prise sous leur aile au début de ma thèse et de m'avoir guidée, avec grande bienveillance, malgré mes questions, souvent stupides. Merci à Mélanie d'avoir été the Mélanouche to my Marinette, de m'avoir soutenue sans faillir pendant 4 ans, d'avoir calmé mes angoisses souvent irrationnelles et d'avoir partagé avec moi ses recommandations de documentaires obscurs, son amour des expressions françaises désuètes et ses plus beaux gifs de Michael Fassbender. Comment remercier Marianne pour la relecture minutieuse de ce manuscrit, pour ses conseils et suggestions scientifiques, pour son aide en manip mais aussi pour m'avoir rassurée en permanence et réconfortée pendant les moments difficiles (spoiler : c'est impossible, tu as été incroyable de bienveillance et d'excellence) ? Thanks, Derek, for your scientific help, for trusting my results when I couldn't anymore and for listening to my often irrational and stupid concerns without telling me I was ridiculous. Endlich, vielen Dank Nina! My german is unfortunately too limited to thank you for your experimental help, for your support and for the life-saving coffee breaks we shared with Marianne and Mélanie! Sans vous, cette thèse et ces travaux auraient été assurément moins aboutis et ma zinzinerie, décuplée !

Merci aussi à tous les membres passés et présents du bureau des étudiants. Merci à Joanna et Alizée pour leur soutien, sur place puis à distance, à Alice, Anastasia « ADPDH/Poulettos/Madame JeSaisTout », Emeline et Léa pour avoir supporté mes chouineries (chouinades ?) et mon humour relou pendant plus de deux ans, et surtout pour m'avoir encouragée sans cesse ! Merci à Elise, Federico, Pierre-Emmanuel et Yara pour leur calme et leur bonne humeur indéfectible (sans oublier les superbes violon plots de la figure RS.1.1 !). Merci aussi à Sophie pour les discussions lors des veillées nocturnes dans le L2 et à Marion pour sa bienveillance et ses paroles qui me font me sentir un peu moins seule dans mes questionnements incessants. Je remercie aussi les membres de l'équipe de et l'unité qui m'ont à un moment ou à un autre aidée, soutenue, fait rire et évoluer : dearest Leo (« quelle horreur ! »),

the quote from the Book of Samurai you gave me at the beginning of my thesis (« courage is such a thing ») is still pinned to the wall of my office, I am reading it frequently and will always remember your infinite kindness and support ! Christel, bioinformaticienne brillante et complice de pauses café, merci d'avoir été si compréhensive tout au long de ma thèse ! Merci aussi à Adeline, Sandrine, Elodie, Ella, Antonela, Mengliang, Alba, Javiera, Guadalupe, Yago, Ulf (« Hey Marine, how is it going? »), Thomas, Luigia (« Dai Marine ! »), Florence, Andres, Michael, Jaime, Irena, Sheila, Christina, Paul, Myriam, Ares, Mercia, Benjamin, Charlotte, Aurore, Emeline D., Laurie, Rodrigo, Mathilde, Aurélie, Jordan super binôme de galère le matin tôt dans le L1, Coline, Max qui ponctuait mes journées au son de « petit pull Marine », Mercedes (and her regular supporting « come oooooon »), Danielle, Odile, Dorian, Marine B., Lorena, Marius, Ester, Steph (merci pour ta positivité (ce mot est-il vraiment français ?) et ton aide en bio mol au début), Mathieu (merci pour être resté des heures au microscope avec moi à imager des *foci* galectine-3, activité ô combien palpitante). Merci à tous du fond du cœur.

Un immense merci à Virginie pour sa bonne humeur quotidienne et sans qui nous n'irions pas bien loin. Tu accomplis un travail considérable et salvateur pour nous tous, avec une gentillesse et une efficacité vraiment remarquables. J'associe évidemment à ces remerciements Sylvia (merci pour tes encouragements et ta bienveillance), Cassandra, Elodie, Emma et Malika.

Merci aussi à mes copains thésards « du bout du couloir » Eléonore et Julien pour leurs conseils bienveillants et leurs encouragements surtout durant cette dernière année de thèse. Quelles belles personnes vous êtes et que je suis heureuse de vous connaître !

Je remercie aussi du fond du cœur toutes les personnes que j'ai pu croiser au cours de mes différents stages de master et qui m'ont éveillée et donné goût à la recherche. Merci à Lucie de m'avoir si bien encadrée pendant mon stage de L3, de m'avoir aidée à trier quotidiennement mes 300 larves d'*Ephesia kuehniella*, de m'avoir ouverte à la beauté du « cocking » (oui oui) des *Venturia* et d'avoir essayé de m'apprendre à ne pas trop « me prendre la tête ». Comment ne pas mentionner Mélanie ici ? Ta rigueur scientifique, ta bienveillance, ton humour, ta bonne humeur m'ont donné confiance en moi pendant ces six mois inoubliables à Londres et ont fait de cette expérience un moment incroyable dans ma minuscule carrière d'apprentie chercheuse et dans ma vie tout court ! J'ai tenté de respecter tes conseils et de toujours faire preuve d'autant de « dédicatement » et de « keep calm and carry on », comme pendant les longues heures passées au Fortessa et au LSR II ! Merci aux toulousains du CPTP : Gavin pour les dinosaures réconfortants du lundi matin et pour ton rire communicatif, Nicolas mon autoproclamé maître de stage préféré désormais exilé à San Diego, Mehdi (allez TFC !), Bénédicte, Maude, Cécile et Anne. J'ai évidemment une pensée émue pour Paola qui m'a encadrée avec énormément de douceur et de bienveillance pendant ces quatre mois. Enfin, merci à la Team NCB d'Imagine dont la plupart des anciens collègues se sont transformés en amis chers. Merci à Matthias, Ségo et Bernichouette pour nos dîners réconfortants au Saint Malo, notre QG ! Vous compter parmi mes amis est pour moi une source de bonheur et de grande satisfaction. Merci à Nicolas (je t'attends pour le film Kaamelott !), Marion, Benoît, Rute, Marianna et Natalia, sans oublier Sabine et Corinne, deux si belles personnes qui ont partagé mon bureau pendant un an et demi et n'ont eu de cesse de me soutenir et de m'encourager.

Ma passion pour la science a bien sûr été renforcée par ces rencontres, mais elle a débuté petite, en regardant, comme beaucoup j'imagine, « C'est pas sorcier ». Si je suis aujourd'hui en passe de devenir doctoresse, que je m'émerveille de l'infinie complexité du monde biologique et que l'activité de recherche me donne la sensation intimidante, excitante et parfois décourageante d'explorer les limites de la connaissance humaine avec ma lampe de poche, c'est surtout grâce à Fred et Jamy, mais aussi à Carl Sagan, dont la série « Cosmos », reprise depuis par Neil deGrasse Tyson, s'est avérée fondatrice dans ma volonté de transmettre les connaissances et de les rendre accessibles à tous. A cet égard, mon monitorat, pendant trois ans, a constitué une expérience

formidable et je souhaite remercier tous les étudiants de L2 (grâce auxquels j'aurais appris l'existence de la Pikachurine, une protéine synaptique impliquée dans la transmission du signal électrique !) et de PACES qui ont assisté à mes TD. J'espère avoir été claire et intéressante et avoir contribué à ma micro-échelle à leur réussite !

La thèse est une longue et souvent difficile odyssee, qui aurait sans doute été insurmontable sans mes amis. Jules, médecin admirable, ta gentillesse incomparable et tes messages (que dis-je ? tes odes) d'anniversaire ont été d'un réconfort inouï pendant ces quatre ans, merci pour tout ce que tu es. Merci à Guillaume, membre fondateur de l'équipe de soutien©, d'avoir réalisé la mise en page de cette thèse (et d'avoir veillé trois nuits pour ça) mais surtout de m'avoir soutenue en permanence, d'avoir partagé mes doutes et d'être une personne formidable (<- affirmation à ne jamais remettre en doute) ! Merci aussi à Nico, Louise, Hugo, Baptiste « BB », Loïc, Rym, Audrey (docteure ès bredele), David et Martin pour les soirées jeux de société/crêpes/foot salvatrices pendant cette thèse ! Merci à mes chers amis lyonnais Ben, Marine et Voisin à qui je n'ai pas consacré suffisamment de temps pendant cette thèse, mais à qui je promets de dédier une bonne partie de mes prochaines vacances ! Merci à Evan (« later ! ») pour ses relectures attentives de mon anglais, et ses soirées foot desquelles Arsenal est malheureusement rarement sorti vainqueur... Enfin, merci à Maud, qui, malgré son activité prenante de maman, a partagé un peu de mon quotidien de thèse avec compréhension. Merci aussi à Léo et Marion pour les chouettes parenthèses à Marseille et Dijon !

Il n'est pas toujours évident pour la famille de comprendre les hauts et les bas de la vie d'un thésard, mais la mienne a été exemplaire. Maman, toujours remarquable d'empathie et soutien sans faille, si j'ai pu acquérir au cours de cette thèse un peu de ta persévérance et de ta détermination alors je serai comblée ! A Papa, il n'a pas toujours été simple pour toi de comprendre mes incertitudes perpétuelles et l'anxiété qu'elles génèrent, parce que tu ne pouvais douter un seul instant de mes « immenses capacités », merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours encouragée avec ton sens de la formule si caractéristique ! Vous êtes, chacun à votre façon, des modèles indiscutables pour moi. Merci à mes incroyables petites sœurs, Raphaëlle et Julie, d'avoir ponctué ma thèse de leur soutien, de leur amour, sans parler des théories cinématographiques foireuses... J'espère éveiller lors de ma soutenance un dixième de la fierté que vous m'inspirez chaque jour ! Merci à mon génial (dans tous les sens du terme) Nonno, à qui je dédie cette thèse, et qui d'un regard comprenait tout de l'expérience doctorale, pour en avoir lui-même réalisé une brillante et encadré de nombreuses. Je suis fière de soutenir cette thèse un peu « sous ton égide » ! Merci aussi à mon adorable Nonna pour ses indispensables cierges, pour ses encouragements permanents et sa bienveillance, à Laurent et Isabelle, sans oublier mes cousins chéris, Simon, Laura et Manon. A ma grand-mère adorée, modèle d'empathie et de dignité, je pense que tu aurais été fière de me voir ici aujourd'hui, devant cette assemblée. A mon grand-père à qui je pense tellement : lors de ma soutenance, je deviendrai vraiment « savante » comme tu dis ! Merci aussi à François, Babey, Marie, Robin et Paoline. Je remercie aussi mes beaux-parents, Véronique et Fernando, ainsi que Raphaël (et Orion !) qui m'ont toujours accueillie avec une immense gentillesse, malgré mon humeur souvent massacrate, et avec qui j'ai partagé des séjours enchantés au Rayol. Merci enfin à mon petit chien Cahuete de m'avoir écouté dire à voix haute mes cours d'immunologie sans en perdre une miette et d'avoir été un compagnon à quatre pattes formidable pendant presque 17 ans.

Enfin, merci à Yannick. Tous ce que je pourrais dire semblera tellement dérisoire en comparaison de l'immensité de ton soutien bienveillant. Nous avons traversé nos thèses ensemble et je n'aurais pu aller au bout de la mienne sans toi. Tu as subi ces années doctorales sans jamais faillir, en supportant mes épisodes de colère et d'anxiété. Je n'ai pas encore atteint ton degré de « lâcher prise », mais j'aspire à acquérir un peu plus chaque jour tes qualités innombrables, ta capacité à relativiser, ton optimisme et ta grandeur d'âme.

RÉSUMÉ

Les **Cellules Dendritiques** conventionnelles (**cDC**) constituent une population de cellules présentatrices d'antigène professionnelles capables d'activer les **Lymphocytes T (LT)** et ainsi, d'initier une réponse immunitaire adaptative. En plus de leur capacité à présenter des antigènes exogènes et endogènes (du soi ou viraux) respectivement *via* les **Complexes Majeurs d'Histocompatibilité** de classe II (**CMH-II**) et de classe I, elles peuvent également capturer, apprêter et présenter des antigènes extracellulaires par le CMH-I. Ce processus, appelé présentation croisée (« *cross-presentation* »), revêt une importance particulière dans le cadre de l'initiation de réponses anti-tumorales.

La présentation croisée d'antigènes extracellulaires par les cDCs (et spécifiquement par la sous-population de cDC CD8+ aussi appelée cDC1) peut être réalisée grâce à deux voies, la voie vacuolaire et la voie cytosolique, majoritaire. Dans cette dernière, les antigènes sont phagocytés/endocytés avant d'être exportés depuis les phagosomes/endosomes vers le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome. Les peptides ainsi générés sont ensuite transférés par les transporteurs TAP dans le réticulum endoplasmique ou dans des compartiments intracellulaires, lieux de leur association aux molécules de CMH-I. Si les contributions du protéasome et des transporteurs TAP à ce processus sont aujourd'hui bien décrites et établies, les mécanismes par lesquels les antigènes sont transférés depuis les endosomes/phagosomes vers le cytosol demeurent mal caractérisés. Deux hypothèses sont proposées pour tenter d'expliquer le déroulement de cette étape clé, et probablement limitante, de la présentation croisée. La première suppose l'implication d'un transporteur tandis que la seconde avance que l'export des antigènes vers le cytosol résulterait d'une perturbation temporaire de la membrane endo/phagosomale. Longtemps rejeté, le modèle de la « rupture membranaire » nécessiterait la mise en œuvre de mécanismes de réparation compensatoires pour contenir les dommages endomembranaires et ainsi préserver la viabilité cellulaire.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont porté sur l'étude de l'implication du complexe **ESCRT-III** (**Endosomal Sorting Complex Required for Transport**), responsable de la réparation des membranes biologiques, dans l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée. Nous avons montré que les cDC CD8+, sous-population la plus efficace en termes d'export et de présentation croisée, présentent un plus grand nombre de dommages intracellulaires que leurs homologues CD11b+ (cDC2), suite à un traitement par une drogue lysosomotropique. Cette susceptibilité accrue quant à la survenue de dommages endomembranaires dans les cDC1 corrèle avec le recrutement de différents composants du complexe ESCRT-III spécifiquement dans les compartiments intracellulaires de cette sous-population de cDC. Par ailleurs, dans une lignée de cDC1, l'extinction de l'expression de Chmp4b ou de Chmp2a, deux sous-unités effectrices du complexe, conduit à une augmentation drastique de l'export cytosolique d'un antigène modèle ainsi qu'à une amélioration spécifique de l'efficacité de la présentation croisée, *in vitro* et *in vivo*. Enfin, au regard de l'implication d'ESCRT-III dans la réparation de dommages membranaires causés par la formation de canaux d'oligomères de la protéine phospho-MLKL au cours de l'induction de la nécroptose, nous avons étudié les interactions entre cette voie de mort cellulaire et l'export cytosolique des antigènes en supposant qu'en l'absence d'ESCRT-III, ces canaux persistent à la membrane (plasmique ou endosomale) et sont à l'origine d'une perméabilité accrue, pouvant expliquer le phénotype d'export cytosolique. A la suite de l'inhibition pharmacologique de RIPK3, la kinase phosphorylant MLKL, nous observons une forte diminution de l'export cytosolique dans les cDC déficientes pour ESCRT-III.

Nos résultats démontrent un rôle majeur de la fonction réparatrice d'ESCRT-III dans la régulation de l'export cytosolique des antigènes et de la présentation croisée. Ils renforcent l'idée selon laquelle les antigènes sont exportés dans le cytosol des cDC à la suite de perturbations membranaires, plutôt que par l'intermédiaire de transporteurs ou de translocons. La découverte de l'importance fonctionnelle d'ESCRT-III dans une voie immunologique illustre la cooptation de mécanismes eukaryotes ancestraux dans des fonctions propres aux vertébrés supérieurs, telles que la mise en place de réponses immunitaires adaptatives.

Mots clés : Cellules Dendritiques, ESCRT, Présentation Croisée, Export Cytosolique, Nécroptose

ABSTRACT

Conventional **Dendritic Cells (cDC)** play a central role in immune homeostasis by linking innate signals to adaptive responses. In addition to their capacity to expose exogenous antigens on **Major Histocompatibility Complex (MHC)** class II molecules or endogenous antigens (derived from self or viral proteins) on MHC class I, they also show a remarkable ability to take-up, process and present extracellular antigens on MHC class I molecules. This process, termed cross-presentation plays a critical role in eliciting **Cytotoxic T Cell (CTL)** responses (*i. e* cross-priming) to tumors and pathogens that do not readily infect cDC.

So far, two main intracellular pathways have been described for cross-presentation, namely the vacuolar and the cytosolic pathways, the latter being predominant in CD8+ cDC (also named cDC1) at homeostasis. The first step of the cytosolic (or classical) pathway resides in the phagocytosis of exogenous antigens that are subsequently exported into the cytosol, where they are processed by the proteasome. The resulting processed antigens can then be channeled through the TAP transporters into the endoplasmic reticulum or into intracellular compartments where they are loaded on MHC class I molecules. While the contributions of the proteasome and TAP transporters to this process are now well established, the way endocytosed antigens gain access to the cytosol remains unclear and is a long-standing matter of controversy, that confronts two main models: transfer through specific transporters or rupture of endocytic membranes and leakage of luminal content. Although the latter hypothesis has been repeatedly dismissed owing to its presumable lack of control, we reasoned that it could only be operational if membrane damages were contained by effective repair, to preserve cell survival.

My PhD work thereby focused on the possible implication of the **ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)** complex, the main repair system for biological membranes, in antigen export to the cytosol during antigen cross-presentation by cDCs. We showed that cDC1, corresponding to the most efficient exporting and cross-presenting cDC subset, display higher amounts of intracellular damages triggered by a lysosomotropic drug, compared to their CD11b+ (also named cDC2) counterparts. This increased susceptibility to intracellular damages in cDC1 correlates with the observed enriched recruitment of ESCRT-III subunits in this cDC subset's endocytic compartments, relatively to cDC2. Additionally, in a cDC1 cell line, silencing of Chmp2a or Chmp4b, two effector subunits of ESCRT-III, enhances cytosolic antigen export, as well as *in vitro* and *in vivo* cross-presentation, without affecting MHC-II presentation. Finally, in the light of recent studies demonstrating that ESCRT-III is repairing steady-state necroptotic damages formed by channels of phospho-MLKL oligomers, we studied interactions between the induction of necroptosis and export to the cytosol in ESCRT-III-silenced cells. We supposed that, in absence of a functional repair system, MLKL channels could persist at biological membranes (plasma or endocytic) and result in increased membrane permeability, possibly explaining the increased antigen export phenotype displayed by ESCRT-III silenced cells. Indeed, following pharmacological inhibition of RIPK3, the kinase phosphorylating MLKL, we observed a strong reduction of antigen export to the cytosol in ESCRT-III-deficient cDCs.

Altogether, these results show a critical role for membrane repair in containing cytosolic antigen export and cross-presentation in cDC. They identify a new fundamental cellular mechanism involved in antigen cross-presentation and strengthen the idea that antigens are exiting intracellular compartments following membrane disruption, rather than through translocons or transporters. The discovery of the functional relevance of ESCRT-III in a key immunological pathway illustrates the fascinating co-option of ancestral cellular mechanisms present in early eukaryotes in new crucial functions specifically carried by higher vertebrates, such as the induction of adaptive immune responses.

Keywords: Dendritic cells, ESCRT, Cross-presentation, Cytosolic Export, Necroptosis

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RESUME	VI
ABSTRACT	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	XII
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	XIV
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	3
1. DE LA RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE A L'INITIATION DES REPONSES IMMUNITAIRES ADAPTATIVES	4
1.1. Reconnaissance et capture de l'antigène	4
1.1.1. Discrimination antigénique initiale et signalisation : rôle des PRRs	4
1.1.2. Capture de l'antigène	6
1.2. Conséquences de l'engagement des récepteurs de l'immunité innée par les cellules dendritiques	7
1.3. Activation des lymphocytes T naïfs par les cellules dendritiques – théorie des 3 signaux	8
1.3.1. Initiation de la réponse T – signaux communs à l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+	8
1.3.2. Différenciation des lymphocytes T CD4+ - signal 3	9
1.3.3. Induction des réponses cytotoxiques CD8+ – rôle des lymphocytes T CD4+	10
2. LA PRÉSENTATION CROISÉE	11
2.1. Une découverte révolutionnaire	11
2.2. Voies cytosolique et vacuolaire de la présentation croisée	12
2.2.1. Identification historique	12
2.2.2. Déroulement intracellulaire de la voie cytosolique	14
2.2.2.1. Export cytosolique des antigènes	14
2.2.2.2. Import et « élagage » des peptides dans les compartiments compétents pour la présentation croisée	21
2.2.2.3. Chargement des peptides dans le réticulum endoplasmique et les endo/phagosomes – question de l'origine du CMH-I	22
2.3. Cellules compétentes pour la présentation croisée	23
2.3.1. Rappels sur les sous-populations de cellules dendritiques chez la souris	24
2.3.2. Spécialisation fonctionnelle des cDC1 pour la présentation croisée	25
2.4. Bases moléculaires de la spécialisation fonctionnelle des cDC1 pour la présentation croisée	27
2.4.1. Capacité exclusive d'export des antigènes dans le cytosol	28
2.4.2. Limitation du potentiel dégradatif des compartiments intracellulaires	29
2.4.3. Ciblage des antigènes vers des compartiments favorables à la réalisation de la présentation croisée	32
2.5. Régulation de la présentation croisée par les récepteurs de l'immunité innée	33
2.5.1. Phase précoce	34
2.5.2. Phase intermédiaire	35
2.5.3. Phase tardive	36
3. REGULATION DE LA PRESENTATION ET DE L'ACTIVATION CROISEE GRACE A L'INDUCTION DES VOIES DE MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES DONNEUSES D'ANTIGENES	37
3.1. Voies de mort cellulaire régulatrices de l'activation croisée	37
3.1.1. La nécrose accidentelle	37
3.1.2. Les voies de mort cellulaire régulées	38

TABLE DES MATIÈRES

3.1.2.1.	Le complexe I, un complexe de survie cellulaire	38
3.1.2.2.	L'apoptose	39
3.1.2.3.	La nécroptose	42
3.1.2.4.	Interconnexions entre voies apoptotique et nécroptotique	45
3.2.	Influence des voies de mort cellulaire sur l'efficacité de l'activation croisée	47
3.2.1.	Les cellules mourantes, sources d'information pour les cellules dendritiques	47
3.2.1.1.	Une source d'antigènes pour la présentation croisée	47
3.2.1.2.	Une source de DAMPs	51
3.2.2.	Régulation de l'activation croisée par les voies de mort cellulaire	52
3.2.2.1.	Une dichotomie initiale apoptose/nécrose	52
3.2.2.2.	Remise en question de la dichotomie apoptose/nécroptose avec la découverte de l'apoptose immunogène	54
3.2.2.3.	La nécroptose définit un nouveau type de mort cellulaire immunogène	56
4.	ESCRT-III, MACHINERIE DE DEFORMATION ET DE REPARATION MEMBRANAIRE	59
4.1.	Recrutement d'ESCRT-III au niveau des membranes biologiques, lieux de son action	60
4.1.1.	Modèle canonique de recrutement d'ESCRT-III : le modèle EMV	61
4.1.1.1.	Structure et fonction d'ESCRT-0 : reconnaissance et recrutement des cargos ubiquitinés	61
4.1.1.2.	ESCRT-I et ESCRT-II : complexes d'initiation du bourgeonnement vésiculaire	62
4.1.2.	Voie alternative de recrutement d'ESCRT-III chez les mammifères : rôle d'Alix	63
4.2.	ESCRT-III, catalyseur de la déformation membranaire	63
4.2.1.	Structure des sous-unités d'ESCRT-III	64
4.2.2.	Le principe d'auto-inhibition	65
4.2.3.	Assemblage d'ESCRT-III au niveau des membranes	66
4.2.4.	Structures tridimensionnelles adoptées par les filaments d'ESCRT-III	68
4.2.4.1.	Spirales planes	68
4.2.4.2.	Tubes protrusifs	69
4.2.4.3.	Tubes fermés par un dôme – cônes	70
4.2.5.	Vps4, agent de dissociation des polymères d'ESCRT-III et de la scission membranaire	70
4.2.6.	Modèles de scission membranaire par ESCRT-III et Vps4	72
4.2.6.1.	Modèle du dôme (« dome model »)	72
4.2.6.2.	Modèle de l'effondrement (« buckling model »)	73
4.3.	Illustration des capacités de déformation membranaire d'ESCRT-III au travers de trois processus physiologiques	74
4.3.1.	Régulation de la signalisation NF- κ B	74
4.3.2.	Contrôle du flux autophagique	75
4.3.3.	Réparation des membranes biologiques	76
4.3.3.1.	Membrane plasmique	76
4.3.3.2.	Enveloppe nucléaire	77
4.3.3.3.	Compartiments endolysosomaux	78
5.	OBJECTIFS DE LA THÈSE	79
RÉSULTATS		81
ARTICLE I: ENDOCYTIC MEMBRANE REPAIR BY ESCRT-III CONTROLS ANTIGEN EXPORT TO THE CYTOSOL DURING ANTIGEN CROSS-PRESENTATION		82

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	83
Abstract	85
Introduction	86
Results	89
Discussion	98
Author contributions	101
Materials and methods	102
References	117
COMMENTAIRES DES REVIEWERS APRÈS PREMIÈRE SOUMISSION À IMMUNITY	121
ARTICLE II : SMALL MOLECULE ENHANCERS OF ENDOSOME-TO-CYTOSOL IMPORT AUGMENT ANTI-TUMOUR IMMUNITY	132
Résumé	133
Abstract	135
Introduction	136
Results	139
Discussion	146
Methods	148
Acknowledgements	159
Author contributions	159
Declaration of Interest	159
References	160
DISCUSSION	163
1. CRITIQUE ET CHOIX DES MODELES ET METHODES EMPLOYES	165
1.1. Modèles cellulaires	165
1.2. Approche perte de fonction et stratégie de « silencing »	167
1.3. Contrôles de l'efficacité du silencing	168
1.4. Tests fonctionnels	169
1.4.1. Rendre compte de la survenue de dommages endomembranaires : observation microscopique des foci galectine-3	169
1.4.2. Quantifier l'export cytosolique des antigènes : principe et limites du test β -lactamase	171
1.4.3. Étudier les conséquences de l'export cytosolique des antigènes : tests fonctionnels de présentation croisée	172
1.5. (Absence de) Modèles <i>in vivo</i> et stratégie compensatoire	172
2. CRITIQUES ET PERSPECTIVES DES RESULTATS OBTENUS	174
2.1. La rupture endomembranaire comme mécanisme d'export cytosolique des antigènes	174
2.1.1. Rappel et discussion des résultats obtenus	174
2.1.2. Origine des dommages endomembranaires	175
2.1.2.1. L'hypothèse lipidique	176
2.1.2.2. L'hypothèse nécroptotique	177
2.1.3. Régulation de l'export cytosolique des antigènes par ESCRT-III : implication de la fonction de réparation membranaire et au-delà	181
2.1.3.1. Remodelage membranaire par ESCRT-III : aspects évolutifs	181
2.1.3.2. Implication possible de l'autophagie canonique et non-canonique dans le phénotype observé d'export cytosolique des antigènes et de présentation croisée	182

TABLE DES MATIÈRES

2.1.3.3. Trafic des complexes CMH-I/peptide et dégradation	184
2.2. ESCRT-III comme possible régulateur central de la biologie des cellules dendritiques	185
2.2.1. Mutations d'ESCRT-I et III chez l'homme : cas des cellules tumorales et des neurones	185
2.2.2. Cycle et durée de vie des cellules dendritiques	186
2.2.3. Vers un modèle spéculatif global de régulation de la fonction des cDC1 par ESCRT-III	188
2.3. Conclusion générale	189
RÉFÉRENCES	191
ANNEXES	217

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique	EAP: ELL-Associated Protein
ALG-2: Apoptosis-Linked Gene 2 Protein	EEA1: Early Endosome Antigen 1
Alix: ALG-2-Interacting Protein X	EMV: Endosomes Multi-Vésiculés
AMSH: Associated Molecule With The SH3 Domain Of STAM	ERAD: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
Apaf1: Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	ERAP: Endoplasmic Reticulum-associated AminoPeptidase
ARN: acide ribonucléique	ERGIC: Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment
Asah1/2: N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1/2	Erp57: Endoplasmic Reticulum Resident Protein 57
ATG5/7/12/16: Autophagy Related 5/7/12/16	ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
ATP: adenosine triphosphate	ExoA: Exotoxin A
Bak: BCL2 Antagonist/Killer	FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
Batf3: Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3	FcγR: Fc gamma Receptor
Bax: BCL2 Associated X	FKBP: FK506-binding protein
BFA: Brefeldine A	FoxP3: Forkhead Box P3
BMDC: Bone-Marrow Derived Dendritic Cells	FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
BSA: Bovine Serum Albumin	Gag: Group-specific antigen
CCL19/21: C-C Motif Chemokine Ligand 19/21	GATA3: GATA Binding Protein 3
CCR7: C-C Motif Chemokine Receptor 7	GILT: Gamma-interferon-Inducible Lysosomal Thiol reductase
CD: Cluster of Differentiation	GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
cDC: conventional Dendritic Cells	GTP: guanosine triphosphate
Cep55: Centrosomal Protein 55	HIV-1: Human Immunodeficiency Virus 1
cFLIP: cellular FLICE-like inhibitory protein	HMGB1: High Mobility Group Box 1
Chmp: Charged multivesicular body protein	Hrd1: HMG-CoA Reductase Degradation 1 Homolog
cIAP1/2: cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2	HRP: Horseradish Peroxidase
Clec9a: C-Type Lectin Domain Containing 9A	Hrs: HGF-Regulated tyrosine kinase Substrate
CMH/MHC: Complexe Majeur d'Histocompatibilité / Major Histocompatibility Complex	Hsp70/90: Heat Shock Protein 70/90
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	ICAM1/2: Inter-Cellular Adhesion Molecule-1/2
CPA/APC: Cellule Présentatrice d'Antigène/Antigen Presenting Cell	ICP47: Infected cell protein 47
CXCL1/2/5/8: C-X-C Motif Chemokine Ligand 1/2/5/8	IRAP: Insulin-Regulated AminoPeptidase
CTL: Cytotoxic T Lymphocyte	IκB: Inhibitor of kappa B
DAMP: Danger-Associated Molecular Pattern	IFN: Interferon
DC: Dendritic Cells	IKKα/β/γ/ε: Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit α/β/γ/ε
Der1: Derlin-1	IL: Interleukine
DMSO: Dimethylsulfoxyde	IRAK1/2/4: Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1/2/4
DPP-3: dipeptidyl peptidase 3	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

IRF3/4/8: Interferon Regulatory Factor 3/4/8	SHP-1: Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-1
KO: Knock-Out	Siglec-G: Sialic Acid Binding Lectin G
LAP: LC3-Associated Phagocytosis	siRNA: small interfering RNA
LC3B: Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	SIRP α : Signal Regulatory Protein Alpha
LIP5: LYST-Interacting Protein 5	SNAP23: Synaptosome Associated Protein 23
LFA-1: Lymphocyte Function associated Antigen-1	STAM1/2/: Signal Transducing Adaptor Molecule 1/2
LLOME: L-Leucyl-L-Leucine methyl ester	TAB1/2/3: Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1 Binding Protein 1/2/3
LN: Lymph Node	TAK1: Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1
LPS: Lipopolysaccharide	TAP 1/2: Transporter Associated with Antigen Processing 1/2
LRP-1: LDL Receptor Related Protein 1	Tbet: T-Box Expressed in T Cells
LT β R: Lymphotoxin β Receptor	TBK1: TANK Binding Kinase 1
LUBAC: Linear Ubiquitin Assembly Complex	TCR: T-Cell Receptor
MIM: MIT Interacting Motif	TFEB: Transcription Factor EB
Mincle: Macrophage inducible Ca ²⁺ -dependent lectin receptor	TGF- β : Transforming Growth Factor β
MIT: Microtubule Interacting and Transport	Th: T helper
MLKL: Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase	Tim-3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
MVB: MultiVesicular Bodies	TLR: Toll-Like Receptor
Mvb12: Multivesicular Body Subunit 12	TNF: Tumor Necrosis Factor
MyD88: Myeloid Differentiation primary response 88	TNFR1: TNF Receptor 1
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (forme réduite)	TNP: trinitrophenyl
NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	TOP-1: thimet oligopeptidase 1
NLR: NOD-Like Receptor	TRADD: TNFRSF1A Associated via Death Domain
NOX2: NADPH Oxydase 2	TRAF6: TNF Receptor-Associated Factor 6
OVA: Ovalbumine	TRAIL: Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
P2RY2 : Purinergic Receptor P2Y2	Treg: Lymphocyte T Régulateur
PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern	TRIF: TIR-domain containing adapter-Inducing interferon- β
PANX1: Pannexin 1	TSG101: Tumor Susceptibility Gene 101
pCMH: peptide-CMH	UBPY: Ubiquitin Isopeptidase Y
pDC : plasmacytoid Dendritic Cells	UTP: uridine triphosphate
PI(3)P : phosphatidylinositol -3-phosphates	VAMP8: Vesicle Associated Membrane Protein 8
PRR: Pathogen Recognition Receptor	Vps: Vacuolar protein sorting
RIPK1/3: Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1/3	Vta1: Vesicle Trafficking 1
RRL: RIG-Like Receptor	XCR1: X-C Motif Chemokine Receptor 1
ROR γ T: RAR-related Orphan Receptor gamma T	YTHDF1: YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 1
ROS: Reactive Oxygen Species	
SAP130: Sin3A Associated Protein 130	
shARN: small hairpin ARN	

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Introduction

Figure I.1.1. : Diversité des localisations subcellulaires des différents PRRs

Tableau I.1.1. : Diversité des ligands PAMPs reconnus par les PRRs

Figure I.1.2. : Voies de signalisation induites en aval des TLRs

Figure I.1.3. : Théorie des trois signaux et polarisation des lymphocytes T CD4+

Figure I.1.4. : Activation des lymphocytes T CD8+

Figure I.2.1. : Principe des travaux fondateurs de Michael Bevan à l'origine de la découverte de la présentation croisée

Figure I.2.2. : Voie vacuolaire de la présentation croisée

Figure I.2.3. : Voie cytosolique de la présentation croisée

Figure I.2.4. : Hypothèses pour le déroulement de l'export cytosolique des antigènes

Figure I.2.5. : Ontogénie des cellules phagocytaires mononuclées chez la souris

Figure I.2.6. : Régulation du pH et du potentiel dégradatif des compartiments intracellulaires dans les cDC1 et cDC2

Figure I.3.1. : Complexes de mort cellulaire activés en aval de TNFR1

Figure I.3.2. : Carte des modifications post-traductionnelles, activatrices et inhibitrices, de RIPK1 chez l'homme et la souris

Figure I.3.3. : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

Figure I.3.4. : Formation du nécrosome et activation de MLKL

Figure I.3.5. : Caractéristiques morphologiques de la nécroptose

Figure I.3.6. : Types de molécules libérées lors de l'induction des voies de mort cellulaire

Figure I.3.7. : Mécanismes d'induction de la tolérance par les cellules apoptotiques en conditions « stériles »

Figure I.3.8. : Un code immunogène à l'origine des propriétés immunostimulatrices de certains types de mort cellulaire (apoptose, nécroptose)

Figure I.3.9. : Constructions utilisées dans l'étude à l'origine de la découverte de la nécroptose comme mort cellulaire immunogène

Figure I.4.1. : Stratégies de réparation des dommages membranaires

Tableau I.4.1. : Complexes ESCRT et protéines associées chez la levure et les mammifères

Figure I.4.2. : Structure et assemblage des complexes ESCRT-I et II

Figure I.4.3. : Voies alternatives de recrutement d'ESCRT-III chez les mammifères

Figure I.4.4. : Structure des sous-unités d'ESCRT-III

Figure I.4.5. : Structure « fermée » (autoinhibée) et « ouverte » (active) de Chmp4b

Figure I.4.6. : Structures formées par les filaments d'ESCRT-III

Figure I.4.7. : Modèle proposé de constriction des spirales par Vps4

Figure I.4.8. : Structure et fonctionnement proposé pour Vps4

Figure I.4.9. : Modèle du dôme (exemple de la cytokinèse)

Figure I.4.10. : Modèle de l'effondrement

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure I.4.11. : Régulation de la signalisation NF- κ B par ESCRT-III

Figure I.4.12. : Fermeture du phagophore par ESCRT-III

Figure I.4.13. : Réparation des dommages (ici nécroptotiques) touchant la membrane plasmique par ESCRT-III

Figure I.4.14. : Reformation/réparation de l'enveloppe nucléaire par ESCRT-III

Résultats :

Article I (R.1): Endocytic membrane repair by ESCRT-III controls antigen export to the cytosol during cross-presentation

Figure R.1.1.: ESCRT-III subunits are enriched in damage-prone cross-presenting CD8⁺ cDC1

Figure R.1.2.: ESCRT-III-silenced cDCs display increased antigen export to the cytosol

Figure R.1.3.: ESCRT-III-mediated increased antigen export to the cytosol is cell-intrinsic

Figure R.1.4.: ESCRT-III is recruited to damaged intracellular compartments and limits antigen export to the cytosol

Figure R.1.5.: ESCRT-III silencing enhances cross-presentation

Figure R.1.6.: ESCRT-III controls cross-presentation both *in vitro* and *in vivo*

Figure R.1.7.: RIPK3 inhibition restricts antigen export to the cytosol in ESCRT-III-deficient dendritic cells

Figure RS.1.1.: Characterization of galectin-3 damages in cDC1 and cDC2 splenic dendritic cells

Figure RS.1.2.: Phenotype of ESCRT-III silenced cDCs

Figure RS.1.3.: Defects in antigen degradation in ESCRT-III-silenced cells are unlikely to account for the increased exporting phenotype

Figure RS.1.4.: Pre-activation of ESCRT-III or control MutuDC with HMW polyI:C does not lead to drastic changes in antigen export to the cytosol or cross-presentation

Figure RS.1.5.: Phenotype of co-cultured cells

Figure RS.1.6.: Phenotype and maturation of Chmp4b-mCherry MutuDCs in presence or absence of ATP

Figure RS.1.7.: *In vitro* cross-presentation of OVA-coated beads and MHC-I expression in ESCRT-III-silenced or control MutuDC

Figure RS.1.8.: ESCRT-III silencing induces late apoptosis and pyroptosis

Figure Rev.1.1: Cross-presentation of endotoxin-contaminated OVA by control MutuDC

Figure Rev.1.2: Cross-presentation of soluble and bead-coated endotoxin-free OVA in presence or absence of MG-132

Figure Rev.1.3: Heatmap based on transcriptomic RNAseq data (in BMDCs)

Article II (R.2): Small molecule enhancers of endosome-to-cytosol import augment anti-tumour immunity

Figure R.2.1.: Small molecule screen to identify enhancers of antigen import into the cytosol

Figure R.2.2.: Organellar mapping in dendritic cells

Figure R.2.3.: Dynamic organellar mapping to identify the subcellular changes in protein distribution upon drug treatment

Figure R.2.4.: Prazosin and tamoxifen lead to lysosomal leakage

Figure R.2.5.: Antigen import enhancement is a consequence of lysosomal trapping

Figure R.2.6.: Prazosin enhances cross-presentation and cross-priming

Figure RS.2.1.: Chemical structures of the ERAD inhibitors and of selected active and non-active quinazolinimine tested in this study

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure RS.2.2.: Summary of the EC50 plots from the secondary screen

Figure RS.2.3.: Sample output from the dc-biology.mrc-lmb.cam.ac.uk web tool for a selected gene, Tap1

Figure RS.2.4.: Whole cell protein expression levels in MutuDCs

Figure RS.2.5.: Prazosin modified with BODIPY is active in the antigen import assay

Discussion :

Figure D.2.1: Modèle comparative du rôle d'ESCRT-III dans les cDC1 et cDC2

Figure D.2.2: Conservation évolutive des sous-unités d'ESCRT chez les Eucaryotes

Figure D.2.3: Diminution de l'expression d'ESCRT après stimulation au LPS dans des BMDCs

Figure D.2.4: Modèle spéculatif de la régulation de la fonction des cDC1 par ESCRT-III

AVANT-PROPOS

Le système immunitaire des mammifères est composé de multiples types cellulaires qui œuvrent de façon coordonnée dans le temps et dans l'espace, afin de produire une réponse immune efficace et adaptée au type de menace rencontré. Au sein de ce système complexe, les cellules dendritiques jouent un rôle majeur. Présentes dans tous les tissus de l'organisme, elles constituent non seulement le premier relais de l'information immunologique mais conditionnent également le type de réponse mis en œuvre. Ces fonctions sont initiées par la reconnaissance et la capture d'antigènes en vue de leur présentation aux cellules effectrices de l'immunité, les lymphocytes T. La compréhension fondamentale des mécanismes à l'origine de l'apprêtement des antigènes par les cellules dendritiques constitue donc un aspect central de l'immunologie. Mon travail de thèse a porté sur l'un de ces mécanismes, appelé présentation croisée. Ce processus, finement régulé, est crucial dans l'induction de réponses immunes cytotoxiques protectrices dans des contextes aussi bien infectieux que tumoraux. Cependant, son déroulement intracellulaire, complexe, demeure en grande partie méconnu ou sujet à controverse. Ces incertitudes concernent notamment une étape limitante de la présentation croisée au cours de laquelle les antigènes, piégés dans les compartiments endocytiques, rejoignent le cytosol pour y être dégradés.

Les questionnements soulevés par l'existence de cette « zone d'ombre » de la présentation croisée m'ont conduit à reconsidérer une hypothèse ancienne qui propose que l'export des antigènes est médié, non pas par un transporteur, comme actuellement admis, mais par une rupture temporaire de la membrane limitante du compartiment endocytique. Longtemps rejetée et discréditée en raison d'un manque supposé de contrôle, cette hypothèse requiert un examen nouveau à la lumière de la découverte récente de mécanismes de maintien de l'intégrité membranaire. Ces résultats impliquent une machinerie multimoléculaire originale, appelée ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), et connue de longue date pour sa fonction de régulation du trafic intracellulaire.

Au cours de ma thèse, j'ai donc étudié la possible contribution de cette machinerie à l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée par les cellules dendritiques. Je commencerai cette introduction en rappelant brièvement les fonctions des cellules dendritiques dans l'initiation des réponses immunitaires (**Partie 1**). Je réaliserai ensuite un état des lieux des connaissances et incertitudes au sujet des mécanismes intracellulaires de la présentation croisée dans les cellules dendritiques (**Partie 2**). L'efficacité de ce processus est régulée non seulement au sein des cellules dendritiques, mais également en amont, dans les cellules donneuses d'antigènes, grâce aux voies de mort cellulaire. Je m'attacherai donc, dans une **Partie 3**, à l'examen des modalités de contrôle de la présentation croisée par les grandes voies de mort cellulaire. Nous verrons enfin que l'exécution de ces dernières est influencée par l'action d'ESCRT-III, ce qui me permettra d'explorer plus en détail la structure et le fonctionnement de cette machinerie unique de déformation et de réparation membranaire (**Partie 4**) dont l'analyse de l'implication dans la présentation croisée a représenté l'essentiel de mon travail de thèse.

L'investigation du rôle d'ESCRT-III dans la régulation de l'export cytosolique des antigènes et de la présentation croisée a été conduite majoritairement *in vitro*, dans une lignée de cellules dendritiques murines et sera présentée dans la section **Résultats** de cette thèse.

Enfin, les modèles d'étude et méthodologies utilisés seront discutés dans la partie finale, qui sera également l'occasion de recontextualiser les résultats obtenus à la lumière de la littérature et des découvertes actuelles.

INTRODUCTION

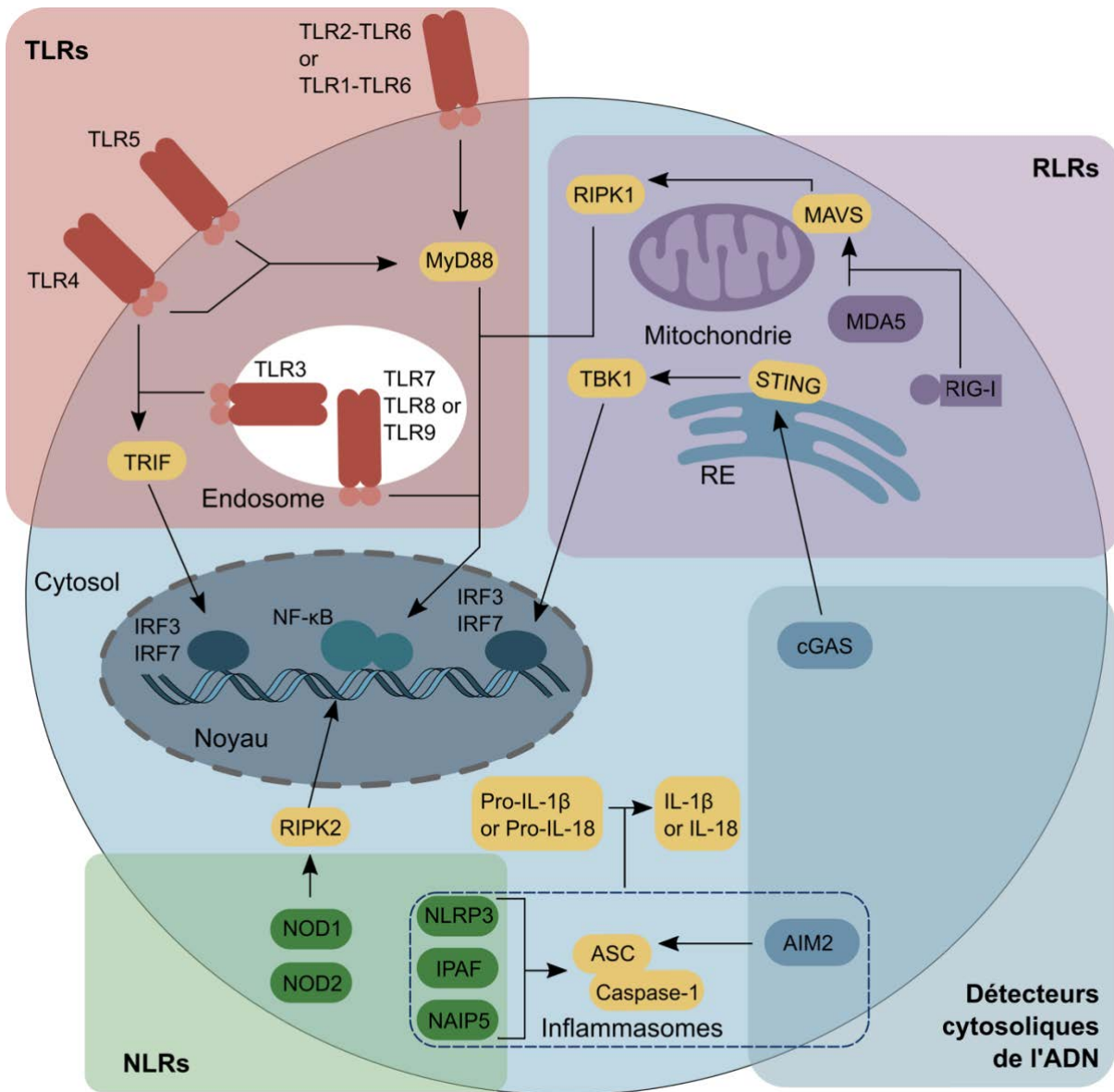


Figure I.1.1. : Diversité des localisations subcellulaires des différents PRRs.

Les PRRs se répartissent en 4 classes de récepteurs (TLRs, RLRs, NLRs et détecteurs cytosoliques de l'ADN) dont les membres les mieux caractérisés sont représentés ici. Si les TLRs sont membranaires et se répartissent entre les membranes plasmique et endosomale, les NLRs, RLRs et senseurs de l'ADN sont localisés dans le cytosol depuis lequel ils induisent, par l'intermédiaire d'adaptateurs (en jaune), différentes voies de signalisation. Schéma adapté et simplifié depuis Cao (2016).

1. DE LA RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE A L'INITIATION DES REPONSES IMMUNITAIRES ADAPTATIVES

L'identification morphologique et fonctionnelle des cellules dendritiques a débuté avec les travaux fondateurs de Ralph Steinman, Prix Nobel de Médecine et de Physiologie 2011 (Steinman and Cohn, 1973; Steinman and Witmer, 1978). Ces cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, caractérisées par l'émission de longs prolongements membranaires mobiles, jouent un rôle de sentinelle au sein des tissus périphériques où elles sont capables de détecter des menaces, puis d'y répondre en initiant une réponse immunitaire adaptative dans les organes lymphoïdes secondaires.

1.1. Reconnaissance et capture de l'antigène

1.1.1. Discrimination antigénique initiale et signalisation : rôle des PRRs

Grâce à un arsenal extrêmement large de récepteurs, les cellules dendritiques ont non seulement la faculté de différencier le « soi » du « non-soi », c'est-à-dire des pathogènes, mais également de détecter des perturbations de l'homéostasie, à l'origine de l'émission de molécules de danger appelées DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns). Ces deux types de signaux sont reconnus par des récepteurs, les PRR (Pattern Recognition Receptors) et conduisent à l'activation des cellules dendritiques. Je reviendrai plus longuement sur la nature de certains récepteurs particuliers liant les DAMPs dans la partie 3.2.1.2., consacrée aux signaux émis par les cellules mourantes, et choisis ici de me concentrer sur les PRR liant les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern), des motifs de reconnaissance associés aux pathogènes.

Au cours de l'évolution, les PRRs ont connu une large diversification, tant au niveau de la nature des PAMPs reconnus (Tableau I.1.1.), qu'au niveau de leur distribution subcellulaire (Figure I.1.1.). On distingue quatre grandes classes de PRRs :

- les TLRs (Toll-like Receptors), récepteurs transmembranaires dont certains reconnaissent également des DAMPs,

	Récepteur	Ligand	Organisme détecté	Agoniste synthétique
TLRs	TLR1-TLR2	Peptidoglycane, lipoprotéines	Bactéries	Pam ₃ CSK ₄
	TLR2-TLR6	Lipoprotéines	Bactéries	Pam ₂ CSK ₄
	TLR3	ARN double brin	Virus	PolyI:C
	TLR4	LPS Mannane HMGB1	Bactéries Gram ⁻ Levures Cellules mourantes	
	TLR5	Flagelline	Bactéries flagellées	
	TLR7	ARN simple brin	Virus Bactéries Cellules du soi	Imiquimod R-848
	TLR9	Dinucléotides CpG non-méthylés	Virus Bactéries Protozoaires Cellules du soi	CpG-ODN
RLRs	RIG-I	ARN double brin	Virus	Poly(dA/dT) PolyI:C
	MDA5	ARN double brin	Virus	PolyI:C
NLRs	NOD1	Acide mésodiaminopimelique (composant du peptidoglycane)	Bactéries	
	NOD2	Muramyl dipeptide (composant du peptidoglycane)	Bactéries	
Détecteurs cytototoxiques de l'ADN	cGAS	ADN double brin	Virus Bactéries Cellules du soi	
	AIM2	ADN double brin	Virus Bactéries Cellules du soi	

Tableau I.1.1. : Diversité des ligands PAMPs reconnus par les PRRs

Ce tableau représente les principaux ligands (majoritairement de nature microbienne même si certains peuvent aussi être émis par des cellules du soi en situation de danger – on les qualifie alors de DAMPs) reconnus par les différentes classes de PRRs. Le code couleur est identique à celui de la Figure I.1.1.

INTRODUCTION

- les NLRs (NOD-like Receptors) récepteurs cytosoliques responsables de l'activation de l'inflammasome,
- les RLRs (RIG-like receptors), une seconde catégorie de PRRs cytosoliques
- les senseurs cytosoliques de l'ADN.

Dans cette partie, en raison de l'exploitation des TLRs dans ma démarche expérimentale et de l'implication des voies activées en aval de ces récepteurs dans d'autres processus biologiques d'intérêt, comme les voies de mort cellulaire (décrites en partie 3.1.2.3.), je choisis ici de décrire plus particulièrement le fonctionnement de cette classe de PRRs, avec l'exemple type du TLR4.

Le TLR4, liant le lipopolysaccharide (LPS) bactérien ainsi que certains DAMPs, présente de nombreuses particularités. Situé au niveau de la membrane plasmique, ce récepteur, lorsqu'il lie son ligand, migre vers la membrane endosomale et signale, sous forme dimérique, par l'intermédiaire de deux adaptateurs moléculaires, MyD88 et TRIF, quand les autres TLRs engagent exclusivement l'une ou l'autre de ces protéines (Figure I.1.2.). L'association initiale de TLR4 avec MyD88 ou TRIF conditionne la nature de la réponse inflammatoire induite. Ainsi, l'engagement de MyD88 conduit au recrutement et à l'activation des kinases IRAK 1, 2 et 4, elles-mêmes support de l'activation de l'ubiquitine ligase TRAF6. L'association de TRAF6 avec le complexe formé de TAK1, TAB1, TAB2 et TAB3, médiée par la poly-ubiquitination de TRAF6, culmine en l'activation de la kinase TAK1. TAK1 phosphoryle ensuite IKK β , la sous-unité du complexe IKK (qui comprend également IKK α et IKK γ aussi appelé NEMO) responsable de l'ajout d'un groupement phosphate sur l'inhibiteur cytoplasmique I κ B. Cet évènement déclenche l'ubiquitination d'I κ B et sa dégradation, synonymes d'une levée de l'inhibition sur la voie NF- κ B, à l'origine de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. NF- κ B peut également être activée par l'intermédiaire de TRIF : dans ce cas, l'activation du complexe TAK1 repose sur la kinase RIPK1 (Figure I.1.2.), directement recrutée par TRIF (à noter que nous reparlerons du rôle charnière de cette kinase dans l'articulation de la balance entre signaux de survie associés à NF- κ B et signaux de mort dans la partie 3.1.2.1.)

En aval de TLR4, l'adaptateur TRIF participe également à une voie de signalisation parallèle qui met en jeu l'activation du complexe TBK1/IKK ϵ par TRAF3 (Figure I.1.2.). En conséquence, le complexe TBK1/IKK ϵ phosphoryle le facteur de transcription IRF3, ce qui

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.1.2. : Voies de signalisation induites en aval des TLRs

La liaison de leurs ligands respectifs par les TLRs provoque le recrutement, depuis la membrane plasmique ou endosomale, de différents complexes dont l'activation successive conduit à l'induction de grandes voies de signalisation. Ces dernières culminent en la translocation nucléaire de différents facteurs de transcription (comme NF- κ B ou IRF3 et 7), responsables de l'activation de gènes cibles codant entre autres pour des cytokines pro-inflammatoires ou pour les interférons de type I (O'Neill *et al.*, 2013).

déclenche la relocalisation nucléaire de ce dernier et l'induction de l'expression des gènes codant pour l'interféron (IFN) de type I, crucial dans les réponses antivirales.

Si les PRRs permettent aux cellules dendritiques de discriminer les organismes sources d'antigènes, qu'il s'agisse de pathogènes (dans le cas de la reconnaissance de PAMPs) ou de cellules du soi en condition de stress (dans un contexte de liaison aux DAMPs), leur capacité d'internalisation des antigènes, une fois reconnus, est médiée, en partie, par une autre classe de récepteurs.

1.1.2. Capture de l'antigène

La capture des antigènes se déroule selon trois grandes modalités, la macropinocytose, l'endocytose et la phagocytose, influencées notamment par la taille et la nature des particules ingérées. À l'instar des macrophages, les cellules dendritiques immatures réalisent de façon constitutive la macropinocytose, c'est-à-dire l'internalisation non-spécifique de larges quantités de fluides extra-cellulaires et des antigènes solubles qu'ils contiennent (Norbury *et al.*, 1997). L'endocytose, comme la macropinocytose, permet la capture d'antigènes solubles, mais cette dernière s'opère de façon spécifique, par l'intermédiaire de la liaison d'antigènes à certains récepteurs. De façon similaire, la phagocytose est également facilitée par l'expression de ces récepteurs, mais permet l'internalisation d'antigènes particulaires de taille plus importante, souvent insolubles. Certains de ces récepteurs d'endocytose sont particulièrement intéressants, dans le sens où ils assurent le couplage de la reconnaissance de l'antigène et son internalisation. C'est notamment le cas de DEC-205, qui reconnaît les cellules mourantes (Shrimpton *et al.*, 2009), ou encore des récepteurs au fragment Fc, capables de lier les pathogènes opsonisés, c'est-à-dire recouverts d'anticorps.

L'expression simultanée par les cellules dendritiques de récepteurs d'endocytose mais également de divers PRRs associe la reconnaissance des antigènes et leur capture à l'induction de voies de signalisation, comme NF- κ B. L'activation de ces voies transforme en profondeur la physiologie des cellules dendritiques en vue de potentialiser leur capacité de présentation des peptides antigéniques sur les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH-I) et de classe II (CMH-II).

1.2. Conséquences de l'engagement des récepteurs de l'immunité innée par les cellules dendritiques

L'engagement par les cellules dendritiques des récepteurs de l'immunité innée concourt à un processus global de maturation qui affecte différents aspects de leur biologie.

La signalisation TLR contribue tout d'abord à l'induction de l'expression du récepteur CCR7. En liant les chimiokines CCL19 et CCL21 produites par le tissu lymphoïde, CCR7 favorise la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques, lieux d'activation des lymphocytes T. La maturation des cellules dendritiques s'accompagne également d'une diminution de leur potentiel endocytique corrélée à une augmentation de leur capacité de présentation antigénique. Cette dernière se traduit notamment par l'élévation de l'expression des molécules du CMH de classe I et II, et des molécules de costimulation CD80 et CD86 (à noter que cette propriété d'induction de la costimulation par les ligands TLRs sera exploitée expérimentalement dans les tests de présentation antigénique). Enfin, l'induction des voies de signalisation en aval des TLRs conduit à la sécrétion d'un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'interleukine (IL)-12 ou l'interleukine-6, nécessaires à la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ en différentes sous-populations fonctionnelles (voir 1. 3. 2). Ainsi, à leur entrée dans les organes lymphoïdes secondaires par les vaisseaux lymphatiques afférents, les cellules dendritiques sont pleinement compétentes pour l'activation des lymphocytes T naïfs.

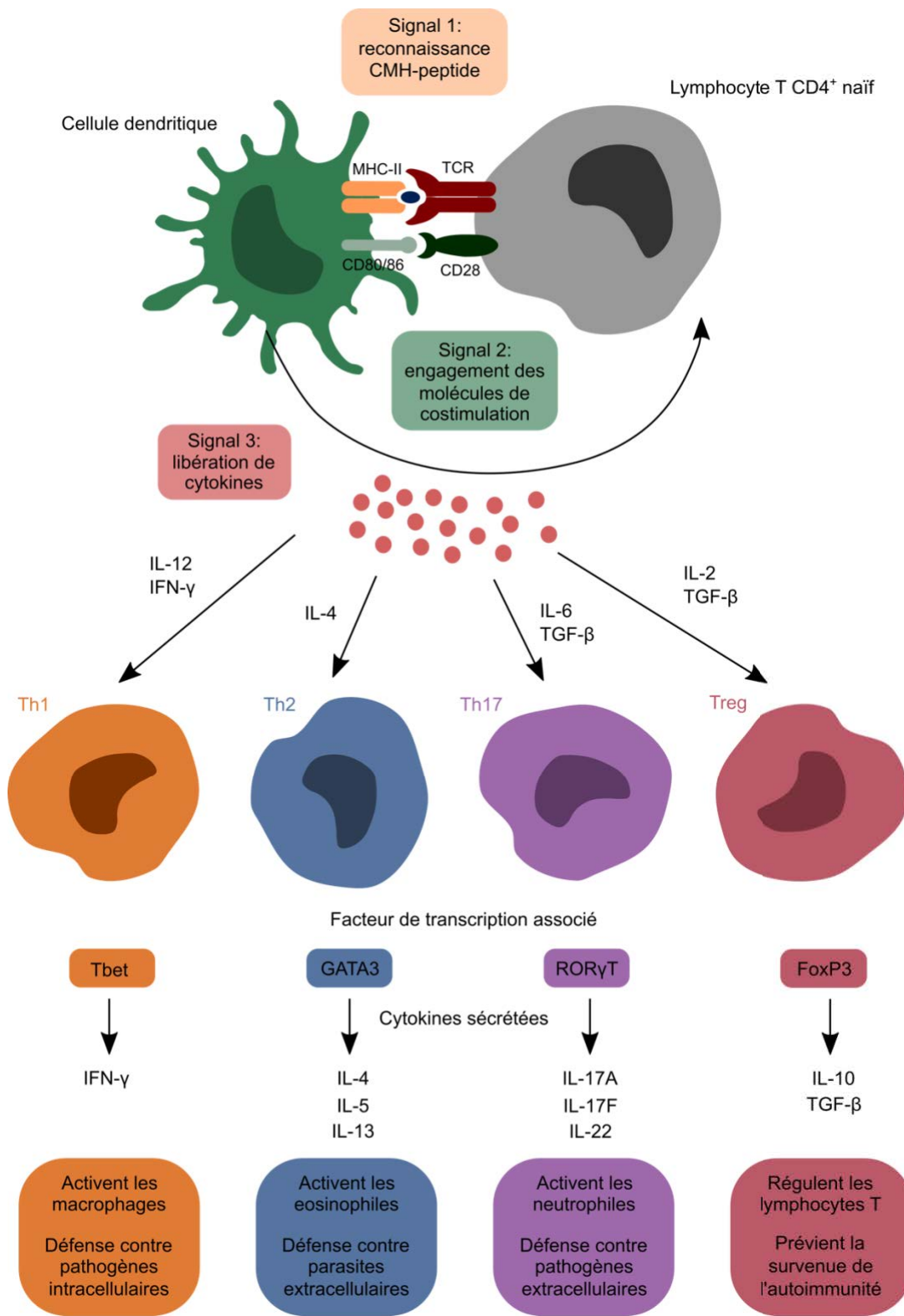


Figure I.1.3. : Théorie des trois signaux et polarisation des lymphocytes CD4+

La partie supérieure de la figure illustre les deux ou trois signaux à l'origine de l'activation des lymphocytes T CD4+ (dans ce cas le signal 1 correspond à l'engagement du complexe CMH-I/peptide par le TCR) et CD4+, respectivement. Les quatre principaux sous-types de lymphocytes T CD4+ auxiliaires, ainsi que les cytokines nécessaires à l'acquisition de leur phénotype effecteur, sont représentés dans la moitié basse de cette figure.

1.3. Activation des lymphocytes T naïfs par les cellules dendritiques – théorie des 3 signaux

1.3.1. Initiation de la réponse T – signaux communs à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

Au cours de leur migration à travers la région paracorticale du ganglion lymphatique, les lymphocytes T naïfs rencontrent une multitude de cellules dendritiques avec lesquelles ils interagissent transitoirement, par l'intermédiaire des molécules d'adhésion LFA-1 et CD2 qui engagent respectivement ICAM1/2 et CD58 sur les CPA. Cette liaison temporaire permet aux lymphocytes T de cribler un grand nombre de complexes CMH-peptides (pCMH), à la recherche de celui reconnu spécifiquement par leur Récepteur T à l'antigène (TCR). Alors que la reconnaissance de peptides par le TCR des lymphocytes T CD4⁺ est restreinte au CMH-II, les lymphocytes T CD8⁺ lient les peptides antigéniques dans un contexte CMH-I. Cette caractéristique de la reconnaissance pCMH-TCR a servi de support théorique au développement de clones T de spécificité peptidique connue. Nos expériences de présentation antigénique (voir partie **Résultats**) se basent notamment sur l'utilisation de lymphocytes T CD4⁺ OT-II et T CD8⁺ OT-I (ou alternativement, sur utilisation de l'hybridome CD8⁺ B3Z) dont les TCR reconnaissent spécifiquement et respectivement des peptides dérivés de l'antigène modèle ovalbumine (OVA₃₂₃₋₃₃₉ ou OVA₂₅₇₋₂₆₄) dans un contexte CMH-II ou CMH-I.

L'interaction spécifique pCMH-TCR, qui constitue le premier signal d'activation que la CPA fournit au lymphocyte T, est néanmoins insuffisante pour assurer la différenciation en cellules T effectrices. L'expansion clonale requiert en effet un second signal fourni principalement par la liaison de CD28 aux molécules de costimulation CD80/CD86 présentes à la surface des cellules dendritiques. Chez les lymphocytes T CD4⁺, ce second signal conduit non seulement à l'expression du ligand de CD40 (CD40L), mais aussi à celle du récepteur de forte affinité de l'IL-2 et à la sécrétion de cette cytokine. La fixation de l'IL-2 à son récepteur, de façon autocrine ou paracrine, assure précocement la survie et la prolifération des lymphocytes T.

Par la suite, les signaux 1 et 2 sont d'une part, complétés par un signal cytokinique (signal 3), nécessaire à la différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4⁺ (Figure I.1.3.,

panel du haut), et d'autre part, renforcés par l'action des lymphocytes T CD4+ requise, en règle générale, pour l'induction de la capacité cytotoxique des lymphocytes T CD8+.

1.3.2. Différenciation des lymphocytes T CD4+ - signal 3

Au cours de leur maturation, les cellules dendritiques sécrètent une grande diversité de cytokines, à l'origine de la spécialisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4+ selon 4 sous-types principaux : les lymphocytes Th₁, Th₂, Th₁₇ et T_{reg} (Figure I.1.3., panel du bas). Brièvement, sous l'effet de l'IL12 et de l'IFN- γ , les lymphocytes T CD4+ acquièrent un phénotype dit « Th₁ » caractérisé par l'expression du facteur de transcription Tbet et la sécrétion massive d'IFN- γ , et donc spécialisé dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires (bactéries, virus, parasites). La sous-population Th₂ est quant à elle impliquée dans les réponses antiparasitaires (parasites extracellulaires de type helminthes) par l'intermédiaire de la libération d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 sous le contrôle du facteur de transcription Gata3. Enfin, la réponse pro-inflammatoire Th₁₇ repose sur l'expression du facteur de transcription ROR γ T, responsable de la libération d'IL-17 et IL-22. Ces molécules agissent notamment sur les cellules épithéliales pour induire la production de cytokines (GM-CSF), de chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8) et de mucines, et participent ainsi à la défense contre les bactéries extracellulaires. Contrairement aux sous-populations effectrices sus-décrites, les T_{reg}, identifiés grâce au facteur de transcription FoxP3, exercent une fonction anti-inflammatoire en supprimant les réponses effectrices des lymphocytes T par des mécanismes complexes et encore incomplètement élucidés.

Si les lymphocytes T CD4+ contribuent largement à l'orchestration et à la modulation des réponses immunes en périphérie, ils constituent aussi le support de l'activation des lymphocytes T CD8+ dans les organes lymphoïdes secondaires.

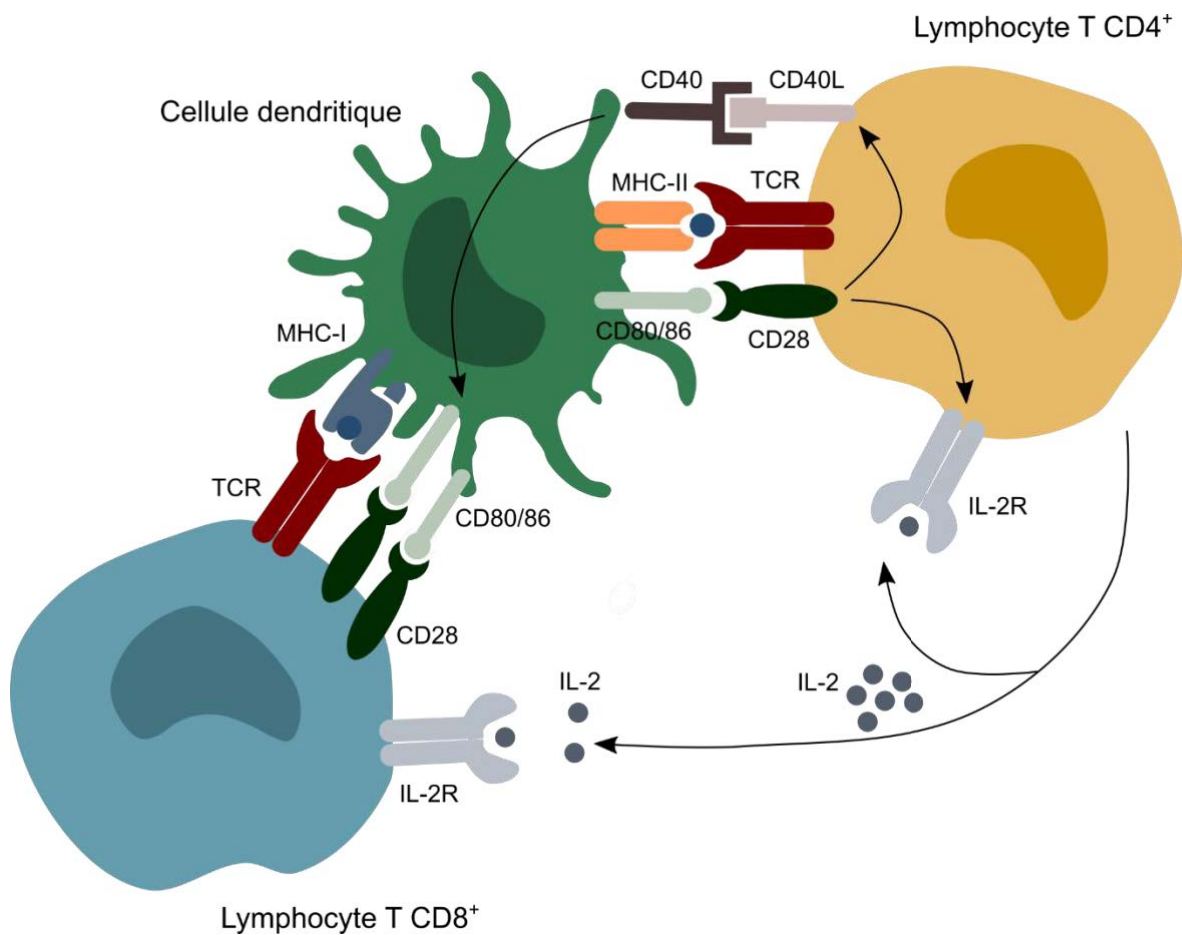


Figure I.1.4. : Activation des lymphocytes T CD8+

L'engagement des molécules de costimulation par les lymphocytes T CD4+ induit l'expression de CD40L à la surface de ces mêmes lymphocytes. L'interaction CD40/CD40L conduit ensuite à une élévation des niveaux de costimulation à la surface des cellules dendritiques, un prérequis nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD8+. En parallèle, la liaison de l'IL-2 par son récepteur, exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ et CD8+, fournit un signal primaire de survie et de prolifération aux lymphocytes activés.

1.3.3. Induction des réponses cytotoxiques CD8+ – rôle des lymphocytes T CD4+

La différenciation des lymphocytes T CD8+ en cellules cytotoxiques est soumise à des conditions d'activation plus strictes que celle de leurs homologues CD4+, probablement afin de contrôler rigoureusement l'émergence de ces cellules au potentiel destructeur. Elle nécessite en effet un niveau de molécules de costimulation plus élevé sur les cellules dendritiques, atteint lorsque les lymphocytes T CD4+ activés engagent CD40, via CD40L (Figure I.1.4.). La signalisation médiée par CD40 œuvre de façon synergique avec la libération d'IL-2 par les T CD4+ préalablement activés afin d'assurer la différenciation et la survie des cellules T CD8+ cytotoxiques.

Longtemps, on a considéré que l'induction des réponses CD8+ cytotoxiques résultait de la présentation de peptides dérivés de protéines intracellulaires, tandis que l'activation des réponses CD4+ découlait de l'endocytose et de la dégradation d'antigènes extracellulaires. Ce modèle simpliste échouait cependant à expliquer la capacité des cellules dendritiques à initier des réponses cytotoxiques dirigées contre des cellules tumorales ou contre des pathogènes présentant un tropisme faible pour ces CPA. Cet apparent paradoxe fut résolu avec la découverte de la présentation croisée (« cross-presentation »), voie intracellulaire permettant la présentation d'antigènes exogènes via le CMH-I et l'initiation de réponses cytotoxiques dirigées contre les cellules infectées par des parasites, des virus ou contre les cellules tumorales (Theisen *et al.*, 2018).

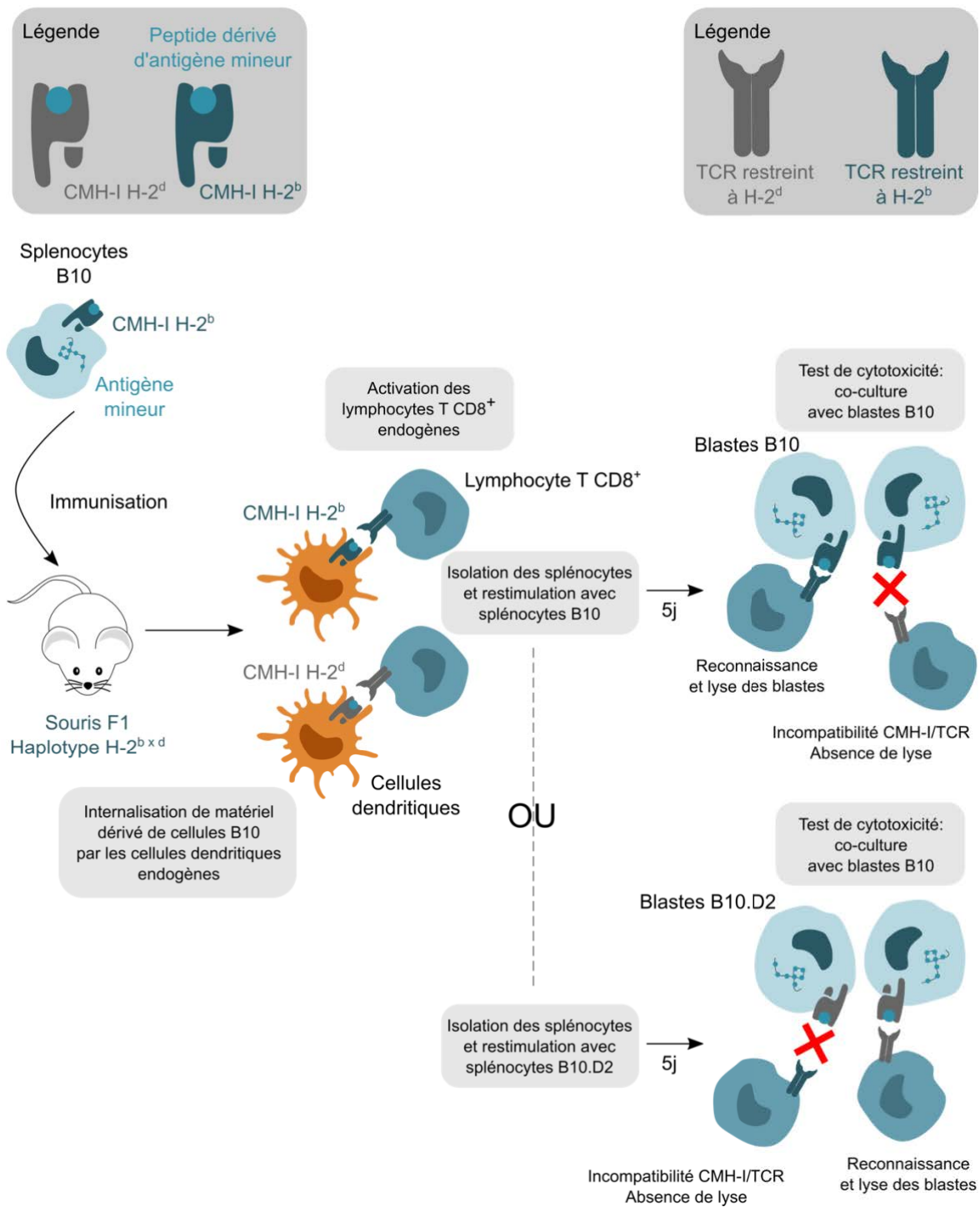


Figure I.2.1. : Principe des travaux fondateurs de Michael Bevan à l'origine de la découverte de la présentation croisée

Représentation schématique des expériences conduites par Michael Bevan en 1976. Cette figure représente les événements sous-jacents aux résultats obtenus par Bevan, tels qu'on les interprète aujourd'hui, à l'aune des connaissances actuelles.

2. LA PRÉSENTATION CROISÉE

2.1. Une découverte révolutionnaire

En 1976, l'immunologie en est encore à ses balbutiements : Rolf Zinkernagel et Peter Doherty (Prix Nobel de Médecine et de Physiologie 1996) viennent à peine de démontrer que les lymphocytes T reconnaissent non seulement un composant viral (« non-soi ») mais également le CMH des cellules stimulantes et des cellules cibles (« soi ») sous forme d'un complexe hypothétique (Zinkernagel and Doherty, 1974a). Ils proposent alors la théorie du « soi modifié » (Zinkernagel and Doherty, 1974b) selon laquelle ces mêmes lymphocytes T, *via* un récepteur, lient le CMH « modifié » par un composant viral. Cette découverte cruciale fonde le principe de la restriction au CMH, qui sous-tend une grande partie du développement de l'immunologie moderne.

C'est dans ce contexte que Michael Bevan formule, sur la base d'une intuition formidable et des connaissances lacunaires de l'époque, l'existence de ce qui sera plus tard appelé « présentation croisée ». Ses travaux se basent sur l'utilisation d'antigènes mineurs d'histocompatibilité, c'est-à-dire des fragments peptidiques issus de protéines intracellulaires polymorphiques, mais n'appartenant pas au CMH. Ses expérimentations initiales redémontrèrent que l'immunisation de souris d'haplotype mixte H-2_{b x d} avec des cellules B10 H-2_b, porteuses d'antigènes mineurs, conduit à l'induction d'une réponse cytotoxique à l'encontre des cellules cibles B10 (Figure I.2.1.). Cette observation, conforme à la théorie du « soi altéré », suggérait à nouveau la reconnaissance, par les lymphocytes T, d'un complexe constitué de H-2_b et des antigènes mineurs, exprimé par les cellules B10. Or, l'immunisation par ces mêmes cellules B10 génère également une réponse cytotoxique à l'encontre de cellules B10.D2 exprimant les mêmes antigènes mineurs mais d'haplotype discordant H-2_a (Bevan, 1976a) (Figure I.2.1.). À l'époque, Michael Bevan qualifia cette apparente exception à la règle de restriction au CMH de « cross-priming ». Après exclusion de diverses hypothèses, il en vint à supposer que le « cross-priming » ne pouvait résulter que de l'internalisation des antigènes mineurs associés aux cellules B10 par les CPA H-2_{d+} H-2_{b+} de l'hôte (Bevan, 1976b). La présentation de ces antigènes par les CPA, dans un contexte H-2_d, permettait ainsi l'induction d'une réponse cytotoxique restreinte à H-2_d, dirigée contre les cibles B10.D2 (H-2_{d+}). Si

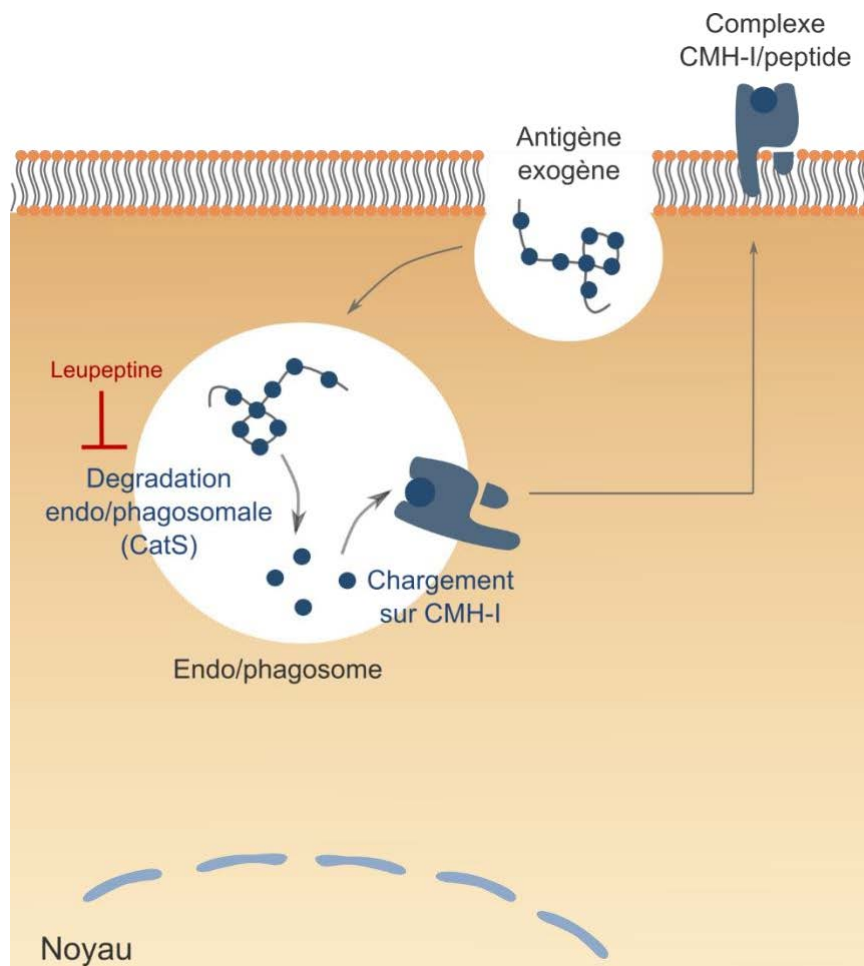


Figure I.2.2. : Voie vacuolaire de la présentation croisée

Alternativement, les antigènes extracellulaires endocytés peuvent être dégradés directement dans les compartiments endocytiques, notamment grâce à l'action de la cathepsine S. Ils sont ensuite chargés sur les molécules de CMH-I disponibles dans ces compartiments. En rouge figurent les inhibiteurs utilisés dans les études à l'origine de l'identification de cette voie. Adapté et enrichi depuis Joffre *et al.*, (2012).

aujourd'hui cette conclusion semble évidente, elle constitua à l'époque un changement de paradigme majeur qui préfigurait déjà, sur la base unique d'intuitions, un grand nombre de découvertes à venir. Alors que l'importance des cellules dendritiques dans le processus révélé par les expériences de Michael Bevan a été confirmée de façon univoque les années suivantes, il est curieux et fascinant de constater que les mécanismes intracellulaires sous-jacents à la présentation croisée sont encore aujourd'hui l'objet d'incertitudes et de controverses.

2.2. Voies cytosolique et vacuolaire de la présentation croisée

Malgré une identification précoce du processus et de ses conséquences, il faudra attendre le début des années 1990 pour que soient caractérisées, au niveau moléculaire, les deux grandes voies intracellulaires de la présentation croisée, décrites ci-après. Dans cette partie, je me limiterai à l'analyse des voies identifiées chez la souris et préciserai, le cas échéant, lorsqu'il s'agit de données obtenues chez l'homme.

2.2.1. Identification historique

L'identification des voies intracellulaires de la présentation croisée débute dans les années 1990, notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. À cette époque, les groupes de Clifford Harding et Rui Song démontrent que la présentation croisée d'antigènes bactériens ou non-bactériens (*i. e.* billes de latex recouvertes d'ovalbumine) se déroule en présence d'inhibiteurs du protéasome (Song and Harding, 1996), utilise possiblement des molécules de CMH-I recyclées depuis des compartiments post-golgiens (Harding and Song, 1994; Pfeifer *et al.*, 1993; Song and Harding, 1996) et présente, le plus souvent, une indépendance vis-à-vis du transporteur TAP, responsable de l'import des peptides dans différents compartiments (Bertholet *et al.*, 2006; Song and Harding, 1996). Ces observations conduisent collectivement à la caractérisation de la voie dite « vacuolaire » (Figure I.2.2.) : après internalisation, les antigènes capturés demeurent confinés dans des compartiments endocytiques où ils sont dégradés, principalement par la cathepsine S (Shen *et al.*, 2004), puis apprêtés sur des molécules de CMH-I.

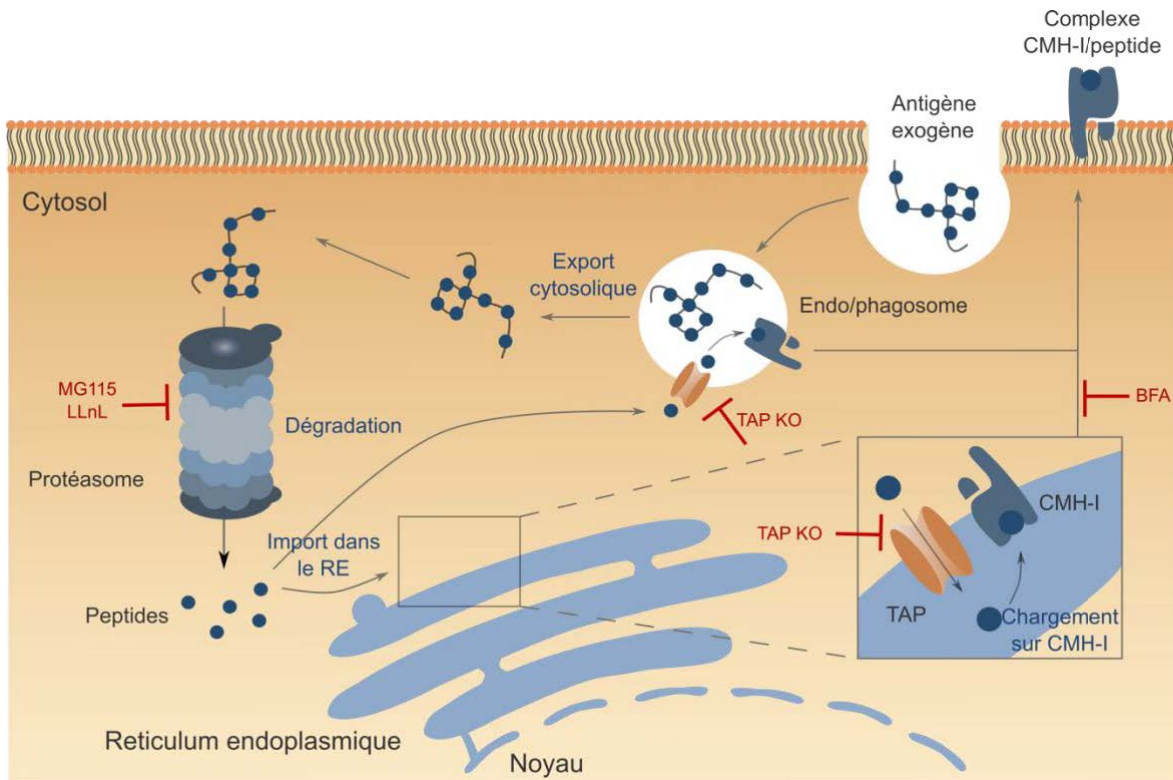


Figure I.2.3. : Voie cytosolique de la présentation croisée

Après internalisation, les antigènes extracellulaires sont exportés depuis les compartiments endocytiques jusque dans le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome. Les peptides générés au cours de cette étape sont ensuite transportés par TAP dans le réticulum endoplasmique ou dans les endo/phagosomes où ils sont chargés sur les molécules de CMH-I. Les complexes CMH-I/peptides sont finalement exportés à la surface cellulaire pour y interagir avec le TCR des lymphocytes T CD8⁺. En rouge figurent les inhibiteurs ou modèles utilisés dans les études à l'origine de l'identification de cette voie. Adapté et enrichi depuis Joffre *et al.*, (2012).

INTRODUCTION

En parallèle, d'autres équipes, parmi lesquelles celles de Kenneth Rock, Ronald Germain et Colin Watts, décrivent une voie dépendante de la dégradation par le protéasome, affectée par l'absence du transporteur TAP et sensible à la Brefeldine A, une drogue bloquant le transport entre réticulum endoplasmique et appareil de Golgi (Kovacovics-Bankowski and Rock, 1995; Norbury *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1997; Reis e Sousa and Germain, 1995). Ils suggèrent alors que la présentation croisée d'antigènes particuliers, non-bactériens, implique une étape critique d'export depuis les compartiments endocytiques vers le cytosol, lieu de leur dégradation par le protéasome (Figure I.2.3.). Les peptides ainsi générés sont ensuite transloqués dans différents compartiments par le transporteur TAP, en vue de leur association aux molécules de CMH-I. La preuve de l'existence de cette voie qualifiée de « cytosolique » est définitivement apportée avec la réalisation d'expériences utilisant la gélonine, une toxine incapable de traverser les membranes de façon passive, mais exerçant un effet inhibiteur sur l'activité du ribosome une fois dans le cytosol. La réduction de la synthèse protéique, observée à la suite de l'internalisation de billes recouvertes de gélonine, assoit formellement la pertinence biologique de cette étape d'export au cours de la présentation croisée (Kovacovics-Bankowski and Rock, 1995; Reis e Sousa and Germain, 1995).

Plus de quarante ans après leur description initiale, le déroulement des voies cytosolique et vacuolaire de la présentation croisée présente encore de nombreuses zones d'ombre. En particulier, les déterminants de l'engagement des antigènes dans l'une ou l'autre de ces voies sont largement méconnus. Il est probable que la nature de l'antigène elle-même (Belizaire and Unanue, 2009), mais également la forme sous laquelle il est rencontré (Shen *et al.*, 2014a) conditionnent son devenir intracellulaire. L'importance relative des voies cytosolique et vacuolaire *in vivo* est aussi incertaine. Pour tenter de répondre à cette question, de nombreuses études ont par le passé utilisé les souris déficientes pour TAP (Huang *et al.*, 1996). Ces résultats sont cependant loin d'être totalement conclusifs au regard de l'implication du transporteur dans les deux voies sus-citées (Chefalo *et al.*, 2003), et de la diminution de l'expression de CMH-I à la surface de toutes les cellules nucléées observée dans ce modèle (Day *et al.*, 1995; Van Kaer *et al.*, 1992). Si les résultats générés à l'aide des souris TAP^{-/-} ne s'avèrent pas pleinement satisfaisants, les données obtenues chez les souris déficientes pour LMP7, une sous-unité

constitutive de l'immunoprotéasome, éclairent substantiellement la question de la contribution de la voie cytosolique *in vivo*. Chez ces souris, l'induction d'une réponse cytotoxique dirigée contre l'épitope H-Y, généré par l'immunoprotéasome, est abrogée (Palmowski *et al.*, 2006). Il semble donc qu'*in vivo*, la voie cytosolique soit prédominante. Cette conclusion revêt un caractère préliminaire dans l'attente de sa confirmation par des études réalisées dans d'autres modèles, mais elle souligne l'importance de la compréhension des mécanismes intracellulaires à l'origine de cette voie de présentation croisée. Dans la suite de cette partie 2., je m'attacherai donc uniquement à la caractérisation de la voie cytosolique.

2.2.2. Déroulement intracellulaire de la voie cytosolique

La voie cytosolique est définie par l'existence de l'étape d'export des antigènes. C'est donc sur la description et la caractérisation de ce processus que s'ouvre cette partie.

2.2.2.1. Export cytosolique des antigènes

L'export cytosolique des antigènes est influencé par un grand nombre de paramètres biologiques. La nature des cellules concernées par cette étape, ainsi que sa régulation par des facteurs extrinsèques seront abordées respectivement dans les parties 2.3 et 2.5. Je me contenterai ici de caractériser les antigènes engagés dans cette voie avant d'expliquer les mécanismes moléculaires proposés pour en expliquer le déroulement.

Nature des antigènes exportés

Sur la base d'observations microscopiques, il a été démontré que des antigènes solubles de nature protéique (comme la peroxydase du raifort, HRP) (Norbury *et al.*, 1997) ou non-protéiques (comme les dextrans) (Rodriguez *et al.*, 1999) pouvaient être exportés dans le cytosol. L'efficacité de cette translocation est cependant restreinte par la taille des antigènes transportés (Mant *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 1999). Ainsi, les dextrans de taille importante (500 à 2000 kDa), contrairement aux dextrans de 5 et 40 kDa, restent confinés à l'intérieur des compartiments endocytiques (Rodriguez *et al.*, 1999). Cette propriété dicte également le devenir des antigènes particuliers, et notamment des complexes immuns antigène/anticorps, qui bien

que cross-présentés plus efficacement que les antigènes solubles (Reis e Sousa and Germain, 1995), forment souvent de gros agrégats. Leur export cytosolique et leur présentation ultérieure nécessitent donc une étape préliminaire de dissociation des complexes, sous contrôle de l'activité protéolytique, et donc du pH légèrement acide, des endolysosomes (Rodriguez *et al.*, 1999).

Cinétique de l'export

La détection cytosolique précoce de la HRP, quinze minutes seulement après internalisation de l'enzyme (Norbury *et al.*, 1997), a très tôt suggéré que l'export des antigènes s'opérait depuis les compartiments endocytiques précoces (Burgdorf *et al.*, 2008). Cette supposition, ultérieurement confirmée par microscopie (Hotta *et al.*, 2006), trouve un éclairage fonctionnel intéressant grâce à la modélisation mathématique (Howland and Wittrup, 2008) : cette dernière prédit qu'au-delà de vingt minutes post-internalisation, la fraction des antigènes disponible pour l'export diminue, en raison de leur engagement dans des voies de dégradation associées à la maturation du compartiment endocytique. De ce fait, passé ce seuil temporel, seule une part minime des antigènes contribue à l'export et à la présentation croisée.

Les antigènes particuliers, tels que les complexes immuns (Rodriguez *et al.*, 1999) et les billes recouvertes d'antigènes (Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003), sont exportés selon une cinétique plus lente, probablement liée à la nécessité de dissociation préalable de ce type d'antigènes. Par ailleurs, l'une de ces études a également proposé, pour la première fois, qu'un transporteur, Sec61, puisse médier la translocation cytosolique des antigènes (Houde *et al.*, 2003).

Mécanismes moléculaires à l'origine de l'export cytosolique des antigènes

Deux grandes hypothèses sont actuellement proposées pour expliquer le déroulement de l'étape d'export cytosolique des antigènes : tandis que l'une inclut un transporteur, l'autre propose la fuite pure et simple des antigènes, consécutive à une rupture transitoire de la membrane endo/phagosomale. À l'heure actuelle, l'hypothèse du transporteur est dominante, mais plusieurs éléments récents questionnent sa validité.

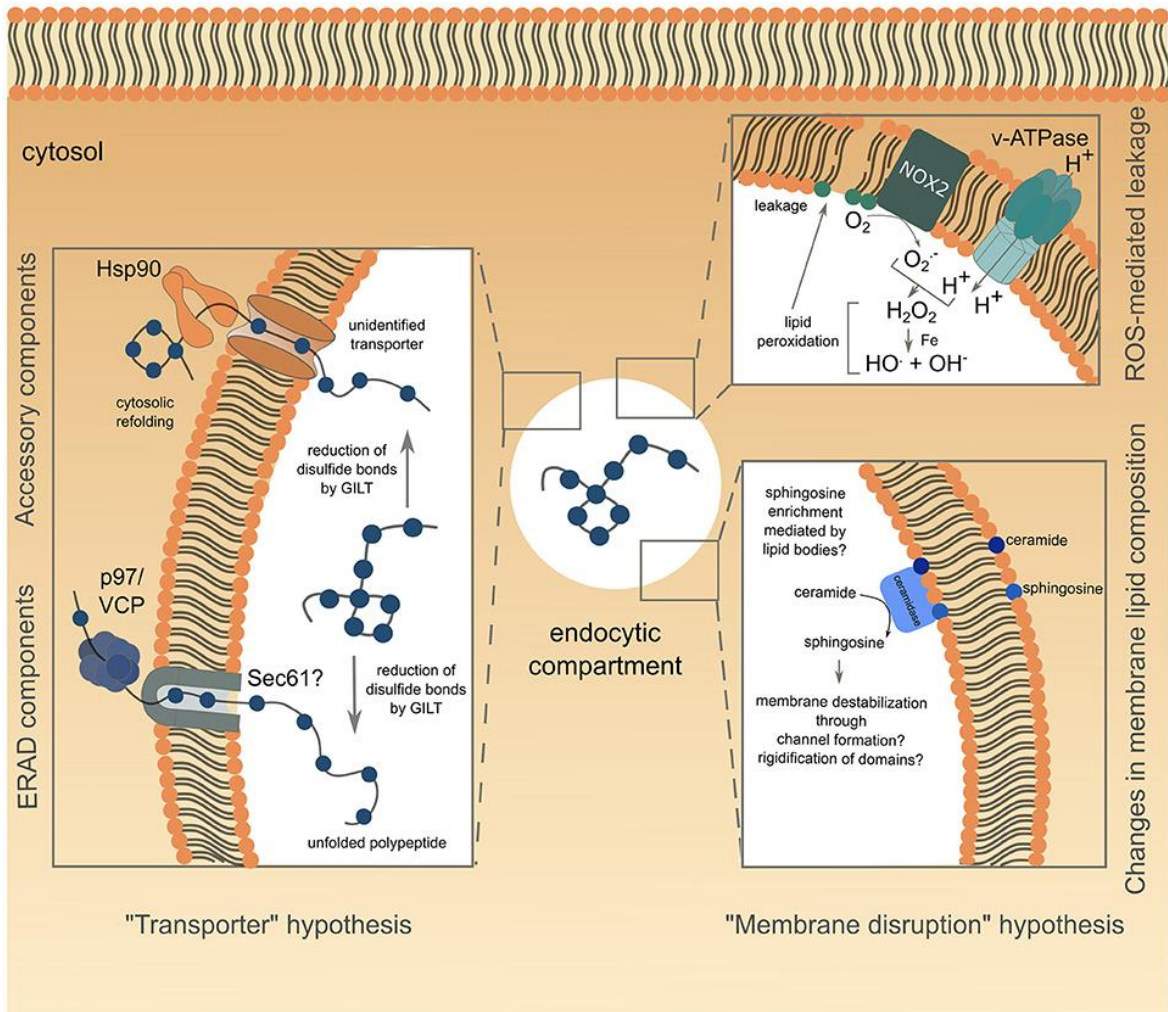


Figure I.2.4. : Hypothèses pour le déroulement de l'export cytosolique des antigènes

L'hypothèse dite du transporteur est dépeinte sur la partie gauche du schéma et celle de la rupture du compartiment sur la partie droite. Sur la partie droite, la rupture membranaire liée à la peroxydation des lipides a été démontrée expérimentalement, tandis que le rôle des sphingolipides, supposé par des études biophysiques, manque encore de relevance biologique dans les cellules dendritiques. Tiré de Gros and Amigorena (2019).

INTRODUCTION

L'implication d'un transporteur comme moyen d'accès au cytosol impose naturellement une contrainte conformationnelle à l'antigène transporté : en effet, le diamètre fixe et étroit du canal central du transporteur représente un obstacle physique à la translocation d'antigènes sous forme native. Il est donc hautement probable qu'une étape de dépliement/dénaturation protéique partielle précède le transfert cytosolique des antigènes, comme semble le suggérer la relative inefficacité avec laquelle les antigènes fixés, structurellement inflexibles, sont transportés (Kato *et al.*, 2012). Les catalyseurs protéiques du dépliement sont encore majoritairement inconnus à l'exception de la thiol-réductase GILT, présente dans les phagolysosomes et constitutivement exprimée par les CPA, qui réduit les ponts disulfures et participe à l'export cytosolique et à la présentation croisée d'antigènes viraux (Singh and Cresswell, 2010) (Figure I.2.4.).

Si l'identification du rôle de GILT semble accréditer l'hypothèse du transporteur, la nature de ce dernier reste l'objet de controverses vives. La découverte initiale d'interactions entre antigènes dépliés et composants de la machinerie ERAD (ER-Associated Degradation) au niveau de compartiments associés au réticulum endoplasmique a rapidement orienté les recherches (Imai *et al.*, 2005). Elle a notamment fait naître l'idée que le canal trimérique Sec61 ($\alpha\beta\gamma$), supposé responsable de la retro-translocation des protéines mal repliées du réticulum endoplasmique vers le cytosol, pourrait également exercer cette fonction depuis les compartiments intracellulaires pendant la présentation croisée (Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003). Cette hypothèse a ensuite connu une série de vérifications expérimentales, commencée avec les travaux de Peter Cresswell, basés sur l'emploi de l'exotoxine A (ExoA), une toxine bactérienne capable de se lier à l'extrémité N-terminale cytosolique de Sec61 α et de provoquer la fermeture du canal (Koopmann *et al.*, 2000; Schäuble *et al.*, 2014). Afin de rendre compte de l'efficacité de l'export cytosolique, les auteurs ont utilisé le peptide viral ICP47 dont la capacité à inhiber le transporteur TAP dépend de sa translocation dans le cytosol. Or, le traitement d'une lignée de cellules dendritiques par ExoA restaure la fonctionnalité de TAP en présence du peptide ICP47, ce qui suggère qu'ExoA empêche l'accès d'ICP47 au cytosol, par l'intermédiaire de son action sur Sec61 (Ackerman *et al.*, 2006). Cette observation, couplée à l'inefficacité de la présentation croisée en présence d'ExoA (Ackerman *et al.*, 2006; Goldszmid *et al.*, 2009) ou dans des cellules dendritiques déficientes pour Sec61 (Imai *et al.*, 2005; Zehner *et*

INTRODUCTION

al., 2015), a largement contribué à la désignation de Sec61 comme canal principal d'acheminement des antigènes dans le cytosol (Figure I.2.4.).

Il reste néanmoins difficile de conclure définitivement quant à la contribution précise et spécifique de Sec61 à la retro-translocation des antigènes depuis les compartiments endocytiques. En effet, Sec61 est également responsable de l'import co-translationnel de molécules, dont le CMH-I, dans le réticulum endoplasmique et la perturbation de cette fonction pourrait expliquer la diminution de la présentation croisée observée, indépendamment d'un effet sur l'export cytosolique. Pour tenter d'exclure cette possibilité, une étude a substitué la perte d'expression de Sec61 par sa rétention, grâce à un « intracorp » (« intrabody »), dans le réticulum endoplasmique afin d'empêcher son recrutement au niveau des compartiments intracellulaires. La rétention de Sec61 dans le réticulum endoplasmique se traduit, comme sa perte d'expression, par une baisse de l'export cytosolique des antigènes et de la présentation croisée (Zehner *et al.*, 2015). Cette approche, certes moins dommageable pour la cellule, n'est probablement pas exempte de conséquences sur le fonctionnement du réticulum endoplasmique. Or, cette facette du modèle employé n'est pas explorée dans l'étude sus-citée. Enfin, notre équipe, en association avec celle de Caroline Demangel à l'Institut Pasteur, a récemment démontré que l'inhibition spécifique de Sec61, grâce à une autre toxine, la mycolactone, n'influençait aucunement l'efficacité de l'export cytosolique des antigènes. L'inhibition observée de la présentation croisée est quant à elle indirecte et associée à une perturbation secondaire de nombreux médiateurs de ce processus, dont CMH-I (Grotzke *et al.*, 2017). Si l'implication du translocon Sec61 appelle une clarification absolument nécessaire, d'autres composants de la machinerie ERAD, comme Derline-1 (Der1) ou Hrd1, pourraient constituer des transporteurs putatifs.

Hrd-1 est une ubiquitine ligase résidente du réticulum endoplasmique. Elle présente 6 domaines transmembranaires, c'est-à-dire un nombre suffisant pour former un canal (Schoebel *et al.*, 2017; Stein *et al.*, 2014). La déplétion de Hrd1 entraîne une diminution de l'export cytosolique des antigènes et de la présentation croisée, mais affecte également la présentation *via* le CMH-II (Zehner *et al.*, 2015). Dès lors, il est possible que l'absence de Hrd1 génère une situation globale de stress du réticulum endoplasmique, à l'origine d'altérations générales des voies de présentation antigénique. Quant à la protéase Der1, elle comporte 4 domaines transmembranaires et ne peut donc pas constituer un translocon. Un potentiel rôle de Der1 en

tant que protéine accessoire dans la retro-translocation (suggéré dans le réticulum endoplasmique par Kadowaki *et al.*, (2018); Mehnert *et al.*, (2014)) a aussi été exclu : en effet, la perte d'expression de Der1 est sans conséquence sur l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée dans des cellules dendritiques murines (Zehner *et al.*, 2015) et humaines (Ménager *et al.*, 2014).

À ce jour, et en l'absence de données supplémentaires sur le rôle de Sec61, l'implication de la machinerie ERAD dans la régulation du transport cytosolique des antigènes depuis les endo/phagosomes apparaît limitée à l'action de l'ATPase p97 (Figure I.2.4.). Sous sa forme active, et comme de nombreuses autres ATPases, p97 forme un anneau hexamérique, capable d'hydrolyser l'ATP et donc de fournir l'énergie nécessaire à la translocation des antigènes dans le cytosol (Ye *et al.*, 2003). En accord avec ce rôle proposé, l'ajout de la protéine p97 purifiée suffit à induire la libération de la luciférase contenue dans des phagosomes isolés (Ackerman *et al.*, 2006). De plus, les cellules dendritiques déficientes pour p97 (Imai *et al.*, 2005; Ménager *et al.*, 2014), ou exprimant la version dominant négative de la protéine (Ackerman *et al.*, 2006), montrent une capacité réduite de présentation croisée. Inversement, la surexpression de p97 augmente l'efficacité de ce mécanisme (Zehner *et al.*, 2011). p97 est recrutée au niveau des compartiments endo/phagosomaux à la suite de la polyubiquitination du récepteur au mannose. Cette modification post-traductionnelle, semble indispensable au déroulement de la voie cytosolique, puisque l'expression d'une version monoubiquitinée du récepteur suffit à inhiber la translocation et la présentation croisée d'antigènes (Zehner *et al.*, 2011). À ce stade, il est intéressant de noter que la polyubiquitination du récepteur au mannose, provoquée par la liaison de l'ovalbumine, est négativement régulée par le complexe ESCRT-I (et notamment par la sous-unité TSG101), dont je reparlerai en partie 4.

La mise en évidence du rôle de p97 dans la libération d'antigènes endo/phagosomaux a principalement reposé sur l'emploi de la luciférase, une enzyme capable de catalyser des réactions de bioluminescence. Or, pour cela, la luciférase doit ré-adopter une conformation native après son émergence du transporteur sous forme dépliée. La coordination de cette étape de repliement fait intervenir Hsp90, une protéine chaperonne cytosolique (Giodini and Cresswell, 2008), dont l'activité conditionne en partie l'efficacité de l'export cytosolique et de la présentation croisée (Imai *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2012) (Figure I.2.4.).

INTRODUCTION

L'hypothèse du transporteur a concentré l'essentiel de l'effort de recherche ces vingt dernières années et est donc la plus soutenue expérimentalement parlant. Néanmoins, il apparaît difficilement envisageable qu'un transporteur unique, et *a fortiori* Sec61 qui présente une sélectivité élevée vis-à-vis des substrats transportés (Römisch, 2017), médie l'export de l'immense variété des antigènes cellulaires. En outre, cette hypothèse ne suffit pas à expliquer la façon dont de larges antigènes non protéiques, comme les dextrans, accèdent au cytosol en l'absence d'ubiquitination, un prérequis pourtant nécessaire à la prise en charge de cargos par ERAD. Dans l'ensemble, ces interrogations ne discréditent pas entièrement l'implication d'ERAD dans l'export cytosolique des antigènes, mais suggèrent fortement la contribution d'autres mécanismes dans l'accomplissement de ce processus.

Les premières descriptions de la voie cytosolique ont très tôt mentionné la possibilité d'une fuite cytosolique des antigènes, consécutive à la rupture transitoire de la membrane des compartiments endocytiques. Ce postulat fut proposé, à l'époque, sous le terme de « modèle de l'indigestion ». Selon cette hypothèse, l'accumulation d'antigènes particuliers de grande taille conduirait à une surcharge phagosomale à l'origine de la rupture de la membrane du compartiment (Reis e Sousa and Germain, 1995). Cette conception originellement « accidentelle » de l'évènement de rupture a été remise en question par une étude récente qui corrèle l'induction de la peroxydation des lipides, sous l'effet du LPS, à une perturbation de l'intégrité de la membrane endosomale (Dingjan *et al.*, 2016) (Figure I.2.4.). Ainsi, la chute de l'occurrence des évènements de rupture en présence d'agents anti-oxydants s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de l'export antigénique et de la présentation croisée (Dingjan *et al.*, 2016). Pour la première fois, ces résultats démontrent non seulement que la rupture membranaire est un phénomène inductible, mais ils inscrivent aussi la relevance biologique, jusque-là hypothétique, de cet évènement transitoire dans le cadre de la présentation croisée. L'identification ultérieure des caractéristiques physiques des membranes enrichies en lipides peroxydés accreditte encore davantage l'importance de cette voie dans l'export cytosolique des antigènes. En effet, ces membranes, recrées artificiellement, présentent une perméabilité aqueuse accrue (Wong-Ekkabut *et al.*, 2007), et une tendance à la courbure favorisant leur fragilisation et *in fine* leur rupture (Agmon *et al.*, 2018).

INTRODUCTION

En parallèle de la peroxydation, d'autres altérations de la composition lipidique des membranes affectent leurs propriétés physiques. En particulier, l'enrichissement des membranes en céramide, et *a fortiori* en sphingosine, augmente leur perméabilité aux solutés (Figure I.2.4.). Deux modalités d'action sont évoquées : les sphingolipides pourraient soit former de larges canaux, à l'origine d'une déstabilisation membranaire globale (Siskind *et al.*, 2002), soit conduire à cette déstabilisation de façon graduelle en rigidifiant et en perturbant localement des domaines restreints (Contreras *et al.*, 2006; Jiménez-Rojo *et al.*, 2014). Si l'implication des sphingolipides dans l'export cytosolique des antigènes est pour l'instant purement spéculative, elle rejoindrait pourtant un faisceau d'indications expérimentales associant le métabolisme lipidique et la présentation croisée. À cet égard, l'intuition initiale d'Hide Ploegh (Ploegh, 2007) selon laquelle les corps lipidiques pourraient déstabiliser des microdomaines membranaires au moment de leur formation, trouve une illustration possible dans les travaux de notre équipe : par des mécanismes encore inconnus, la biogénèse des corps lipidiques entrecroise les voies de présentation croisée et semble les réguler. En effet, la GTPase Igtp contrôle non seulement l'accumulation des corps lipidiques dans les cellules dendritiques, mais aussi la capacité de ces dernières à cross-présenter efficacement les antigènes (Bougnères *et al.*, 2009). L'influence exacte des corps lipidiques sur la présentation croisée, et le niveau auquel s'opère leur action, restent cependant à définir. Bien qu'initialement supposés perturber la stabilité des membranes et en favoriser la rupture (Ploegh, 2007), les corps lipidiques ne semblent pas interférer avec la translocation cytosolique des antigènes, du moins, lorsque celle-ci est induite par des adjuvants à base de saponine (den Brok *et al.*, 2016).

Si aujourd'hui les preuves en faveur de l'importance de la rupture transitoire des endomembranes dans la translocation cytosolique des antigènes s'accumulent, cette hypothèse a par le passé été régulièrement rejetée (Rodriguez *et al.*, 1999). L'absence de mécanismes connus de régulation de l'intégrité des endomembranes laissait, en effet, présager des conséquences cellulaires désastreuses en cas de cassure non contrôlée (Boya *et al.*, 2003; Hornung *et al.*, 2008). Je reviendrai sur la validité de cette affirmation lors de la définition des objectifs de ce travail de doctorat dans la partie 5.

2.2.2.2. Import et « élagage » des peptides dans les compartiments compétents pour la présentation croisée

À la suite de leur relocalisation cytosolique, les antigènes sont dégradés par le protéasome en peptides de taille variable (de 3 à 22 acides aminés) (Kisselev *et al.*, 1999) mais largement compatibles avec les restrictions relativement faibles de TAP vis-à-vis de la longueur des oligomères transportés (entre 8 et 16 acides aminés) (Momburg *et al.*, 1994). La sensibilité de la voie cytosolique au traitement par la BFA a soutenu pendant près de dix ans l'idée que l'import des peptides par TAP et leur chargement sur les molécules de CMH-I s'opérait principalement dans le réticulum endoplasmique (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995). En réalité, TAP est également exprimé dans les compartiments endo/phagosomaux, qui contiennent de surcroît une machinerie de chargement peptidique fonctionnelle et constituent donc des compartiments compétents pour la présentation croisée (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003).

En revanche, les peptides importés par TAP dans le réticulum endoplasmique ou les endo/phagosomes satisfont mal les contraintes de longueur (8 à 11 acides aminés) imposées par la structure du sillon du CMH-I et nécessitent donc une étape supplémentaire d'« élagage » (« trimming ») par deux aminopeptidases distinctes avant leur chargement. La nature de l'aminopeptidase chargée de raboter les acides aminés N-terminaux dépend du lieu d'association des peptides au CMH-I. Dans le réticulum endoplasmique, l'aminopeptidase résidente ERAP (Endoplasmic Reticulum-associated AminoPeptidase) assure le raccourcissement des peptides jusqu'à une longueur minimale de 8 acides aminés (Yan *et al.*, 2006). Cette fonction d'ERAP apparaît nécessaire à la présentation croisée des complexes immuns et des antigènes cellulaires par les cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo* (Firat *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2006). Dans les compartiments intracellulaires, et particulièrement dans les endo/phagosomes précoces, c'est une autre protéine IRAP (Insulin-Regulated AminoPeptidase) qui remplit cette fonction et garantit la présentation croisée d'antigènes particulières et cellulaires *in vivo* et *in vitro* (Saveanu *et al.*, 2009).

2.2.2.3. Chargement des peptides dans le réticulum endoplasmique et les endo/phagosomes – question de l'origine du CMH-I

Le fonctionnement parallèle d'ERAP et IRAP dans la voie cytosolique (Saveanu *et al.*, 2009) suggère l'utilisation effective du réticulum endoplasmique et des compartiments intracellulaires comme lieux d'association des peptides au CMH-I. Si le réticulum endoplasmique comprend déjà les molécules de CMH-I associées au complexe de chargement peptidique, constitué de l'oxydoréductase Erp57 et des chaperones calreticuline et tapasine, ce n'est pas le cas des compartiments endo/phagocytiques.

Afin de rendre ces derniers compétents pour la présentation croisée, l'import parallèle des molécules de CMH-I et des composants du complexe de chargement peptidique est requis. Si la détection de tapasine, calreticuline et Erp57 a formellement démontré que le complexe de chargement peptidique était présent dans ces compartiments (Guermontprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003), le mécanisme de recrutement du complexe est, quant à lui, controversé. Grâce à son interaction avec syntaxine-4 à la surface des phagosomes, Sec22b, localisé au niveau de l'ERGIC (ER-Golgi-Intermediate Compartment), a d'abord été considéré comme un régulateur clé de la fusion entre ces deux compartiments (Cebrian *et al.*, 2011). En contrôlant l'acquisition de cargos en provenance du réticulum endoplasmique (dont le complexe de chargement peptidique) par les phagosomes des cellules dendritiques, Sec22b se révèle crucial pour la présentation croisée d'antigènes solubles, particuliers et parasitaires (Cebrian *et al.*, 2011). Cependant ces résultats, obtenus grâce à une stratégie de déplétion par shARN, ont été récemment attribués à un effet « hors-cible » des shARN utilisés (Wu *et al.*, 2017) et le rôle de Sec22b reste donc à clarifier.

Les premières indications relatives à l'origine des molécules de CMH-I présentes dans les endo/phagosomes remontent à la découverte d'une tyrosine conservée dans le domaine cytoplasmique de CMH-I, nécessaire à son ciblage dans les endo/phagosomes depuis la membrane plasmique (Basha *et al.*, 2008; Lizée *et al.*, 2003) et critique pour la présentation croisée. La mise en évidence de cette tyrosine a d'abord suggéré que le recyclage de molécules situées sur la membrane plasmique constituait la route principale d'acquisition du CMH-I par les compartiments intracellulaires pour la présentation croisée par voies vacuolaire (Pfeifer *et al.*, 1993) et cytosolique (Burgdorf *et al.*, 2008). Cette hypothèse a ensuite été étayée par

l'identification des fonctions de Rab22a (Cebrian *et al.*, 2016) et de Rab3b/c (Zou *et al.*, 2009) dans le recrutement endo/phagosomal du CMH-I depuis la membrane plasmique et de leur importance dans la présentation croisée. En dépit du rôle accessoire attribué par ces observations aux molécules du CMH-I issues du réticulum endoplasmique, ces dernières pourraient pourtant constituer une source majeure de CMH-I pour la présentation croisée. En effet, l'association de CD74 au CMH-I dans le réticulum endoplasmique entraîne l'adressage des molécules de CMH-I vers le compartiment endolysosomal où elles s'associent aux peptides. En conséquence, la déplétion de CD74 dans les cellules dendritiques compromet sévèrement la présentation croisée d'antigènes solubles et cellulaires *in vitro* et *in vivo* (Basha *et al.*, 2012).

S'il paraît désormais clair que les molécules de CMH-I originaires de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique participent toutes deux à la présentation croisée, leurs contributions respectives aux voies vacuolaire et cytosolique sont encore largement méconnues. Par ailleurs, la frontière entre composantes vacuolaire et cytosolique de la présentation croisée semble poreuse, puisqu'une voie supplémentaire dépendante du protéasome mais indépendante de TAP a été décrite (Merzougui *et al.*, 2011). L'existence de cette voie pourrait s'expliquer soit par l'implication d'un transporteur encore inconnu, comme suggéré par Lawand *et al.*, (2016), ou bien par la présence de protéasomes au sein même des compartiments intracellulaires (Sengupta *et al.*, 2019). Néanmoins, en l'absence d'identification du transporteur inconnu d'une part, et d'autre part dans l'attente de la confirmation de la seconde étude, j'ai choisi de maintenir la définition de la voie cytosolique comme celle nécessitant une étape d'export des antigènes depuis les compartiments endocytiques, afin de poser le cadre conceptuel de cette introduction. Ce choix est également motivé par la spécialisation avérée de certaines sous-populations de cellules dendritiques dans la réalisation de l'export cytosolique des antigènes, comme expliqué dans les parties suivantes.

2.3. Cellules compétentes pour la présentation croisée

Les expériences fondatrices présentées dans les parties précédentes utilisaient les macrophages comme modèles cellulaires dans l'étude de la présentation croisée (Harding and Song, 1994; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Norbury *et al.*, 1995; Pfeifer *et al.*, 1993;

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.2.5. : Ontogénie des cellules phagocytaires mononuclées chez la souris

Les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) et plasmacytoïdes (pDCs) dérivent d'un progéniteur commun, le CDP (Common Dendritic cell Precursor) et requièrent FLT3L pour leur développement. Les cDCs se subdivisent ensuite en deux lignages, les cDC1 et cDC2, sous l'action de différents facteurs de transcription dont les principaux ont été mentionnés ici. Ces deux lignages, porteurs de fonctions spécifiques, sont définis par l'expression de marqueurs de surface caractéristiques, indiqués sur ce schéma. Entre parenthèses figurent les marqueurs plus variables ou spécifiques de cellules résidentes (CD8 α pour les cDC1) et migratoires (CD103 pour les cDC1). Au cours de ce manuscrit, nous allons principalement nous intéresser aux cDC1 et cDC2. J'ai donc choisi de faire figurer les autres types cellulaires en grisé. Adapté de Eisenbarth (2019).

Reis e Sousa and Germain, 1995). Il est par la suite devenu évident que les cellules dendritiques constituaient des cellules présentatrices d'antigènes immensément plus efficaces pour accomplir cette fonction *in vitro* (Norbury *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1999) et *in vivo* (Jung *et al.*, 2002; Kurts *et al.*, 2001).

2.3.1. Rappels sur les sous-populations de cellules dendritiques chez la souris

Les cellules dendritiques se divisent en deux grandes catégories : les cellules dendritiques dites « conventionnelles » (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), dont la fonction principale réside dans la production massive d'interféron de type I au cours des réponses anti-virales. J'ai choisi dans cette partie 2.3 d'aborder uniquement le rôle des cellules dendritiques conventionnelles : en effet, plusieurs études ont démontré le rôle accessoire, voire absent, des pDC dans la présentation croisée et l'activation résultante (appelée activation croisée ou « cross-priming ») des lymphocytes T CD8⁺ (GeurtsvanKessel *et al.*, 2008; Sapozhnikov *et al.*, 2007).

Chez la souris, les cellules dendritiques conventionnelles s'organisent en deux lignages distincts et désignés par les termes cDC1 et cDC2, selon la nomenclature en vigueur basée sur l'ontogénie (Guilliams *et al.*, 2014). L'engagement dans l'un ou l'autre de ces lignages est contrôlé par plusieurs ensembles de facteurs de transcription distincts et mutuellement exclusifs (Figure I.2.5.). Ainsi, la différenciation de la sous-population cDC1 repose principalement sur l'expression des facteurs de transcription IRF8 (Schivoni *et al.*, 2002) et Batf3 (Hildner *et al.*, 2008), tandis que le développement de leurs homologues cDC2 dépend notamment de l'expression d'IRF4 (Schlitzer *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2004) et de RelB (Wu *et al.*, 1998). En plus de leur origine ontogénique distincte, différents marqueurs de surface contribuent également à la caractérisation de ces deux sous-populations : les marqueurs XCR1 (Crozat *et al.*, 2010, 2011), et Clec9a (Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008) identifient de façon univoque les cDC1, alors que les cDC2 expriment spécifiquement SIRP α (CD162a) et CD11b (Guilliams *et al.*, 2016; Gurka *et al.*, 2015) (Figure I.2.5.). Les lignages cDC1 et cDC2 comportent chacun une composante résidente CD11c^{hi} CMH-II^{int}, localisée dans les organes lymphoïdes secondaires, et une composante migratoire CD11c^{int} CMH-II^{hi}, retrouvée dans les tissus

périphériques et capable de gagner les ganglions drainants sous l'influence de signaux activateurs (décrits en partie 1). Les cDC1 et cDC2 résidentes sont ainsi respectivement caractérisées par les profils d'expression CD8 α +, CD11b-, XCR1+, Clec9a+ DEC-205+, DCIR2-, SIRP α - et CD8 α -, CD11b+, XCR1-, Clec9a-, DEC-205-, DCIR2+, SIRP α +, miroirs l'un de l'autre (Dudziak *et al.*, 2007). Les cDC1 migratoires arborent non seulement les marqueurs classiques XCR1 et Clec9a, mais peuvent aussi être différenciées des cDC1 résidentes grâce à l'expression de l'intégrine CD103. L'équivalent d'un tel marqueur n'est, à ce jour, pas identifié pour les cDC2 migratoires (Figure I.2.5.). Par ailleurs, il est à noter que les marqueurs DEC-205 et DCIR2 ségrègent moins clairement cDC1 et cDC2 migratoires que leurs homologues résidentes (Edelson *et al.*, 2010; Semmrich *et al.*, 2012).

Les muqueuses présentent de surcroît certaines sous populations spécifiques, comme les cellules de Langerhans dans la peau, ou les cellules dendritiques CD11b+ CD103+ double positives dans la *lamina propria* intestinale (Persson *et al.*, 2013). J'ai choisi ici de les mentionner sans m'y attarder en raison de leur incapacité à réaliser la présentation croisée (Allan *et al.*, 2003; Cerovic *et al.*, 2013; Igyártó *et al.*, 2011), contrairement aux sous-populations décrites ci-après.

2.3.2. Spécialisation fonctionnelle des cDC1 pour la présentation croisée

Les différences ontogéniques et phénotypiques à l'origine de la distinction entre cDC1 et cDC2 s'accompagnent d'une spécialisation fonctionnelle marquée, d'abord mise en évidence chez les cellules dendritiques résidentes. En effet, après injection d'ovalbumine soluble par voie intraveineuse, et alors même qu'elles internalisent de façon équivalente cet antigène, les cDC1 et cDC2 spléniques résidentes dévoilent un profil de présentation antigénique opposé : tandis que les premières sont seules capables de cross-présenter l'ovalbumine et d'activer les lymphocytes T CD8+ spécifiques de cet antigène, les secondes montrent quant à elles une efficacité supérieure en termes de présentation *via* CMH-II et de prolifération des lymphocytes T CD4+ (Pooley *et al.*, 2001). Les bases de la dichotomie fonctionnelle entre cDC1 et cDC2 sont désormais posées et seront confirmées pour d'autres formes du même antigène (*i. e.* ovalbumine chargée par choc osmotique dans des splénocytes déficients pour la chaîne β 2m constitutive de CMH-I, puis irradiés) (den Haan *et al.*, 2000) ainsi que pour d'autres antigènes, viraux, exprimés

INTRODUCTION

de façon endogène sous contrôle d'un promoteur pancréatique (Belz *et al.*, 2002). La supériorité des cellules dendritiques CD8⁺ résidentes pour la présentation croisée s'exprime dans une grande variété de contextes, qu'il s'agisse d'induction de réponses cytotoxiques dirigées contre des virus (Allan *et al.*, 2003, 2006; Belz *et al.*, 2004, 2005; Busche *et al.*, 2013; GeurtsvanKessel *et al.*, 2008; Whitney *et al.*, 2018) ou contre des tumeurs (McDonnell *et al.*, 2010). Cette observation, tout d'abord basée sur la coculture de clones T spécifiques et de cellules dendritiques purifiées à partir de souris infectées ou porteuses de tumeurs, fut confirmée grâce à l'ablation génétique de Batf3. Les souris déficientes pour Batf3 présentent une anomalie hématopoïétique intrinsèque, notamment caractérisée par l'absence de cellules dendritiques CD8⁺ résidentes. Leur perte est associée à un effondrement de la réponse T CD8⁺ dirigée contre le virus du Nil occidental, ainsi qu'à une incapacité à rejeter des tumeurs normalement efficacement contrôlées par un système immunitaire compétent (Hildner *et al.*, 2008). Ce modèle historique présente cependant un défaut majeur qui réside dans l'élimination d'un lignage complet plutôt que de la fonction qu'il porte (Theisen *et al.*, 2019). Il a donc été récemment supplanté par les souris déficientes pour Wdfy4, dans lesquelles les cDC1 sont présentes mais incapables de réaliser la présentation croisée. L'utilisation de cette lignée murine confirme largement les conclusions obtenues dans les souris Batf3^{-/-} : en effet, la présentation croisée par les cDC1 s'avère indispensable au contrôle de la croissance tumorale et à l'induction de réponses CD8⁺ spécifiquement dirigées contre le virus de la vaccine (Theisen *et al.*, 2018).

En dépit de cette faiblesse, le modèle Batf3 a toutefois permis de déterminer que les cDC1 migratoires CD103⁺ sont apparentées aux cDC1 résidentes (Edelson *et al.*, 2010) et remplissent des fonctions proches, probablement acquises, du moins partiellement, au cours de leur développement (Sathé *et al.*, 2011). Résistantes à l'infection par influenza, ces cellules CD103⁺ transportent les antigènes viraux des poumons jusque dans les ganglions médiastinaux où elles initient elles-mêmes, par l'intermédiaire de la présentation croisée, l'induction des réponses CD8⁺ antivirales (Helft *et al.*, 2012). C'est également le cas dans les tumeurs (Broz *et al.*, 2014) ou dans la peau, où cette fonction est assurée par les cellules dermales CD103⁺ CD207⁺ (Bedoui *et al.*, 2009; Henri *et al.*, 2010). Enfin, il a aussi été proposé que ces cellules migratoires jouent le rôle de vecteur d'antigènes pour les cellules résidentes CD8⁺ (Allan *et al.*, 2003, 2006; Belz *et al.*, 2004; Desch *et al.*, 2011; Whitney *et al.*, 2018). Cette propriété pourrait s'avérer

essentielle dans certains contextes, notamment en l'absence d'antigènes circulant dans la lymphe et normalement accessibles aux cDC1 résidentes.

La propension supérieure des cDC1 à réaliser la présentation croisée a initialement été attribuée à leur capacité unique d'acquisition d'antigènes dérivés de cellules mortes (Iyoda *et al.*, 2002; Kerksiek *et al.*, 2005; Schulz and Reis e Sousa, 2002). Néanmoins, comme nous l'avons vu, les cellules dendritiques utilisent une gamme bien plus étendue d'antigènes comme substrats pour la présentation croisée. Ainsi, l'ovalbumine soluble, adsorbée sur billes ou associée à des splénocytes irradiés est internalisée de façon équivalente par les cDC1 et les cDC2, mais cross-présentée uniquement par les cDC1 (Schnorrer *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une machinerie intracellulaire dédiée à la présentation croisée, à l'origine de la spécialisation fonctionnelle des cDC1.

2.4. Bases moléculaires de la spécialisation fonctionnelle des cDC1 pour la présentation croisée

À l'homéostasie, la présentation croisée d'antigènes solubles ou cellulaires par les cDC1 spléniques se déroule normalement dans des cellules déficientes pour IRAP (Segura *et al.*, 2009). Cette observation, qui suggère l'emploi unique de la voie cytosolique par les cDC1 en conditions homéostatiques, implique également une dépendance absolue de la présentation croisée vis-à-vis de l'export des antigènes dans le cytosol. Dans cette partie, j'aborderai donc les bases moléculaires de la spécialisation fonctionnelle des cDC1 dans la réalisation de ce processus.

2.4.1. Capacité exclusive d'export des antigènes dans le cytosol

L'élucidation des bases moléculaires de la spécialisation des cDC1 pour l'exécution de la présentation croisée est étroitement liée au développement de techniques permettant de rendre compte et de mesurer, de façon quantitative, l'efficacité du transport cytosolique des antigènes. Afin d'étudier la capacité relative des cDC1 et des cDC2 à accomplir cette étape, l'équipe de Jose Villadangos a mis au point un test basé sur les propriétés pro-apoptotiques du cytochrome c. Après endocytose et en cas d'export efficace, le cytochrome c s'associe dans le cytosol à l'adaptateur APAF1 et à la pro-caspase 9 afin de constituer l'apoptosome, une plateforme de recrutement et d'activation des caspases 3 et 6 effectrices de l'apoptose (Lin *et al.*, 2008). Ainsi, *in vivo*, à la suite de l'injection du cytochrome c, la quantification des cellules dendritiques spléniques révèle une déplétion partielle (à hauteur de 50 %), mais hautement sélective de la sous-population CD8+. Les cellules dendritiques CD8- résistent, elles, à l'induction de l'apoptose provoquée par l'injection du cytochrome c (Imai *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2008). Ces résultats fondamentaux démontrent non seulement que la capacité d'export cytosolique du cytochrome c est restreinte aux cDC1, mais aussi que cette faculté n'est pas répartie de façon équivalente entre toutes les cellules de cette sous-population. En effet, la fraction des cellules CD8+ insensible à l'apoptose et donc incapable d'exporter efficacement le cytochrome c dans le cytosol, partage des caractéristiques fonctionnelles avec les cellules CD8- : incapable de réaliser la présentation croisée, cette cohorte de cellules CD8+ présente pourtant une faculté remarquable de présentation des antigènes via le CMH-II. En accord avec les résultats évoqués par Segura *et al.* (2009), cette observation cruciale suggère que la capacité d'une partie des cDC1 à exporter les antigènes dans le cytosol fonde leur supériorité en termes de présentation croisée. À cet égard, il est intéressant de mentionner ici que l'expression transcriptomique de Sec61 (Dudziak *et al.*, 2007) et d'Asah1 et 2, deux céramidasés responsables de la synthèse de sphingosine (immgen.org), est supérieure dans les cDC1, conformément, respectivement, à l'implication d'un transporteur ou d'un évènement de rupture membranaire dans l'export cytosolique des antigènes (voir partie 2.2.2.1). Le déroulement de cette étape est également profondément influencé, voire conditionné, par le potentiel dégradatif des compartiments endocytiques contenant l'antigène. Les cellules dendritiques, et *a fortiori* les cDC1, ont donc

développé à cet effet des mécanismes de régulation complexes de l'expression et de l'activité des protéases lysosomales.

2.4.2. Limitation du potentiel dégradatif des compartiments intracellulaires

L'idée qu'une dégradation ménagée des antigènes puisse favoriser la présentation croisée émergea assez tôt, grâce à une série d'observations comparant deux populations de cellules phagocytaires : les macrophages, peu efficaces en termes de présentation antigénique et les cellules dendritiques, spécialisées pour cette fonction. La richesse des macrophages en diverses protéases lysosomales confère à ces cellules une capacité dégradative forte, essentielle à la destruction des pathogènes phagocytés, mais probablement néfaste à la préservation des épitopes antigéniques. À l'inverse, la protéolyse modérée observée chez les cellules dendritiques facilite la rétention intracellulaire d'antigènes et leur présentation ultérieure (Delamarre *et al.*, 2005; Lennon-Duménil *et al.*, 2002). L'abondance des enzymes protéolytiques diffère également entre cDC1 et cDC2 et corrèle avec le type de présentation réalisé par chacun de ces sous-types de cellules dendritiques : en ce sens, les cDC1 spécialisées pour la présentation croisée expriment plus faiblement les gènes associés aux cathepsines que leurs homologues cDC2, biaisées pour la présentation CMH-II, au cours de laquelle les antigènes sont clivés dans les lysosomes (Dudziak *et al.*, 2007).

Le lien, jusque-là purement corrélatif, entre efficacité de la présentation croisée et intensité de la protéolyse dans les compartiments intracellulaires fut directement démontré par des expériences de ciblage antigénique. De fait, l'adressage d'un antigène modèle à des compartiments tardifs facilite la présentation via CMH-II, alors que son ciblage vers des compartiments précoces, faiblement dégradatifs, favorise la présentation croisée (Belizaire and Unanue, 2009). Ainsi, parce qu'il conditionne le devenir des antigènes internalisés, le potentiel dégradatif des compartiments endocytiques constitue un point de contrôle majeur des voies de présentation dans les cellules dendritiques. Afin de favoriser l'engagement des antigènes dans la présentation croisée, les cDC1 disposent donc d'un arsenal moléculaire chargé non seulement de limiter l'expression des hydrolases lysosomales, mais aussi de réduire leur activité.

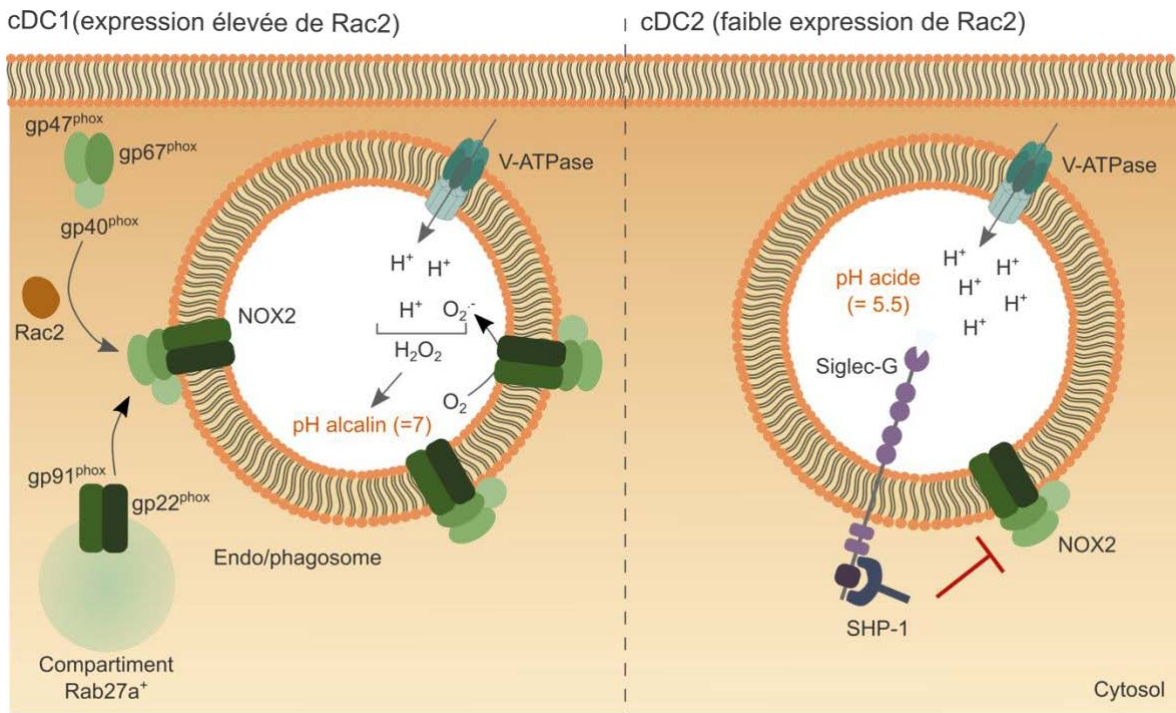


Figure I.2.6. : Régulation du pH et du potentiel dégradatif des compartiments intracellulaires dans les cDC1 et cDC2

Dans les cDC1, les niveaux cellulaires élevés de Rac2 dirigent les sous-unités cytosoliques de NOX2 (gp40^{phox}, gp47^{phox} et gp67^{phox}) à la membrane des compartiments endocytiques. En parallèle, la fusion des compartiments « associés aux lysosomes » (« lysosome-related ») marqués par Rab27a avec les compartiments endocytiques finalise l'assemblage de NOX2, par l'intermédiaire de l'apport des sous-unités membranaires (gp22^{phox} et gp91^{phox}) de l'enzyme. Ainsi constituée, NOX2 génère des espèces réactives de l'oxygène dans la lumière de l'endo/phagosome et y maintient un pH alcalin, grâce à la neutralisation des protons importés par la V-ATPase. A l'inverse, dans les DC2, NOX2 est principalement assemblée à la membrane plasmique (non représenté ici) en raison de l'expression de faibles niveaux de Rac2. Par ailleurs, le fonctionnement de quelques molécules NOX2 associées aux endomembranes est inhibé par l'action de la phosphatase SHP-1, recrutée par Siglec-G. Cette cascade d'événements conduit à l'obtention d'un pH acide dans les compartiments des DC2, responsable du potentiel protéolytique élevé de ces structures.

INTRODUCTION

Le contrôle de l'abondance des enzymes protéolytiques s'opère avant tout au niveau transcriptionnel, par l'intermédiaire du facteur de transcription TFEB, un régulateur central de la biogénèse des lysosomes. Dans les cDC1, le faible niveau d'expression de TFEB restreint la synthèse des protéases et la dégradation antigénique associée, ce qui promeut la présentation croisée (Samie and Cresswell, 2015). Par ailleurs, la traduction des transcrits codant pour les enzymes lysosomales est aussi modulée par la présence et la reconnaissance d'une adénosine méthylée (m⁶A). Ainsi, la liaison par YTHDF1 de la modification m⁶A portée par les transcrits sus-cités provoque leur traduction (Han *et al.*, 2019). Si cette étude démontre clairement, grâce aux souris *Ythdf1*^{-/-}, que l'abrogation génétique de cette voie de synthèse des hydrolases améliore l'efficacité de la présentation croisée et des réponses antitumorales, l'existence d'une régulation différentielle des machineries de dépôt et de reconnaissance de la marque m⁶A entre cDC1 et cDC2 reste désormais à prouver.

Parallèlement, l'activité protéolytique des hydrolases lysosomales présentes est conditionnée en grande partie par la valeur du pH des compartiments intracellulaires : un pH acide favorise leur action, tandis qu'un pH alcalin l'inhibe, au moins partiellement. Dans les macrophages, la pompe V-ATPase génère un flux de protons H⁺, responsable de l'acidification rapide (pH < 5,5) de la lumière du phagosome (Lukacs *et al.*, 1990). À l'inverse, dans les cellules dendritiques, l'assemblage incomplet des sous-unités V₀ et V₁ de la V-ATPase limite l'influx protonique, la chute du pH et l'activité des hydrolases acides (Trombetta *et al.*, 2003). En plus de cet élément de contrôle commun à toutes les sous-populations de cellules dendritiques, les cDC1 disposent d'un second mécanisme d'alcalinisation active du pH endo/phagosomal médié par la NADPH oxydase NOX2. Cette dernière est constituée de trois sous-unités cytosoliques p47_{phox}, p40_{phox}, p67_{phox} et d'un hétérodimère membranaire composé des sous-unités p22_{phox} et gp91_{phox}. Le recrutement et l'assemblage de ces sous-unités à la membrane du compartiment contenant l'antigène sont l'objet d'une régulation complexe. Ainsi, dans un premier temps, l'engagement par VAMP8, située à la membrane des organelles Rab27a⁺ contenant p22_{phox} et gp91_{phox}, de ses partenaires syntaxine-7 et SNAP23, localisées à la membrane de l'endo/phagosome contenant l'antigène, orchestre la fusion de ces deux compartiments, et donc, le recrutement des sous-unités membranaires de NOX2 (Dingjan *et al.*, 2017; Jancic *et al.*, 2007; Matheoud *et al.*, 2013) (Figure I.2.6.). Dans les cDC1, l'assemblage de NOX2 est finalisé grâce au recrutement des sous-unités cytosoliques p47_{phox}, p40_{phox}, p67_{phox} par la petite GTPase

Rac2, sélectivement exprimée dans cette population de cellules dendritiques (Savina *et al.*, 2009) (Figure I.2.6.). L'association de l'ensemble des sous-unités de NOX2 conduit à l'activation de l'enzyme, désormais capable de catalyser la réaction d'oxydation du NADPH par l'oxygène et la libération d'ions superoxydes O_2^- . La formation de ces espèces réactives de l'oxygène est absolument déterminante dans la spécialisation fonctionnelle des cDC1 pour la présentation croisée. Premièrement, ces ions consomment les protons générés par la v-ATPase lors de leur conversion en peroxyde d'oxygène (H_2O_2) et contribuent donc au maintien d'un pH alcalin (autour de 7 – 7,5) dans les cDC1 (Savina *et al.*, 2006, 2009) (Figure I.2.6.). De ce fait, par l'intermédiaire de la neutralisation des propriétés acidifiantes de la pompe à protons, NOX2 limite l'activité des protéases endo/phagolysosomales et participe à la préservation des épitopes antigéniques, favorisant ainsi leur engagement dans la présentation croisée (Graham *et al.*, 2007; Savina *et al.*, 2006). D'autre part, il est intéressant de constater qu'en vertu de la présence membranaire de la forme active de NOX2, les cDC1 produisent des quantités plus élevées d'espèces réactives de l'oxygène que les cDC2, incapables de recruter les sous-unités cytosoliques de l'enzyme (Savina *et al.*, 2009). Au regard de l'implication nouvelle des radicaux oxygénés générés par NOX2 dans la peroxydation des lipides et l'induction de la rupture du compartiment endo/phagosomal (Dingjan *et al.*, 2016), ces ions revêtent désormais une importance considérable, autrefois largement sous-estimée, dans la spécialisation des cDC1 pour l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée.

Alors que les cDC1 régulent finement l'assemblage endo/phagosomal de NOX2, pierre angulaire de leur spécialisation fonctionnelle pour la présentation croisée, les cDC2 tendent au contraire à inhiber activement ce processus. En effet, dans les cDC2, l'expression sélective de la lectine Siglec-G à la membrane endo/phagosomale entraîne le recrutement de la phosphatase SHP-1, responsable de la déphosphorylation de gp97_{phox} et de l'inactivation de NOX2 (Figure I.2.6.). L'acidification luminale qui en découle provoque l'activation des hydrolases acides, la dégradation des antigènes extracellulaires et leur présentation via CMH-II, plutôt que via CMH-I (Ding *et al.*, 2016).

Enfin, il est également à noter que les radicaux oxygénés produits par NOX2 sont également requis pour le recrutement des complexes de conjugaison ATG7 et ATG12-ATG5/ATG16 associés, entre autres, à la machinerie autophagique (Martinez *et al.*, 2015).

Cependant, la relevance de l'autophagie et des voies associées dans la présentation croisée est encore à ce jour discutée et apparaît dans certains cas totalement superflue (Lee *et al.*, 2010) ou, au mieux, restreinte à la présentation croisée d'antigènes solubles (Mintern *et al.*, 2015).

2.4.3. Ciblage des antigènes vers des compartiments favorables à la réalisation de la présentation croisée

Grâce à un pH alcalin et une faible capacité dégradative, les compartiments endocytiques précoces, caractérisés par l'expression du marqueur EEA1, sont les lieux privilégiés de l'export des antigènes et de la formation des complexes CMH-I/peptide lors de la présentation croisée (Ackerman *et al.*, 2003; Burgdorf *et al.*, 2007, 2008; Helft *et al.*, 2012; Kretzer *et al.*, 2016). À cet égard, les cDC1 sont naturellement équipées d'un ensemble de récepteurs membranaires qui adressent les antigènes exogènes en direction de ces compartiments et favorisent de ce fait la présentation croisée. Le récepteur DNGR-1/Clec9a, sélectivement exprimé à la surface des cDC1 (comme mentionné en partie 2.3.1.), appartient à cette catégorie et constitue un exemple particulièrement parlant. Clec9a lie spécifiquement des complexes formés de filaments d'actine, regroupés en « paquets » par la myosine II (Ahrens *et al.*, 2012; Hanč *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2018), et exposés par les cellules nécrotiques ou nécroptotiques (Sancho *et al.*, 2009). Si Clec9a n'est pas responsable *per se* de la liaison de l'antigène, il permet la reconnaissance de matériel nécrotique et dirige les cargos antigéniques associés vers des endosomes de recyclage distincts des lysosomes (Iborra *et al.*, 2012; Sancho *et al.*, 2009; Zelenay *et al.*, 2012). De cette façon, dans les cDC1, Clec9a induit *in vitro* et *in vivo* la présentation croisée d'antigènes viraux dérivés de cellules mourantes et joue un rôle clé dans l'induction des réponses antivirales et la résolution des infections (Iborra *et al.*, 2012; Zelenay *et al.*, 2012). Le récepteur au mannose, initialement supposé lier l'ovalbumine et la cibler vers les compartiments précoces (Burgdorf *et al.*, 2006, 2007), présente un rôle plus ambigu et sa relevance physiologique est discutée. En effet, en conditions homéostatiques, les cDC1 ne l'expriment pas et son absence dans les cellules dendritiques est donc sans conséquence sur la présentation croisée de cet antigène (Segura *et al.*, 2009).

Si l'importance réelle du récepteur au mannose reste à clarifier, le ciblage d'antigènes sur certains récepteurs spécifiques n'en demeure pas moins une stratégie efficace d'induction de la présentation croisée, non seulement par les cDC1, mais aussi par les cDC2. Ainsi, l'ovalbumine injectée sous forme de complexes immuns est présentée efficacement par les cDC1 et les cDC2, mais selon des modalités différentes. Dans les cDC2, la liaison des complexes immuns par les récepteurs Fc γ (Fc γ R) et l'activation qui s'ensuit conditionne entièrement la capacité de ces cellules à réaliser la présentation croisée. À l'inverse, dans les cDC1, cette compétence ne dépend aucunement de la présence à la surface cellulaire des récepteurs activateurs Fc γ RI et Fc γ RIII (den Haan and Bevan, 2002). Ces résultats fondateurs suggèrent que les cDC1 présentent une propension constitutive pour la présentation croisée, uniquement inductible dans les cDC2 par l'engagement de signaux d'activation. Dans cet ordre d'idées, l'instauration d'un contexte de stimulation (α CD40 et polyI:C) rend possible l'établissement de réponses antitumorales protectrices par les cDC2, à la suite du ciblage d'antigènes tumoraux vers le récepteur DCIR2 (voir partie 2.3.1.) (Neubert *et al.*, 2014). De même, l'induction de réponses cytotoxiques dans des souris déficientes pour Batf3 repose sur l'activation des cDC2 par un ligand de TLR7, exprimé spécifiquement sur ces cellules (Desch *et al.*, 2014).

Ces observations intrigantes laissent envisager que la signalisation en aval des récepteurs TLR module l'activation de la machinerie spécialisée décrite en partie 2.4., notamment dans les cDC2. Cette idée sera donc développée dans la partie suivante.

2.5. Régulation de la présentation croisée par les récepteurs de l'immunité innée

Si l'activation des cellules dendritiques par les ligands des TLR se traduit par une augmentation progressive de l'expression des molécules de costimulation (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004; Granucci *et al.*, 1999), l'évolution de l'efficacité de la présentation croisée ne suit pas la même linéarité (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004). J'ai donc choisi dans la suite de cette partie de séparer la période post-stimulation en trois phases (précoce, intermédiaire et tardive) comme définies par Alloatti *et al.*, (2016a), et de caractériser les événements intracellulaires associés à chacun de ces intervalles temporels. Dans l'immense majorité des processus décrits ci-après, le

LPS est employé comme ligand type. Dans le cas contraire, la nature du ligand TLR utilisé sera précisée.

2.5.1. Phase précoce

Les limites temporelles de la phase précoce, telles que définies par Alloatti *et al.*, (2016a) s'étendent de zéro à six heures post-stimulation. Cette phase est notamment caractérisée par une élévation progressive de l'expression de CD86 et CD40 (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004; Granucci *et al.*, 1999) à la surface des cellules dendritiques ainsi que par une capacité endocytaire accrue (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004; West *et al.*, 2004). S'il est possible que cette dernière participe à l'augmentation observée de la présentation croisée des complexes immuns (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004; West *et al.*, 2004) et des antigènes solubles (Burgdorf *et al.*, 2008), la présence de ligands des TLR affecte bien d'autres aspects de la physiologie des cellules dendritiques. Ainsi, une courte stimulation par le LPS conduit à une hausse de l'export cytosolique de la HRP par les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDCs). Cet événement transitoire résulte, au moins en partie, de la préservation des antigènes liée au ralentissement de la maturation endo/phagosomale sous l'effet du LPS (Lennon-Duménil *et al.*, 2002; Weimershaus *et al.*, 2018). De plus, l'induction de la signalisation dépendante de TRIF en aval de TLR4, requise pour le transport des antigènes depuis les compartiments intracellulaires (Zehner *et al.*, 2015), contribue aussi vraisemblablement au phénotype observé. Je profite ici de l'énonciation de ces caractéristiques pour souligner que la plupart des tests expérimentaux employés pour mesurer quantitativement l'export cytosolique des antigènes (y compris le test β -lactamase sur lequel se basent nos résultats) s'appuient sur l'utilisation de réactifs contaminés par des endotoxines bactériennes. Compte tenu du rôle de ces substances dans divers aspects de la biologie du compartiment endocytaire et de l'export des antigènes qu'il contient, il est important de garder ce paramètre à l'esprit. Le développement récent d'un nouveau test d'export, basé sur l'usage d'un variant de la luciférase dont l'activité est détectable uniquement à la suite de la déglycosylation cytosolique de l'enzyme, devrait permettre de s'affranchir des biais liés à la présence d'endotoxines (Lu *et al.*, 2018).

L'activation des voies en aval des récepteurs TLRs stimule non seulement l'export cytosolique des antigènes, et donc par extension leur dégradation protéasomique, mais favorise aussi l'import endo/phagosomal et le chargement des peptides produits. Ainsi, la présence d'endotoxines provoque le recrutement de TAP à la membrane des endosomes précoces (Burgdorf *et al.*, 2008). Par ailleurs, la liaison de TLR4 entraîne l'activation de la kinase IKK2, responsable de la phosphorylation de SNAP23. Phospho-SNAP23 stabilise ensuite l'arrimage des endosomes de stockage de CMH-I, marqués par Rab11a, au phagosome. La fusion de ces deux compartiments conduit *in fine* à l'apport massif de molécules de CMH-I au niveau du phagosome, le rendant de ce fait compétent pour la présentation croisée des antigènes bactériens, particuliers ou cellulaires contenus dans la lumière (Nair-Gupta *et al.*, 2014).

2.5.2. Phase intermédiaire

Dans les six à dix-huit heures suivant l'engagement des récepteurs TLRs, l'expression des molécules de costimulation atteint son niveau maximal tandis que la capacité endocytaire des cellules dendritiques poursuit sa décroissance (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004). Ce facteur ne semble pourtant pas limiter de façon notable la compétence des cellules dendritiques pour la présentation croisée d'antigènes solubles et particuliers, puisque l'efficacité de cette dernière augmente drastiquement *in vitro* et *in vivo* durant cette période (Alloatti *et al.*, 2015; Drutman and Trombetta, 2010). Par des mécanismes encore méconnus, l'activation des TLR4, 7, 8 et 9 aboutit à la séquestration, dépendante de Rab34, des lysosomes dans la région périnucléaire des cellules dendritiques (Alloatti *et al.*, 2015). Ainsi regroupés, les lysosomes se trouvent dans l'impossibilité partielle de fusionner avec les phagosomes, ce qui se traduit par un retard de maturation de ce compartiment et une dégradation ménagée des antigènes luminaux. Cette phase intermédiaire, favorable au déroulement de la présentation croisée, n'est cependant que transitoire, puisque lui succède une phase dite tardive au cours de laquelle l'induction de ce processus est presque totalement inhibée.

2.5.3. Phase tardive

La phase tardive débute autour de vingt heures post-stimulation. Durant cette période, les formes non spécifiques d'internalisation des antigènes, comme la macropinocytose, sont quasiment abrogées tandis que l'endocytose médiée par des récepteurs (via DEC-205 ou FcγR) et la phagocytose demeurent actives (Platt *et al.*, 2010). Si les études ne s'accordent pas toutes sur l'efficacité de la présentation croisée des complexes immuns, liés par FcγR dans les BMDCs, après vingt à quarante heures de traitement par le LPS (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004; Platt *et al.*, 2010), il semble clair que cette durée de stimulation conduit, de façon générale, à une diminution de la présentation des antigènes solubles et particuliers *via* CMH-I (Alloatti *et al.*, 2015; Samie and Cresswell, 2015; Wagner *et al.*, 2013). Comme précédemment, l'ampleur des mécanismes d'internalisation ne semble pas constituer le déterminant principal de cette détérioration (Datta *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2013). En effet, durant la phase tardive d'activation, l'inhibition de la présentation croisée découle probablement, du moins partiellement, de la faible translocation des antigènes dans le cytosol observée dans ces conditions (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004). Il est possible que l'acidification importante du compartiment endocytique, produite par l'assemblage des sous-unités V₀ et V₁ de la V-ATPase, soit responsable de cette baisse de l'export cytosolique (Trombetta *et al.*, 2003). En parallèle, l'induction, sous l'effet du LPS, du facteur de transcription TFEB contribue massivement à la réduction de l'efficacité de la présentation croisée par l'intermédiaire, là aussi, d'une acidification rapide du pH luminal (Samie and Cresswell, 2015).

Enfin, il est à noter que les résultats présentés dans cette section ont été tous obtenus dans des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse et leur relevance dans les cDC1 et les cDC2, aux spécificités fonctionnelles marquées, reste encore à démontrer.

Cette partie a montré la régulation extrêmement fine auquel est soumis le déroulement de la présentation croisée dans les cellules dendritiques. Il ne s'agit cependant que d'un niveau de contrôle opéré dans les cellules présentatrices d'antigènes. En effet, un degré supplémentaire de complexité est atteint avec la participation des cellules donneuses d'antigènes à la régulation de l'efficacité de la présentation croisée. Cet aspect sera développé dans la partie suivante.

3. REGULATION DE LA PRESENTATION ET DE L'ACTIVATION CROISEE GRACE A L'INDUCTION DES VOIES DE MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES DONNEUSES D'ANTIGENES

Si, comme présenté dans la partie précédente, la présentation croisée est contrôlée extrêmement finement dans les cellules présentatrices d'antigènes, un niveau supplémentaire de régulation s'opère dans les cellules donneuses d'antigènes, par l'intermédiaire de l'induction de certaines voies de mort cellulaire.

Dans cette section, seront décrites trois modalités de mort cellulaire impliquées dans l'activation croisée (« cross-priming »), parmi lesquelles la nécrose, mort cellulaire accidentelle et par définition non-contrôlée, et deux voies de mort dites « régulées » (Galluzzi *et al.*, 2018) : l'apoptose et la nécroptose. J'insisterai particulièrement sur la caractérisation de la nécroptose, dont le rôle dans l'efficacité de l'activation croisée se dessine désormais nettement, comme discuté en fin de partie.

3.1. Voies de mort cellulaire régulatrices de l'activation croisée

L'étude des mécanismes responsables de la mort des cellules a historiquement tout d'abord opposé l'apoptose, considérée comme « physiologique » et contrôlée grâce à une cascade d'activation séquentielle des caspases, à la nécrose définie comme une « explosion » cellulaire accidentelle. Je passerai brièvement sur la caractérisation de la nécrose, qui bien que nécessaire pour comprendre ses implications dans l'activation croisée, n'est l'objet d'aucune régulation moléculaire, en raison de sa nature même.

3.1.1. La nécrose accidentelle

Induit expérimentalement par des cycles de congélation et décongélation des cellules, ce type de mort cellulaire est caractérisé par un gonflement des organelles et une rupture de la membrane plasmique, responsable de la libération du contenu intracellulaire. D'origine

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.1. : Complexes de mort cellulaire activés en aval de TNFR1

A la suite de l'engagement de TNFR1 et de sa trimérisation (1), la formation du complexe I, fortement poly-ubiquitinylé, conduit à l'activation de la voie NF- κ B (2), indépendamment de l'activité kinase de RIPK1 (inhibée ici par une série de phosphorylations). Alternativement, l'activation de RIPK1 (réalisée notamment au travers de l'inhibition de TAK1 ou IKK) conduit à la formation d'un intermédiaire poly-ubiquitinylé (uRIPK1), support de la formation du complexe IIb, responsable de l'apoptose dépendante de RIPK1 (5). En cas d'inhibition de caspase-8, ce complexe évolue (?) vers la formation du nécrosome, une plateforme d'activation de RIPK3 et de sa cible, l'effecteur terminal de la nécroptose MLKL. Figure également sur ce schéma le complexe IIa, un complexe pro-apoptotique indépendant de la fonction kinase de RIPK1, formé à la suite de traitements inhibiteurs de la synthèse protéique (3). Le nécrosome peut également être formé à partir de cette structure. Néanmoins en raison du caractère probablement largement artificiel de ce complexe, j'ai choisi de l'effacer de la représentation initiale. Adapté de Yuan *et al.*, (2019).

accidentelle et initiée par des stress de nature physique, chimique ou mécanique, elle n'est contrôlée par aucune voie de signalisation moléculaire (Galluzzi *et al.*, 2018).

3.1.2. Les voies de mort cellulaire régulées

J'ai choisi d'aborder l'induction des voies de mort cellulaire régulées à travers l'exemple de l'engagement du récepteur au TNF de type 1 (TNFR1) car il s'agit de la situation la mieux définie d'un point de vue expérimental. À travers cet exemple, les acteurs clés de ces voies, ainsi que leurs modalités d'interaction seront exposés.

3.1.2.1. Le complexe I, un complexe de survie cellulaire

Les fonctions portées par le TNF α sont généralement associées à l'induction de signaux de survie cellulaire, par l'intermédiaire de la formation du complexe I. Celle-ci débute par la liaison du TNF α à TNFR1, au niveau de la membrane plasmique, ce qui entraîne la trimérisation du récepteur et le recrutement de l'adaptateur TRADD et de la kinase RIPK1 (déjà évoquée en partie 1.1.1.) (Figure I.3.1.). Cette protéine possède un statut particulier puisqu'en fonction du complexe auquel elle est associée, elle peut favoriser la survie ou la mort cellulaire, *via* différents mécanismes abordés dans cette partie et dans celles qui suivent.

Au sein du complexe I, RIPK1 subit une série de modifications post-traductionnelles qui inhibent son activité kinase mais garantissent le maintien de son rôle structurant, essentiel à la fonction pro-survie du complexe (Lee *et al.*, 2004). Les fondations de cet échafaudage moléculaire reposent sur la poly-ubiquitination, en différentes positions, de RIPK1 par les E3 ubiquitine ligases cIAP1 et cIAP2 et par le complexe LUBAC (Bertrand *et al.*, 2008; Gerlach *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2009) (Figure I.3.1.). En permettant le recrutement des hétérotrimères TAB2/TAB3/TAK1 et IKK α /IKK β /NEMO, l'ajout de ces chaînes d'ubiquitine sur RIPK1 remodèle en profondeur le complexe I et conduit à deux événements majeurs. D'une part, comme explicité en partie 1.1.1., la phosphorylation du complexe IKK par TAK1 entraîne l'activation de la voie NF- κ B, responsable de l'expression du facteur anti-apoptotique cFLIP. (Micheau *et al.*, 2001). D'autre part, les kinases activées TAK1, IKK α / β et TBK1 (également recrutée grâce aux chaînes d'ubiquitine déposées par LUBAC) catalysent l'ajout de groupements

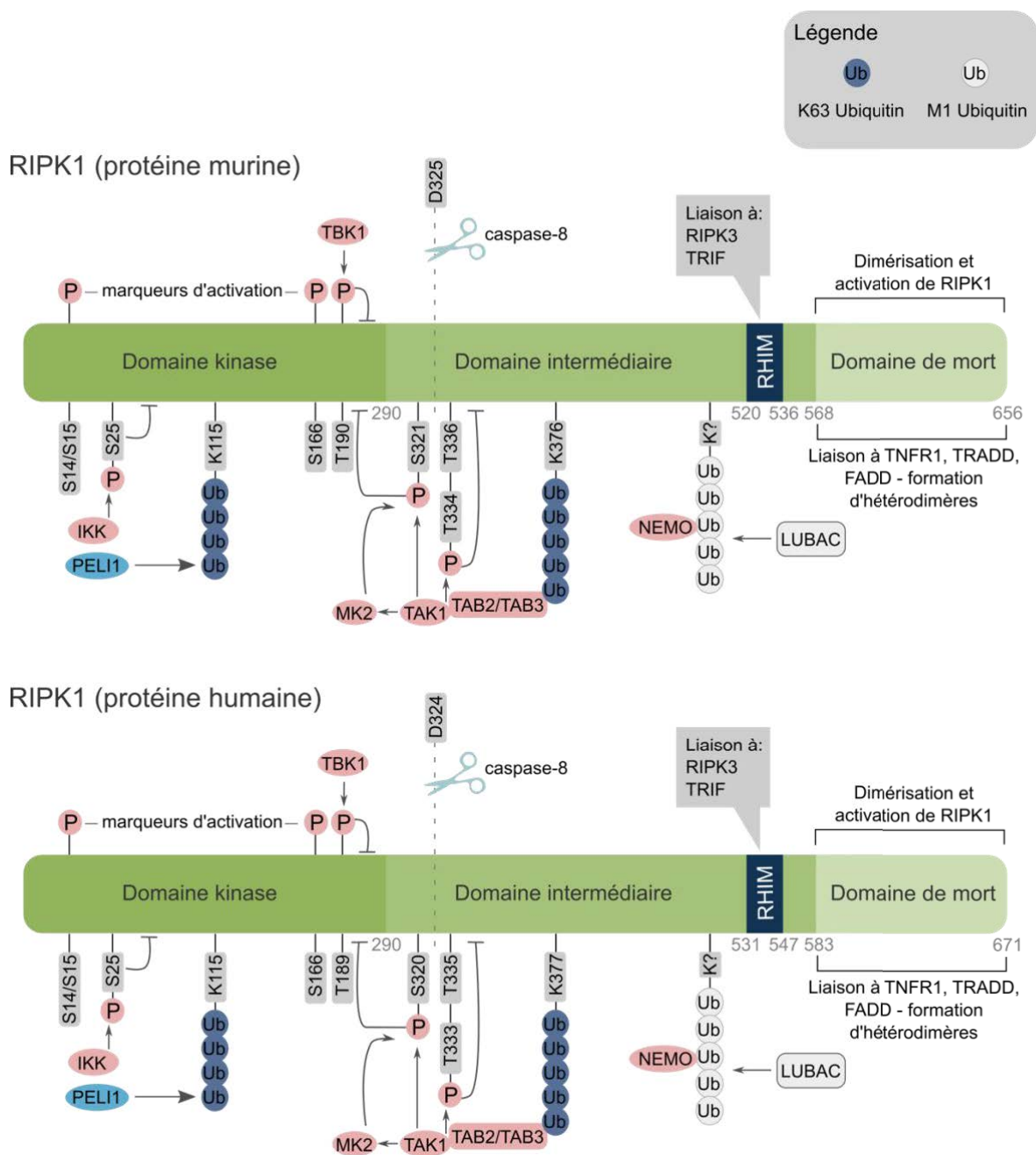


Figure I.3.2. : Carte des modifications post-traductionnelles, activatrices et inhibitrices de RIPK1 chez l'homme et la souris

Représentation schématique des protéines RIPK1 murine (panel du haut) et humaine (panel du bas) de RIPK1. Y figurent les sites de phosphorylations inhibitrices (par IKK, MK2 et TAK1) ou activatrices (souvent autophosphorylations, notamment en S14/S15 et S166). Les chaînes de polyubiquitine, nécessaires au recrutement de IKK/NEMO ou TAK1/TAB2/TAB3 et à l'inhibition de RIPK1 au sein du complexe I, sont également représentées. Enfin, le site de clivage par caspase-8, ainsi que les différents domaines constitutifs de la protéine et leurs rôles sont mentionnés. Adapté et enrichi de Yuan *et al.*, (2019).

phosphates en diverses positions de RIPK1 (Dondelinger *et al.*, 2019; Geng *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018) (Figure I.3.2.). Toutes ces phosphorylations inhibent l'activité kinase de RIPK1, nécessaire à l'exécution des voies apoptotique et nécroptotique (Figure I.3.2.). Si cette série de phosphorylations inhibitrices, cruciales pour le maintien de la fonction pro-survie du complexe I, prend place à la membrane plasmique, il est également à noter qu'un second garde-fou de l'activation de RIPK1, sous contrôle de la kinase MK2, existe dans le cytoplasme (Dondelinger *et al.*, 2017; Menon *et al.*, 2017).

Ainsi, la formation du complexe I promeut la survie cellulaire directement, grâce à l'induction de NF- κ B, et indirectement, par l'intermédiaire de l'inhibition des fonctions pro-apoptotiques et pro-nécroptotiques de RIPK1. À l'inverse, la déstabilisation du complexe I initie le déclenchement de différentes voies de mort cellulaire et illustre la versatilité des activités de RIPK1, comme explicité dans la partie suivante.

3.1.2.2. L'apoptose

Première modalité de mort cellulaire caractérisée au niveau moléculaire, l'apoptose est définie par l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 vers laquelle convergent les composantes intrinsèque et extrinsèque de cette voie. Je commencerai par décrire les acteurs principaux de la voie extrinsèque, en m'appuyant toujours sur le modèle de l'induction par TNFR1 et la déstructuration du complexe I, avant d'aborder la voie intrinsèque, dont certains aspects me semblent pertinents du fait de leur contribution à l'immunogénicité de l'apoptose (évoquée en partie 3.2.2.2.).

Voie extrinsèque – apoptose dépendante de RIPK1

Lorsqu'elle est initiée en aval de TNFR1, la voie extrinsèque repose sur la formation d'un complexe cytosolique, appelé complexe IIb, dont la résultante en termes de mort cellulaire est dictée en premier lieu par le degré d'ubiquitination de RIPK1, qui conditionne le recrutement des kinases inhibitrices, et en second lieu par la disponibilité cellulaire des isoformes de cFLIP. Ainsi, la perturbation de l'ubiquitination de RIPK1 et de ses conséquences, induite notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de cIAP1/2 et de TAK1, provoque la levée

de la répression exercée par les kinases TAK1 et IKK (Dondelinger *et al.*, 2019) et l'accumulation de RIPK1 autophosphorylée au sein du complexe I (Amin *et al.*, 2018). Ainsi activée, RIPK1 se dissocie du complexe I pour rejoindre le cytosol sous forme d'un intermédiaire hautement insoluble (Figure I.3.1.). Il est possible que l'adoption de cette forme facilite la dimérisation de RIPK1 (Meng *et al.*, 2018) et son association, au sein du complexe IIb, avec l'adaptateur FADD, la caspase-8 et possiblement la kinase RIPK3, dont nous développerons la fonction nécroptotique ultérieurement (Figure I.3.1.).

En dépit de la présence de RIPK3 dans le complexe cytosolique IIb, ce dernier ne conduit pas systématiquement à l'initiation de la nécroptose. L'issue de la formation de ce complexe dépend en effet de la disponibilité cellulaire des isoformes de cFLIP, cFLIP_L et cFLIP_S, tous deux régulateurs de l'activité de la caspase-8. En effet, cFLIP_L, par l'intermédiaire de son association avec cette caspase, stimule partiellement son activité protéolytique (Oberst *et al.*, 2011) tandis que cFLIP_S l'inhibe totalement (Feoktistova *et al.*, 2011). Ainsi, en favorisant ou au contraire en bloquant la dégradation de RIPK1 et RIPK3 par caspase-8, l'abondance relative des isoformes cFLIP_L et cFLIP_S dicte la sensibilité des cellules vis-à-vis de la nécroptose. Si les déterminants de l'engagement de caspase-8 avec elle-même ou avec les isoformes de cFLIP sont encore méconnus, il est cependant clair que seule l'homodimérisation de cette caspase initiateur conduit à l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 et à l'exécution de l'apoptose extrinsèque.

Par ailleurs, il est à noter qu'il existe également une voie extrinsèque d'induction de l'apoptose, indépendante de l'activité kinase de RIPK1. Cette voie est déclenchée par l'inhibition tardive de NF- κ B et entraîne la formation du complexe IIa constitué de TRADD, FADD et caspase-8 (Figure I.3.1.). La pertinence physiologique de cette voie, probablement largement artificielle, reste cependant à démontrer (Amin *et al.*, 2018; Micheau *et al.*, 2001).

Enfin, l'apoptose extrinsèque peut aussi être initiée en aval d'autres récepteurs de mort, comme Fas (CD95). Dans ce cas, elle implique l'association d'un complexe appelé DISC, composé uniquement de FADD et caspase-8, à l'origine de l'activation de cette dernière.

Si l'apoptose peut être déclenchée par des signaux externes, comme TNF α ou le ligand de Fas, elle est également provoquée par certains stress intracellulaires et implique dès lors d'autres voies, distinctes mais connectées à la voie extrinsèque.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.3. : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

(a) Manifestations cellulaires de l'apoptose. Il manque sur ce schéma l'émission terminale de corps apoptotiques à partir des bourgeons membranaires. Adapté de Hotchkiss *et al.*, (2009). (b) Observation de cellules RAW264.7 (macrophages) apoptotiques (induction par TNF et mimétiques de Smac) au microscope électronique à balayage. Les bourgeons membranaires sont particulièrement visibles. Tiré de Zhang *et al.*, (2018).

INTRODUCTION

Voie intrinsèque – apoptose dépendante du relargage du cytochrome c

Sous l'influence de divers signaux, comme la présence de dommages à l'ADN ou le traitement par certains agents chimiothérapeutiques, le facteur Bak est relocalisé à la membrane mitochondriale externe où il s'associe avec la protéine cytosolique Bax. La perturbation de l'intégrité membranaire provoquée par l'oligomérisation de Bak et Bax entraîne la libération dans le cytoplasme du cytochrome c, normalement séquestré dans la mitochondrie. Comme décrit en partie 2.4.1., le relargage cytosolique du cytochrome c conditionne la formation de l'apoptosome, une plateforme d'activation de la pro-caspase 9 initiatrice. Cette dernière clive ensuite les caspases effectrices 3, 6 et 7, nécessaires à l'exécution de l'apoptose.

Il est par ailleurs intéressant d'observer que des connexions existent entre les voies extrinsèque et intrinsèque : ainsi, l'association entre Bak et Bax est facilitée par la protéine tBid, activée par clivage grâce à la caspase-8. Nous verrons par la suite que cette fonction de la caspase-8 revêt une importance particulière dans l'induction des formes immunogènes de l'apoptose.

Les voies intrinsèque et extrinsèque convergent toutes deux vers l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7, dont l'activité protéolytique dicte la morphologie typique adoptée par les cellules apoptotiques.

Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

L'activation des caspases effectrices aboutit au clivage de milliers de substrats protéiques porteurs de fonctions cruciales pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. En particulier, la dégradation de nombreuses protéines structurelles modifie en profondeur la morphologie cellulaire. Ainsi, au niveau macroscopique, les cellules apoptotiques montrent une réduction du volume cellulaire associée au développement de bourgeons membranaires, libérés sous forme de corps apoptotiques et marqués par l'externalisation de la phosphatidylsérine (Figure I.3.3.). Si, lors de la phase précoce de l'apoptose, l'intégrité membranaire des cellules mourantes est maintenue, ce n'est plus le cas au cours de la phase tardive durant laquelle des événements de rupture membranaire surviennent. On parle alors de nécrose secondaire. Récemment, une étude a proposé que gasdermine E, une protéine pourtant caractéristique d'un autre type de mort

cellulaire (*i. e.* la pyroptose), contrôle la progression des cellules apoptotiques vers l'état de nécrose secondaire (Rogers *et al.*, 2017). Ces résultats, qui complexifient encore davantage notre idée du déroulement de l'apoptose, restent cependant à confirmer.

3.1.2.3. La nécroptose

Également initiée, entre autres, en aval de TNFR1, la nécroptose est une forme de mort cellulaire régulée définie par sa dépendance exclusive vis-à-vis de l'activation séquentielle des kinases RIPK3 et MLKL. Comme brièvement exposé dans la partie précédente, l'activité protéolytique de la caspase-8 constitue un frein majeur à l'initiation de cette voie. L'induction de la nécroptose repose donc d'une part, comme l'apoptose, sur la levée de l'inhibition de RIPK1, et d'autre part sur l'inactivation de la caspase-8 (provoquée expérimentalement par l'utilisation d'inhibiteurs de caspases à large spectre comme zVAD-FMK) à l'origine de la stabilisation de RIPK1 et RIPK3. Ces deux protéines constituent les éléments de base du complexe IIc, aussi appelé nécrosome et responsable de l'induction nécroptotique (Figure I.3.1.).

L'origine de ce complexe demeure discutée mais certains résultats récents suggèrent qu'il découlerait d'un complexe IIb, rendu inactif par l'inhibition de caspase-8. En effet, l'E3 ubiquitine ligase Pellino-1 pourrait simultanément bloquer l'activation de la caspase-8 et faciliter l'association de RIPK1 et RIPK3 au sein du nécrosome, par l'intermédiaire de la conjugaison d'une nouvelle chaîne d'ubiquitine sur RIPK1 (de Almagro *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017a) (Figure I.3.1. et Figure I.3.2.). Si le rôle de Pellino-1 dans la formation du nécrosome reste à confirmer, d'autres aspects de l'assemblage de ce complexe sont définis avec davantage de certitudes. Ainsi, l'interaction entre RIPK1 et RIPK3 est principalement médiée par leurs domaines RHIM respectifs (Cho *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Bien que nécessaire pour nucléer la formation du nécrosome, la liaison initiale entre RIPK1 activée et RIPK3 n'est pas suffisante pour induire la nécroptose (Wu *et al.*, 2014). L'activation de cette voie requiert en effet le recrutement additionnel de nouveaux monomères de RIPK3, qui par l'intermédiaire d'interactions homotypiques, s'associent entre eux pour former des homodimères RIPK3/RIPK3 (Wu *et al.*, 2014). Cette homodimérisation catalyse l'autophosphorylation de RIPK3 au niveau des résidus thréonine²³¹ et sérine²³² (chez la souris), ce qui conduit à l'adoption

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.4. : Formation du nécrosome et activation de MLKL

(a) L'activation de récepteurs « de mort » comme Fas, TNFR1 ou TRAILR par leurs ligands respectifs peut entraîner, sous certaines conditions, la formation du nécrosome (aussi appelé complexe IIc) et constitué des protéines RIPK1, RIPK3 et MLKL. (b) Par l'intermédiaire de son domaine RHIM, RIPK3 lie RIPK1, ce qui active une série de transphosphorylations, responsables *in fine* de l'oligomérisation et de l'activation de RIPK3. (c) Une fois activée, RIPK3 phosphoryle MLKL au niveau de résidus situés au niveau d'une boucle d'activation. Cette modification post-traductionnelle provoque un changement conformationnel à l'origine de la libération du domaine 4HB (4 Helix Bundle) N-terminal de MLKL. (d) Par l'intermédiaire du domaine 4HB, MLKL s'insère dans les membranes biologiques et induit leur rupture. Le mécanisme d'action de MLKL demeure en grande partie obscur, mais chez la souris, il semble que l'oligomérisation de la protéine, consécutive à son activation par RIPK3, conduise à la formation de pores membranaires selon une stoechiométrie encore mal définie. Adapté de Yuan *et al.*, (2019).

d'une conformation permissive pour le recrutement et l'activation de l'effecteur terminal de la nécroptose : MLKL (McQuade *et al.*, 2013) (Figure I.3.4.).

Avant d'aborder les modalités de fonctionnement de MLKL, il convient de souligner à ce stade le caractère nécessaire et suffisant de l'homodimérisation/oligomérisation de RIPK3 pour le déclenchement de la nécroptose (Orozco *et al.*, 2014). Cette propriété a en effet été exploitée par plusieurs groupes afin de développer des outils « purs » d'induction de la nécroptose. Ces travaux sont à l'origine de la caractérisation précise du rôle de cette voie de mort cellulaire dans la régulation des réponses immunitaires antitumorales, raison pour laquelle ils seront détaillés de façon approfondie en partie 3.2.2.3.

L'identification chez l'homme (Sun *et al.*, 2012), puis chez la souris (Murphy *et al.*, 2013), de la pseudokinase MLKL comme cible principale de RIPK3 a permis d'éclairer de façon substantielle les événements à l'origine de la mort cellulaire survenant à l'issue de la nécroptose. J'ai choisi de ne traiter, dans cette partie, que de la forme murine de MLKL, puisque c'est de cette dernière qu'il s'agira dans la description des résultats obtenus.

MLKL est une pseudokinase constituée de trois domaines agencés de façon bien précise dans l'espace : à l'état basal, le domaine N-terminal composé de 4 hélices α est replié, par l'intermédiaire de la région « brace », sur le domaine pseudokinase C-terminal (Hildebrand *et al.*, 2014) (Figure I.3.4.). La conformation monomérique fermée de MLKL définie ci-dessus, bien qu'inactive, est capable de s'associer avec la forme phosphorylée et active de RIPK3. Cette interaction transitoire, ainsi que la phosphorylation cruciale du résidu sérine³⁴⁵ qui en résulte, conduisent au déplacement de la région brace, à la libération du domaine N-terminal et au passage de MLKL sous forme active (Hildebrand *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2016) (Figure I.3.4.). Chez la souris, ce changement conformationnel, mimé par le mutant S345D, est nécessaire et suffisant à l'oligomérisation de MLKL et à l'induction de la nécroptose (Murphy *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2016; Tanzer *et al.*, 2015) par l'intermédiaire de l'insertion des domaines N-ter de MLKL dans les membranes biologiques, sous forme de trimères (Hildebrand *et al.*, 2014), de tétramères (Chen *et al.*, 2014) ou d'octamères (Huang *et al.*, 2017). Récemment, il a également été proposé que les TAM kinases Tyro3, Axl et Mer catalysent la phosphorylation du résidu tyrosine³⁷⁶ hautement conservé de MLKL et participent à son

oligomérisation (Najafov *et al.*, 2019). Selon ce modèle, la phosphorylation initiale de MLKL par RIPK3 autoriserait l'interaction de Tyro3, Axl et Mer avec le domaine pseudokinase de MLKL et l'ajout ultérieur d'un phosphate sur la tyrosine³⁷⁶. Il est possible que cette phosphorylation, proche de l'essentiel résidu serine³⁴⁵, stabilise la conformation active de MLKL au niveau des membranes et facilite l'association des domaines N-ter entre eux (Najafov *et al.*, 2019).

Si l'intégration de phospho-MLKL a principalement été documentée au niveau de la membrane plasmique, sa liaison à divers phosphoinositides (Dondelinger *et al.*, 2014; Tanzer *et al.*, 2016) lui permet également de s'associer à une grande variété d'organelles. À ce jour, phospho-MLKL a en effet été détectée au niveau des endosomes (Yoon *et al.*, 2017), des lysosomes (Wang *et al.*, 2014; Yoon *et al.*, 2017), des mitochondries (Wang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018) et du réticulum endoplasmique (Wang *et al.*, 2014).

Cette propriété d'oligomérisation et d'insertion de phospho-MLKL dans les membranes biologiques est nécessaire à sa fonction « pro-mort » et est donc considérée comme une caractéristique majeure des cellules nécroptotiques. Cependant, la nature du mécanisme médié par cette protéine et responsable de la rupture membranaire demeure largement inconnu. Chez la souris, MLKL forme des pores d'environ 4,5 nanomètres de diamètre (Ros *et al.*, 2017). De façon analogue à la situation décrite chez l'homme (Chen *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2016), ces pores pourraient générer des flux ioniques (Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ ?), à l'origine d'un déséquilibre osmotique conduisant *in fine*, à la rupture membranaire (Hildebrand *et al.*, 2014).

Si MLKL catalyse l'exécution de la nécroptose à la membrane plasmique, elle remplit également d'autres fonctions lorsqu'elle est recrutée à la surface des compartiments intracellulaires. Ainsi, les pores formés par MLKL dans la membrane mitochondriale externe permettent la translocation de RIPK3 dans l'espace intermembranaire, la phosphorylation du complexe pyruvate déshydrogénase et la production d'espèces réactives de l'oxygène (Yang *et al.*, 2018). La participation de ces dérivés oxygénés à la nécroptose (Zhang *et al.*, 2017), bien qu'avérée dans certains types cellulaires, n'est cependant pas entièrement généralisable. Par ailleurs, lorsqu'elle est assemblée à la membrane des endolysosomes, MLKL perturbe le flux autophagique (Frank *et al.*, 2019).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.5. : Caractéristiques morphologiques de la nécroptose

(a) Manifestations cellulaires de la nécroptose. Adapté de Fink and Cookson, (2005). (b) Observation de cellules RAW264.7 (macrophages) nécroptotiques (induction par TNF, mimétiques de Smac et Z-VAD) au microscope électronique à balayage. Le gonflement cellulaire est frappant. Tiré de Zhang *et al.*, (2018).

INTRODUCTION

Il est également à noter que MLKL peut être activée à la suite de la stimulation d'autres récepteurs, comme les TLRs 3 et 4, dont la signalisation dépend de l'adaptateur TRIF. Dans ce cas, l'interaction homotypique entre le domaine RHIM de TRIF et celui de RIPK3 permet d'outrepasser le recrutement de RIPK1 pour la formation du nécrosome (He *et al.*, 2011).

Quelle que soit la voie employée, les manifestations morphologiques de la nécroptose sont similaires. Comme les cellules nécrotiques, les cellules nécroptotiques présentent un gonflement du cytoplasme et des organelles, suivi par la rupture de la membrane plasmique et la fuite du contenu intracellulaire (Figure I.3.5.). De façon intéressante, au cours de la nécroptose, la perméabilisation des organelles, et notamment du lysosome, précède la perte d'intégrité de la membrane plasmique (Vanden Berghe *et al.*, 2010), ce qui pourrait suggérer un ciblage précoce des compartiments intracellulaires par MLKL. Enfin, peu de temps avant la rupture de la membrane plasmique, les cellules nécroptotiques externalisent la phosphatidylsérine au cours d'un processus dépendant de la phosphorylation de MLKL (Gong *et al.*, 2017a; Zargarian *et al.*, 2017). Durant cette période, la libération de petites vésicules marquées pour la phosphatidylsérine est également observée (Zargarian *et al.*, 2017). Nous reviendrons sur la nature de ces vésicules et leur relevance biologique en Partie 3.2.2.3.

3.1.2.4. Interconnexions entre voies apoptotique et nécroptotique

L'élucidation des voies moléculaires sous-jacentes au déroulement de la nécroptose a été ponctuée, et même souvent déclenchée, par la découverte d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des acteurs de cette voie. Ainsi, l'identification de nécrostatine-1, et de son dérivé stable nécrostatine-1s, a permis de mettre en évidence le rôle clé de la fonction kinase de RIPK1 dans l'apoptose et la nécroptose (Degterev *et al.*, 2008). Le développement ultérieur d'inhibiteurs de l'activité kinase de RIPK3, comme les drogues GSK' 843 et GSK' 872, a de son côté révélé la présence d'interconnexions entre les voies nécroptotique et apoptotique. En effet, l'utilisation de ces inhibiteurs peut provoquer l'activation des caspases, caractéristique de l'induction apoptotique (Mandal *et al.*, 2014). Dans ce contexte, la stabilisation de RIPK3 par GSK' 843 et GSK' 872 lui confère un rôle de protéine d'échafaudage au cours de la formation d'un complexe similaire au complexe IIb, constitué de FADD, RIPK1, caspase-8 et cFLIP_L. Ces résultats concordent parfaitement avec des observations réalisées dans un modèle murin porteur d'une

INTRODUCTION

version catalytiquement inactive de RIPK3 : ces souris présentent une mortalité embryonnaire, autour du jour 11,5, causée par une apoptose massive, dépendante de RIPK1 (Newton *et al.*, 2014).

La compréhension du déroulement de ces voies de mort cellulaire permet d'élucider avec précision leur contribution à de nombreuses fonctions physiologiques. Comme je l'aborderai dans la partie suivante, ces voies contribuent largement à la régulation des réponses immunitaires, notamment en réponse à des traitements chimiothérapeutiques.

3.2. Influence des voies de mort cellulaire sur l'efficacité de l'activation croisée

Les cellules mortes ou mourantes renferment une quantité d'informations considérable, capables de renseigner le système immunitaire sur la cause physiologique ou pathologique de la mort, et donc sur la nécessité ou non d'induire une réponse. Dans cette partie, nous verrons comment, en engageant l'une ou l'autre des voies sus-décrites, les cellules donneuses d'antigènes peuvent influencer (et de quelle façon) différentes étapes de la présentation croisée. Nous essaierons ensuite de rendre compte de la complexité de l'intégration de ces signaux à l'échelle de la mise en place d'une réponse immunitaire cytotoxique, en montrant que l'efficacité de cette dernière tient non seulement à la nature de la voie de mort cellulaire engagée, mais également au contexte biologique dans lequel elle s'opère.

3.2.1. Les cellules mourantes, sources d'information pour les cellules dendritiques

In vivo, l'activation croisée des lymphocytes T CD8⁺ naïfs requiert la libération de grandes quantités d'antigènes, de l'ordre de la dizaine de microgrammes, par les tissus périphériques (Kurts *et al.*, 1998). À l'inverse, lorsque les antigènes sont dérivés de cellules mourantes, quelques nanogrammes suffisent à induire une prolifération maximale des lymphocytes T CD8⁺ naïfs (Li *et al.*, 2001). Ces observations précoces ont fait émerger l'idée selon laquelle les antigènes associés aux cellules mourantes constituaient la source principale de matériel utilisée au cours de la présentation croisée.

3.2.1.1. Une source d'antigènes pour la présentation croisée

S'il existe un consensus sur le fait que les cellules mourantes constituent une source d'antigènes primordiale pour l'induction d'une réponse immune T CD8⁺, qu'elle soit tolérogène ou cytotoxique, la nature des antigènes transmis aux cellules dendritiques est quant à elle l'objet de divergences entre les différents groupes. Cette partie a donc pour objectif d'explicitier les bases théoriques et expérimentales des trois grandes hypothèses relatives à la nature de ces antigènes.

INTRODUCTION

Afin de déterminer quel type d'antigène les cellules mourantes transfèrent aux cellules dendritiques en vue de la présentation croisée, l'équipe de Jonathan Yewdell s'est appuyée sur un système d'infection virale et d'irradiation de cellules donneuses d'antigènes. Toute l'élégance de ce système réside dans l'ingéniosité des constructions exprimées par le virus : si les deux constructions portent bel et bien l'antigène d'intérêt, l'une des versions de l'antigène est marquée par l'ubiquitine et sera donc dégradée rapidement par le protéasome, une fois exprimée dans les cellules donneuses infectées (Norbury *et al.*, 2004). Ainsi, si les peptides issus de la dégradation protéasomique constituent un substrat préférentiel pour la présentation croisée par les cellules dendritiques, les cellules mourantes porteuses de la construction ubiquitinylée devraient générer une réponse cytotoxique plus robuste que celles exprimant l'antigène « nu ». L'observation inverse indiquerait quant à elle que les cellules dendritiques réalisent la présentation croisée principalement à partir de protéines intactes. Les résultats obtenus supportent la deuxième proposition et suggèrent donc que les cellules dendritiques engagent préférentiellement les substrats du protéasome, plutôt que ses produits, dans les voies de présentation croisée (Norbury *et al.*, 2004). Un autre argument en ce sens provient du fait que l'efficacité de la présentation croisée est absolument conditionnée par la localisation cytosolique, membranaire ou sécrétée de l'antigène dans les cellules donneuses (Shen and Rock, 2004). Par ailleurs, la déplétion sélective de l'antigène sous forme intacte dans les cellules donneuses abolit totalement l'exécution de la présentation croisée par les cellules dendritiques (Shen and Rock, 2004). Ce faisceau d'indications expérimentales en faveur de l'importance de la transmission d'antigènes préservés aux cellules dendritiques a trouvé une illustration particulièrement intéressante dans le cas d'infection chronique à HIV-1. Ainsi, chez les patients atteints, la fréquence des lymphocytes T CD8+ auto-réactifs est proportionnelle à l'abondance des lymphocytes T CD4+ rendus apoptotiques à la suite de l'infection par HIV-1. Les auteurs de cette étude ont donc proposé que dans les lymphocytes T CD4+ apoptotiques, l'activation des caspases génère le clivage partiel d'antigènes du soi. L'internalisation par les cellules dendritiques de ces antigènes, en partie préservés, favoriserait leur engagement dans la voie cytosolique et leur présentation aux lymphocytes T CD8+ auto-réactifs (Rawson *et al.*, 2007).

Ces résultats séduisants ont cependant été nuancés par l'émergence d'une seconde hypothèse. Dans celle-ci, les antigènes transmis aux cellules dendritiques par les cellules mourantes ne sont plus des protéines partiellement intactes, mais des peptides. Les travaux de

INTRODUCTION

Matthew Albert ont en effet révélé que l'injection de cellules apoptotiques infectées par influenza conduit *in vivo* à l'induction d'une réponse cytotoxique spécifique, fortement dépendante de l'activité du protéasome dans les cellules donneuses d'antigènes (Blachère *et al.*, 2005). Ces peptides « prêts à l'emploi » fournis par les cellules apoptotiques sont néanmoins peu stables et se trouvent souvent associés à des protéines chaperonnes sous forme de complexes très immunogènes (Callahan *et al.*, 2008; Suto and Srivastava, 1995). En conséquence, la déplétion simultanée de ces chaperonnes (gp96, Hsp70, Hsp90 et calréticuline) abolit la capacité des lysats de cellules nécrotiques à induire une réponse cytotoxique *in vivo* (Binder and Srivastava, 2005).

Enfin, les autophagosomes formés dans les cellules donneuses pourraient également jouer un rôle de vecteur d'antigènes pour la présentation croisée par les cellules dendritiques (Li *et al.*, 2008). Même s'il ne s'agit pas d'une voie de mort cellulaire à proprement parler, l'autophagie précède souvent l'initiation de l'apoptose et son inhibition dans les cellules donneuses d'antigènes compromet l'induction d'une réponse T CD8+ spécifique (Li *et al.*, 2008; Uhl *et al.*, 2009).

Si, comme nous venons de l'exposer, les cellules mourantes constituent une indiscutable source d'antigènes variés pour la présentation croisée, il convient de garder à l'esprit que les cellules vivantes possèdent également cette propriété. Les cellules dendritiques sont en effet capables d'internaliser des antigènes provenant de cellules tumorales vivantes et de les présenter aux lymphocytes T CD8+ afin d'initier des réponses immunitaires protectrices (Matheoud *et al.*, 2010, 2011).

L'acquisition par les cellules dendritiques d'antigènes dérivés de cellules mourantes repose sur l'identification de ces cellules donneuses grâce aux signaux qu'elles émettent. En raison de leur caractérisation extrêmement précise, les signaux produits par les cellules apoptotiques seront principalement abordés ici.

Dans le but de guider la migration des cellules dendritiques, les cellules mourantes libèrent des signaux chimiotactiques appelés signaux « find me » (« trouve-moi »). Ces signaux comprennent notamment des nucléotides, et particulièrement l'ATP et l'UTP, délivrés de façon contrôlée par les canaux PANX1 dans les cellules apoptotiques ou libérés à la suite de la rupture

INTRODUCTION

membranaire dans les cellules nécrotiques et nécroptotiques (Chekeni *et al.*, 2010). Quel que soit le mode de délivrance des nucléotides, leur détection par le récepteur P2RY₂, exprimé à la surface des phagocytes, facilite la clairance des cellules mortes ou mourantes (Elliott *et al.*, 2009). Les molécules « find me » responsables de l'attraction des cellules phagocytaires sont nombreuses et le but n'est évidemment pas ici d'en dresser une liste exhaustive. Il semble cependant intéressant, dans le cadre de cette partie relative à l'influence de la signalisation de mort sur l'induction des réponses immunes, de mentionner que RIPK1 contrôle directement la sécrétion des chimiokines IL-8 et MCP-1 dans les cellules apoptotiques (Cullen *et al.*, 2013).

Arrivées au lieu du dommage cellulaire, les cellules phagocytaires distinguent ensuite les cellules vivantes des cellules mourantes par l'intermédiaire de l'exposition de signaux « eat me » (« mange-moi »), parfaitement décrits chez les cellules apoptotiques. L'induction de l'apoptose est en effet caractérisée par l'externalisation précoce de la calréticuline, suivie par celle plus tardive de la phosphatidylsérine. Ces deux molécules se regroupent au sein de zones membranaires restreintes et séparées spatialement des zones contenant les signaux « don't eat me » (« ne me mange pas ») comme CD47 reconnu par SIRP α (Gardai *et al.*, 2005). La séquestration de la calréticuline et de la phosphatidylsérine sous forme de « patches » facilite leur reconnaissance et leur engagement respectif par les récepteurs LRP-1 (CD91) (Subramanian *et al.*, 2014) et Tim-3 (Nakayama *et al.*, 2009), à la surface des cellules dendritiques. En lien avec les considérations abordées en partie 2.3.2., il est aussi à noter que la formation de cette « synapse apoptotique », et l'efférocytose qui en découle, est probablement facilitée dans les cDC1 par rapport aux cDC2, en raison de leur expression supérieure des récepteurs sus-cités (Nakayama *et al.*, 2009; Subramanian *et al.*, 2014). J'ai mentionné ces deux récepteurs à titre d'exemple en raison de leur expression différentielle entre cDC1 et cDC2, mais il est important de garder à l'esprit qu'il en existe une multitude d'autres qui œuvrent de façon redondante dans la clairance des débris apoptotiques et la présentation croisée des antigènes associés (Miyanishi *et al.*, 2007; Murshid *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2002).

En l'absence d'efférocytose efficace, les cellules apoptotiques entrent en nécrose secondaire et libèrent, à l'instar des cellules nécrotiques, d'autres signaux « find me », parmi lesquels SAP130, une protéine associée au spliceosome et liée par le récepteur Mincle sur les cellules phagocytaires (Yamasaki *et al.*, 2008). Contrairement à l'apoptose précoce, ces deux

modalités de mort sont caractérisées par la perte d'intégrité de la membrane plasmique et la formation de la « synapse apoptotique » décrite ci-dessus est donc impossible. L'internalisation du matériel cellulaire issu des cellules apoptotiques tardives, nécrotiques ou nécroptotiques est donc médiée par macropinocytose plutôt que par l'intermédiaire de récepteurs dédiés (Krysko *et al.*, 2003, 2006). Si la nature lytique ou non des voies de mort cellulaire semble conditionner la façon dont les antigènes sont internalisés et présentés par les cellules dendritiques, elle dicte également la nature des médiateurs inflammatoires libérés.

3.2.1.2. Une source de DAMPs

Comme précédemment démontré, les cellules apoptotiques, nécrotiques et nécroptotiques constituent toutes trois des sources d'antigènes majeures pour la présentation croisée. En revanche, leurs caractéristiques intrinsèques ne leur confèrent pas le même potentiel immunogène, en tout cas, tel qu'initialement considéré. Nous reviendrons sur la réalité de cette supposition dans la partie suivante.

Mort physiologique par excellence, l'apoptose concerne chaque jour des millions de cellules. Si leur élimination rapide par efférocytose limite l'entrée en nécrose secondaire et la libération de médiateurs inflammatoires, les cellules apoptotiques disposent également de mécanismes actifs de répression des DAMPs. Afin de les illustrer, je prendrai l'exemple de HMGB1, un DAMP aux propriétés immunogènes fondamentales, régulé différemment dans les cellules apoptotiques, nécroptotiques et nécrotiques. Dans les cellules apoptotiques, HMGB1 reste majoritairement attachée à la chromatine (Scaffidi *et al.*, 2002) et la fraction infime qui s'en dissocie est neutralisée par les espèces réactives de l'oxygène produites sous l'effet des caspases activées (Kazama *et al.*, 2008). La libération minimale, voire absente, de DAMPs par les cellules apoptotiques s'accompagne également de la sécrétion d'une cytokine anti-inflammatoire, le TGF- β , à partir de stocks intracellulaires préexistants (Chen *et al.*, 2001). Ces deux phénomènes participent à la création d'un micro-environnement suppresseur à l'origine de la capacité limitée des cellules dendritiques à induire l'expression des molécules de costimulation (Basu *et al.*, 2000) et à sécréter des molécules pro-inflammatoires (Scaffidi *et al.*, 2002).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.6. : Types de molécules libérées lors de l'induction des voies de mort cellulaire

(a) Les cellules mourantes libèrent différents types de signaux « trouve-moi » (« find me ») ayant pour but de guider les cellules immunitaires sur le lieu du dommage cellulaire. Il est possible que ces signaux différentiels attirent des types cellulaires différents, et soient donc à l'origine de l'initiation de réponses adaptées au type de mort cellulaire rencontré. (b) L'exposition de signaux « mange-moi » (« eat me ») facilite l'internalisation de matériel dérivé de cellules mourantes ou mortes. L'évolution du processus de mort conditionne l'apparition séquentielle de ces signaux : l'externalisation de la calréticuline correspond par exemple à un signal précoce, pro-inflammatoire, tandis que celle de la phosphatidylsérine, plus tardive, présente des propriétés anti-inflammatoires. (c) La nécroptose (et l'apoptose immunogène, abordée par la suite) provoquent la libération de molécules de danger, appelées DAMPs, et reconnues par une grande variété de récepteurs dédiés. Si la liaison de la plupart de ces molécules conduit à une réponse pro-inflammatoire, la fixation de ces mêmes molécules par d'autres récepteurs génère une réponse opposée. Tiré de Zitvogel *et al.*, (2010).

La situation miroir est observée dans les cellules nécrotiques : considérée comme un signal de danger, la nécrose est responsable de l'émission d'une multitude de DAMPs (voir description du rôle des complexes actine/myosine liés par Clec9a en partie 2.4.3.) dont le but est d'alerter le système immunitaire environnant (Figure I.3.6.). Ainsi, l'induction nécrotique conduit à la dissociation de HMGB1 de la chromatine et à sa diffusion passive (Scaffidi *et al.*, 2002). Possiblement grâce à sa liaison à diverses cytokines ou ligands TLRs, HMGB1 stimule la production de TNF α par les cellules dendritiques (Scaffidi *et al.*, 2002) et joue un rôle adjuvant dans l'initiation des réponses immunes *in vivo* (Rovere-Querini *et al.*, 2004). De façon analogue, toujours en conditions nécrotiques, la libération de la protéine chaperonne Hsp90 (Basu *et al.*, 2000; Doody *et al.*, 2004) ou des cristaux d'acide urique (Shi *et al.*, 2003) entraîne également la maturation des cellules dendritiques avoisinantes, la production de cytokines pro-inflammatoires et facilite en conséquence la présentation croisée et l'induction sélective de réponses T CD8+ cytotoxiques.

S'il est aujourd'hui simpliste de penser que la production de DAMPs est forcément synonyme d'inflammation, les profils différentiels d'émission de ces molécules au cours de l'apoptose et de la nécrose ont longtemps conditionné la perception respectivement anti- et pro-inflammatoire de ces deux modalités de mort cellulaire.

3.2.2. Régulation de l'activation croisée par les voies de mort cellulaire

3.2.2.1. Une dichotomie initiale apoptose/nécrose

Les antigènes dérivés de cellules apoptotiques, générées notamment par irradiation, sont efficacement internalisés (Subramanian *et al.*, 2014). Cependant en raison de la nature non-lytique et donc « silencieuse » de cette voie de mort et du contexte *a priori* stérile dans lequel elle s'opère, il a longtemps été considéré que la présentation de ces antigènes aux lymphocytes T CD8+ conduisait au développement exclusif de réponses immunitaires tolérogènes. Cette hypothèse a initialement largement été soutenue par une série d'études réalisées dans un modèle murin d'hypersensibilité de type IV dite « retardée » : deux jours après l'injection intraveineuse ou oculaire de splénocytes apoptotiques couplés à un antigène, le TNP, les souris sont

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.7. : Mécanismes d'induction de la tolérance par les cellules apoptotiques en conditions « stériles »

En conditions stériles, l'induction apoptotique conduit à la libération de DAMPs, comme HMGB1, mais dont l'activité est neutralisée par oxydation. Cet environnement tolérogène conduit à la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs, responsables de l'inhibition des leurs homologues activés. Ainsi, en l'absence de lymphocytes T CD4⁺ capables de supporter leur activation, les lymphocytes T CD8⁺ acquièrent un phénotype particulier caractérisé par la production du ligand TRAIL. Ce dernier induit, après fixation à son récepteur, l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. En l'absence de réponses pro-inflammatoires, une réponse tolérogène est donc observée. Tiré de Green *et al.*, (2009).

immunisées par voie sous-cutanée avec ce même antigène. Quatre jours après immunisation, l'injection de l'antigène dans un coussinet et d'une solution contrôle dans l'autre coussinet permet la comparaison, après vingt-quatre heures, du gonflement des pattes, reflet de l'initiation d'une réponse immunogène. À l'inverse, l'absence de gonflement démontre l'induction d'une réponse immune tolérogène. Dans ce modèle, l'injection de cellules nécrotiques provoque le gonflement du coussinet, témoin du déclenchement d'une réaction allergique, tandis que l'injection de cellules apoptotiques abolit toute induction immunogène (Griffith *et al.*, 1996, 2007). De façon fascinante, la capacité intrinsèque des cellules apoptotiques à générer une réponse tolérogène repose sur la différenciation de lymphocytes T CD8⁺ suppresseurs (Figure I.3.7.). En l'absence d'activation parallèle d'une réponse T CD4⁺, la présentation croisée du TNP par les cDC1 aux lymphocytes T CD8⁺ entraîne la production par ces derniers du ligand TRAIL (Ferguson *et al.*, 2002; Griffith *et al.*, 2007). Ce ligand conduit à la mort par apoptose des lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺ qui l'engagent, par l'intermédiaire des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2, et explique *in fine* le développement de la réponse tolérogène observée (Griffith *et al.*, 2007) (Figure I.3.7.). Si l'injection de cellules apoptotiques supprime le signal de « licence » CD4⁺ (Curtsinger *et al.*, 2003 et voir partie 1.3.3.), notamment grâce à la création d'un microenvironnement suppresseur, les cellules nécrotiques autorisent la mise en place de ce signal, possiblement par l'intermédiaire de la sécrétion de DAMPs (Griffith *et al.*, 2007; Kazama *et al.*, 2008). Dans ce contexte inflammatoire, la présentation d'antigènes dérivés de cellules nécrotiques initie une réponse T CD4⁺, à l'origine de la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en cellules effectrices cytotoxiques (Griffith *et al.*, 2007). À cet égard, il est important de noter que l'injection conjointe de splénocytes apoptotiques et d'un anticorps agoniste de CD40 suffit à abroger la réponse tolérogène et à reproduire le phénotype observé en présence des cellules nécrotiques (Ferguson *et al.*, 2002). Ainsi, il est envisageable qu'un contexte permissif à l'induction d'une réponse CD4⁺ confère aux cellules apoptotiques une capacité immunogène. Nous verrons dans la partie suivante que c'est effectivement ce qui se produit en situation infectieuse ou tumorale.

3.2.2.2. Remise en question de la dichotomie apoptose/nécroptose avec la découverte de l'apoptose immunogène

La mise en évidence de la capacité des cellules apoptotiques à générer une réponse T CD8+ immunogène a débuté avec les travaux de Matthew Albert basés sur l'utilisation de monocytes rendus apoptotiques grâce à l'infection par influenza (Albert *et al.*, 1998). Dans ce modèle, l'internalisation et la présentation, *via* le CMH-I, de matériel dérivé des monocytes apoptotiques par les cellules dendritiques humaines provoquent l'émergence de lymphocytes T CD8+ autologues cytotoxiques (Albert *et al.*, 1998). Ces observations furent ensuite étendues à un contexte tumoral par le biais d'expériences d'immunisation : deux semaines après injection sous-cutanée de cellules tumorales apoptotiques ou nécrotiques dans un flanc, les souris reçoivent une dose létale des mêmes cellules tumorales, cette fois-ci vivantes, dans le flanc opposé. Contrairement à la situation observée en présence de leurs homologues nécrotiques, l'immunisation par des cellules apoptotiques induit une réponse T CD8+ cytotoxique forte, responsable d'une protection totale des souris vis-à-vis du développement de tumeurs (Scheffer *et al.*, 2003). Par ailleurs, la réponse protectrice T CD8+ initiée à la suite de l'injection de cellules apoptotiques dépend strictement de l'aide apportée par lymphocytes T CD4+, ce qui souligne à nouveau l'importance critique de ce signal dans la mise en place d'une réponse immunogène (Ronchetti *et al.*, 1999).

L'identification précise des caractéristiques de cette apoptose dite « immunogène » trouve son origine dans les travaux fondateurs de Laurence Zitvogel et Guido Kroemer. Si elle peut être induite artificiellement par irradiation γ (Scheffer *et al.*, 2003) ou UV (Ronchetti *et al.*, 1999), l'apoptose immunogène est également initiée à la suite de certains traitements chimiothérapeutiques dont la famille des anthracyclines constitue le fer-de-lance. Ainsi, l'injection de cellules tumorales traitées préalablement avec une anthracycline, la doxorubicine, confère une protection importante vis-à-vis de l'injection simultanée (dispositif « thérapeutique ») ou ultérieure (dispositif « vaccinal ») de tumeurs dans le flanc opposé (Casares *et al.*, 2005). L'induction de cette mort immunogène, fortement dépendante de l'activation des caspases, nécessite la contribution de nombreux déterminants moléculaires qui constituent un « code immunogène » décrypté notamment par les cellules dendritiques (Zitvogel *et al.*, 2010). Ce code est principalement dicté par la libération, au cours de la mort immunogénique, de

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.8. : Un code immunogène à l'origine des propriétés immunostimulatrices de certains types de mort cellulaire (apoptose, nécroptose)

(a) Les caractéristiques intrinsèques des voies de mort induites déterminent la nature des signaux libérés. Ces signaux, et les effets qu'ils exercent notamment sur les cellules immunitaires environnantes, conditionnent le caractère immunogène de la réponse mise en place. (b) Le code immunogène proposé par Laurence Zitvogel et Guido Kroemer est constitué de multiples molécules, agissant chacune sur une étape de la réponse immunitaire. Ainsi, l'externalisation précoce de la calréticuline facilite l'internalisation des débris dérivés de cellules mortes ou mourantes par les cellules dendritiques. Par la suite, la libération de DAMPs, comme HMGB1 lié par TLR4, ralentit la fusion phagosolysosomale et entraîne la présentation efficace d'antigènes extracellulaires, issus de cellules mortes/mourantes, aux lymphocytes T CD8⁺ (présentation croisée). La fuite d'ATP contribue également à la création d'un microenvironnement pro-inflammatoire en activant l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 β . Tiré de Zitvogel *et al.*, (2010).

INTRODUCTION

DAMPs et notamment de HMGB1 sous forme active (Figure I.3.8.). Par l'intermédiaire de sa liaison spécifique à TLR4, HMGB1 inhibe la fusion endo/phagolysosomale dans les cellules dendritiques et favorise de ce fait la présentation croisée d'antigènes dérivés de cellules apoptotiques. En conséquence, la libération de cette alarmine, déclenchée par les anthracyclines, conditionne l'immunogénicité de la mort cellulaire et l'initiation résultante d'une réponse T CD8⁺ protectrice (Apetoh *et al.*, 2007). À cet égard, il est intéressant de noter que dans les travaux de Scaffidi *et al.*, (2002) mentionnés plus tôt, le maintien de HMGB1 à la chromatine est observé après induction d'une apoptose strictement indépendante de RIPK1 (voir partie 3.1.2.2.). Ainsi, et même si cela n'a pas encore été formellement démontré à ce jour, il est possible que RIPK1 participe à la dissociation chromatinienne et à l'émission de HMGB1 au cours de l'apoptose immunogène.

Une autre composante du « code » réside dans l'exposition membranaire de la calréticuline (Figure I.3.8.). Cette dernière, dépendante de l'activation de la caspase-8 (Panaretakis *et al.*, 2009), marque spécifiquement les cellules qui succombent à la mort immunogène et permet donc leur distinction et leur internalisation par les cellules dendritiques (Obeid *et al.*, 2007). Par ailleurs, comme précédemment abordé, l'externalisation de la calréticuline précède celle de la phosphatidylsérine. Pendant cet intervalle de temps, la seule présence de la calréticuline à la membrane des cellules apoptotiques pourrait favoriser leur ciblage vers les cellules dendritiques plutôt que vers les macrophages, et ainsi promouvoir la mise en place d'une réponse immunogène plutôt que tolérogène.

Enfin, l'émission de nucléotides, contrôlée par les voies autophagiques (Michaud *et al.*, 2011), complète le code immunogène (Figure I.3.8.). En effet, l'ATP libéré par les cellules tumorales traitées aux anthracyclines se lie au récepteur P2RY₇, présent à la surface des cellules dendritiques. Cette interaction entraîne l'activation de l'inflammasome et la libération d'IL-1 β , requise pour l'initiation d'une réponse T CD8⁺ antitumorale (Ghiringhelli *et al.*, 2009).

Tous ces déterminants moléculaires contribuent de façon indiscutable à l'immunogénicité de l'apoptose à la suite d'un traitement chimiothérapeutique. Comment expliquer alors que la nécrose, également responsable de la sécrétion et de l'externalisation de ces facteurs, échoue à initier des réponses antitumorales protectrices (Casares *et al.*, 2005;

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.3.9. : Constructions utilisées dans l'étude à l'origine de la découverte de la nécroptose comme mort immunogène

Les cellules NIH/3T3 sont transduites avec les constructions suivantes afin de provoquer, après l'ajout d'un composé chimique, l'apoptose (dimérisation de la construction Δ N-Fv-Caspase-8) ou la nécroptose (oligomérisation des constructions RIPK3-2xFv et RIPK3- Δ C-2xFv). La construction RIPK3- Δ C-2xFv permet d'explorer les conséquences de la nécroptose, exclusivement liées à l'activation de MLKL par RIPK3. Tiré de Yatim *et al.*, (2015).

Ronchetti *et al.*, 1999; Scheffer *et al.*, 2003) ? Si cette question n'a pas encore trouvé d'explication définitive, un élément de réponse a peut-être été apporté par l'étude des protéases exprimées par les cellules nécrotiques. Ainsi, en dépit de la création d'un microenvironnement pro-inflammatoire permissif, la capacité des cellules nécrotiques à servir de substrat antigénique aux cellules dendritiques est limitée par l'activité protéolytique des peptidases TOP-1 et DPP-3 (Gamrekelashvili *et al.*, 2013). À l'inverse, l'inactivation de ces protéines conduit à la préservation des oligopeptides contenus dans les cellules nécrotiques et restaure le potentiel immunogène de ces cellules.

La complexité de la régulation de la présentation croisée et des réponses T CD8+ qui en découlent est non seulement liée à l'infinie richesse du contexte immunologique, mais également à l'enchevêtrement des voies de mort à l'origine de cette régulation. De fait, l'immense majorité des études présentées ici emploie des drogues chimiothérapeutiques ou utilise l'irradiation pour provoquer la mort cellulaire immunogène et générer des réponses antitumorales protectrices. Comment alors démêler clairement les contributions de la nécrose secondaire, ou encore de la pyroptose (Wang *et al.*, 2017b), dans ce processus ? Un moyen d'y parvenir consiste en la conception d'outils de mort cellulaire « pure », développés récemment par l'équipe de Matthew Albert. Les apports de ces systèmes seront explicités dans la partie suivante.

3.2.2.3. La nécroptose définit un nouveau type de mort cellulaire immunogène

Afin d'élucider le rôle de la nécroptose dans l'activation croisée et l'induction des réponses antitumorales, mais aussi en vue de comparer ce mode de mort cellulaire à l'apoptose, le groupe de Matthew Albert a mis au point différents outils d'induction de mort cellulaire « pure » (Yatim *et al.*, 2015). Toute l'ingéniosité de ce système réside dans l'insertion de domaines FKBP en amont ou en aval des séquences codant pour caspase-8 ou RIPK3 (Figure I.3.9.). Ces domaines ont pour particularité de provoquer l'oligomérisation des protéines auxquelles ils sont fusionnés après l'ajout d'un composé chimique. Ainsi, dans les cellules exprimant la construction caspase-8-FKBP, l'ajout de l'agent chimique provoque la dimérisation de caspase-8 et l'induction de l'apoptose. De façon similaire, l'oligomérisation des protéines chimères RIPK3, porteuses de deux domaines FKBP, conduit à l'initiation de la nécroptose. Une troisième

INTRODUCTION

construction est également générée : très proche de la construction RIPK3 précédente, elle est cependant dépourvue de domaines RHIM et ne peut donc pas interagir avec RIPK1. Cette seconde construction permet donc d'étudier les fonctions de RIPK3 strictement liées à son rôle de régulateur de MLKL, tandis que la première couvre également les activités dépendantes de l'association de RIPK3 avec RIPK1. Quelle que soit la construction RIPK3 exprimée, l'induction de la nécroptose dans les cellules porteuses entraîne la libération de DAMPs (ATP, HMGB1) et la maturation des cellules dendritiques présentes en co-culture. En revanche, *in vivo*, seule l'injection de cellules nécroptotiques porteuses de la construction RIPK3 avec domaines RHIM intacts supporte le développement d'une réponse T CD8+ spécifique et protectrice dans un contexte tumoral. Ainsi, la production de DAMPs semble insuffisante pour induire une activation croisée efficace. Pour ce faire, le recrutement par RIPK3 de RIPK1 et l'activation de NF- κ B qui s'ensuit est indispensable (Yatim *et al.*, 2015). Ces résultats fondamentaux définissent la nécroptose comme nouveau type de mort immunogène et assoient définitivement les voies de mort cellulaires comme régulateurs clés de l'activation croisée et des réponses antitumorales. Si les études réalisées ultérieurement ne s'accordent pas sur l'importance donnée à NF- κ B dans ce processus (Aaes *et al.*, 2016; Van Hoecke *et al.*, 2018), toutes convergent vers l'idée que les cellules nécroptotiques créent un microenvironnement immunogène, favorable au recrutement des cDC1 et à l'induction des réponses T CD8+ protectrices (Aaes *et al.*, 2016; Snyder *et al.*, 2019; Van Hoecke *et al.*, 2018).

Enfin, l'induction de la nécroptose et de ses conséquences immunologiques se double d'un niveau terminal de régulation, en aval de la formation du nécrosome et de la translocation membranaire de MLKL. En effet, la machinerie ESCRT-III excise les portions endommagées de membrane plasmique sous forme de bourgeons, libérés dans l'espace extracellulaire (Gong *et al.*, 2017b). Ces nombreuses vésicules constituent autant de sources possibles d'antigènes pour les cellules dendritiques, et donc, de substrats pour la réalisation de la présentation et de l'activation croisée. Par ailleurs, l'intervalle temporel entre le déclenchement de la nécroptose et la réparation par ESCRT-III des dommages induits autorise l'émission, par les cellules nécroptotiques, de DAMPs et de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , CXCL10, IL-6) et favorise ainsi l'activation croisée (Gong *et al.*, 2017b). À l'inverse, l'absence d'une machinerie de réparation fonctionnelle accélère l'exécution de la nécroptose et limite la possibilité de libération de médiateurs pro-inflammatoires et l'efficacité de l'activation croisée (Gong *et al.*,

INTRODUCTION

2017b). Cette machinerie, dont l'étude dans les cellules dendritiques a représenté le cœur de ce travail de thèse, montre un fonctionnement tout à fait original, développé dans la section suivante.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.1. : Stratégies de réparation des dommages membranaires

La taille des dommages membranaires dicte la nature du mécanisme induit pour y répondre. Ainsi, tandis que les petites lésions sont compensées par l'excision de vésicules dans l'espace extracellulaire ou par leur internalisation au cours de processus endocytiques, les dommages de taille importante sont réparés par l'intermédiaire de la fusion de compartiments intracellulaires avec la membrane plasmique. Tiré de Jimenez and Perez, (2015).

4. ESCRT-III, MACHINERIE DE DEFORMATION ET DE REPARATION MEMBRANAIRE

La régulation de l'intégrité membranaire participe de façon absolument critique au maintien de l'homéostasie, à l'échelle cellulaire mais également tissulaire. Evolutivement parlant, il s'agit probablement de l'une des premières fonctions individualisées par les organismes eucaryotes, qui, contrairement aux bactéries, ne sont pas protégés par une paroi robuste et imperméable. Cette vulnérabilité relative des organismes eucaryotes, et le besoin vital et impérieux de résister aux dommages chimiques et mécaniques auxquelles elle expose, ont conditionné l'émergence d'une grande diversité de stratégies de réparation membranaire, hautement conservées.

La nature des mécanismes de réparation engagés est dictée par le type de lésion induite (Figure I.4.1.). Ainsi, les dommages de taille importante, supérieure à un micromètre, sont compensés par l'exocytose de vésicules intracellulaires, notamment lysosomales, qui agissent comme une rustine membranaire (Jaiswal *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2001; Terasaki *et al.*, 1997). Le rapprochement des vésicules de la membrane plasmique est également favorisé par le remodelage local du cytosquelette d'actine (McNeil and Baker, 2001; Miyake *et al.*, 2001) (Figure I.4.1.).

La réparation des petits dommages, de taille inférieure à cent nanomètres et provoqués entre autres par l'insertion de pores formés par des toxines bactériennes, fait intervenir deux types de mécanismes. Le premier requiert l'endocytose, au niveau de cavéoles, des portions membranaires endommagées par la présence des pores (Figure I.4.1.). Les pores ainsi internalisés sont ensuite dirigés vers les endosomes multivésiculés (EMVs) où ils sont dégradés à la suite de la fusion lysosomale de ces compartiments (Corrotte *et al.*, 2012; Idone *et al.*, 2008). Si ESCRT-III contrôle la formation des vésicules intraluminales au sein des EMVs, cette machinerie est également directement impliquée dans l'exécution de la seconde modalité de réparation des dommages de petite taille (Figure I.4.1.). L'originalité d'ESCRT-III, par rapport aux autres mécanismes de réparation membranaire, tient à deux aspects majeurs. Premièrement, ESCRT-III répare non seulement les lésions de la membrane plasmique mais opère également au niveau des membranes nucléaire et endosomale, contrairement aux options précédemment

citées. De plus, ce complexe concrétise sa fonction réparatrice par l'intermédiaire de l'excision des portions de membrane endommagées sous forme de vésicules libérées non pas à l'intérieur du cytoplasme, mais dans la direction opposée (« away from the cytosol »). Cette propriété unique, qualifiée de « bourgeonnement inversé » (« reverse budding »), est médiée par la formation de filaments constricteurs, à l'origine de l'intégralité des fonctions biologiques portées par ESCRT-III.

Dans cette partie, je m'attacherai aux caractéristiques de ces filaments, à la régulation de leur formation, de leur association aux membranes, ainsi qu'aux bases physiques de leur fonction, avant de montrer comment le « reverse budding » contrôle une grande variété de fonctions cellulaires, de la réparation membranaire au contrôle de la signalisation par certains récepteurs.

4.1. Recrutement d'ESCRT-III au niveau des membranes biologiques, lieux de son action

L'identification des sous-unités constitutives de la machinerie ESCRT débute en 1992 avec la caractérisation de mutants « de classe E » chez la levure (Raymond *et al.*, 1992). Cette catégorie de mutants est définie au niveau morphologique par la présence ectopique d'un compartiment aberrant, dépourvu de vésicules intraluminales et renfermant des protéines destinées à la dégradation vacuolaire (*nota bene* : la vacuole est l'équivalent du lysosome chez la levure) en provenance de l'appareil de Golgi ou de la membrane plasmique. Chez ces mutants, regroupés sous l'appellation de mutants *vps* (pour « vacuolar protein sorting »), l'absence d'adressage correct des protéines transmembranaires à la vacuole provoque leur persistance au niveau de la membrane limitante du compartiment pré-vacuolaire de classe E.

Ce n'est qu'au début des années 2000 que l'équipe de Scott Emr, à travers quatre publications fondatrices, répartit ces gènes de classe E au sein de quatre complexes appelés ESCRT-0, I, II et III (Babst *et al.*, 2002a, 2002b; Katzmann *et al.*, 2001, 2003) et assemblés séquentiellement sur la face cytosolique des endomembranes. À ces 4 complexes « cœur » d'ESCRT, s'ajoute un complexe de dissociation composé d'une ATPase, Vps4, et de protéines accessoires.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Tableau I.4.1. : Complexes ESCRT et protéines associées chez la levure et les mammifères

Tiré de Hurley and Hanson, (2010).

De nombreux travaux conduits à la suite de la découverte des complexes ESCRT ont été réalisés chez la levure. De ce fait, cette partie comportera aussi des données obtenues dans ce modèle, particulièrement en ce qui concerne les aspects mécanistiques de l'assemblage et de la dissociation d'ESCRT. Cependant, en raison de l'importante conservation évolutive des sous-unités d'ESCRT, les propriétés définies chez la levure sont très souvent étendues aux mammifères (Tableau I.4.1.). Je préciserai néanmoins les points de divergence, lorsqu'ils existent. Dans un premier temps, et afin de définir les acteurs moléculaires clés de la machinerie ESCRT et les relations qu'ils entretiennent les uns avec les autres, je m'appuierai sur le modèle canonique de recrutement et d'assemblage d'ESCRT-III décrit pour la formation des EMVs. Les nomenclatures des isoformes levure et mammifères seront indiquées et séparées par une barre oblique. Lorsque deux membres d'un même complexe sont associés, j'emploierai un tiret, pour éviter la confusion avec les équivalences levure/homme.

4.1.1. Modèle canonique de recrutement d'ESCRT-III : le modèle EMV

4.1.1.1. Structure et fonction d'ESCRT-0 : reconnaissance et recrutement des cargos ubiquitinés

La formation des EMVs résulte d'une succession d'étapes, réalisées de façon séquentielle et médiée chacune par un complexe ESCRT spécifique dans ce qui s'apparente à une véritable division du travail. ESCRT-0 initie ce processus en assurant la reconnaissance des cargos transmembranaires ubiquitinés, destinés à être dégradés (Wollert and Hurley, 2010). Chez la levure et les mammifères, ce complexe est constitué de deux membres, Vps27/Hrs et Hse/STAM 1/2, assemblés constitutivement sous forme d'un hétérodimère cytosolique (Katzmann *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2009). Par l'intermédiaire de différents domaines, Vps27 lie l'ubiquitine et les phosphatidylinositol -3-phosphates (PI(3)P) enrichis à la membrane des endosomes précoces EEA1+. Cette capacité d'interaction double avec les cargos ubiquitinés et les endomembranes confère à ESCRT-0 une propriété intrinsèque de séquestration de ces protéines dans une zone spatialement restreinte, en vue de leur internalisation dans les vésicules intraluminales. De plus, l'association membranaire d'ESCRT-0 entraîne un changement conformationnel, responsable de l'exposition du domaine PSxP de Vps27/Hrs. Ce dernier

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.2. : Structure et assemblage des complexes ESCRT-I et II

(a) Structure schématique des complexes ESCRT-I (Vps23, Vps37, Vps28 et Mvb12) et ESCRT-II (Vps22, Vps25 et Vps36) au niveau du cou d'une vésicule. Tiré de Hurley and Hanson (2010). (b) Structure cristallographique du complexe ESCRT-II associé à Vps20/Chmp6 chez l'homme (à gauche) et chez la levure (à droite). La structure en Y caractéristique d'ESCRT-II est particulièrement visible chez les deux organismes. Tiré de Im *et al.* (2009). (c) Illustration des propriétés de courbure membranaire portées par le sous-ensemble ESCRT-II-Vps20 (chez l'homme). Tiré de Im *et al.*, (2009).

interagit ensuite avec Vps23/TSG101 (ESCRT-I) et permet le recrutement membranaire d'ESCRT-I (Katzmann *et al.*, 2003; Ren and Hurley, 2011).

4.1.1.2. ESCRT-I et ESCRT-II : complexes d'initiation du bourgeonnement vésiculaire

Chez l'homme et la levure, le complexe ESCRT-I consiste en un hétérotétramère de 350 kDa, préformé dans le cytosol et constitué de 4 sous-unités : Vps23, Vps28, Vps37 et Mvb12 (Chu *et al.*, 2006; Katzmann *et al.*, 2001; Kostelansky *et al.*, 2007; Stuchell *et al.*, 2004). Ces entités s'assemblent sous la forme d'une tige, associée aux membranes par l'intermédiaire de la liaison faible de Vps37 aux PI(3)P, et prolongée par une tête globulaire, au sein de laquelle la sous-unité Vps28 assure le recrutement du complexe ESCRT-II (Gill *et al.*, 2007; Im and Hurley, 2008; Kostelansky *et al.*, 2007) (Figure I.4.2.). Ce dernier, également assemblé dans le cytoplasme (Babst *et al.*, 2002a), adopte quant à lui une conformation caractéristique en Y, aux implications fonctionnelles majeures (Hierro *et al.*, 2004; Im *et al.*, 2009). Au sein de cette structure, le bras constitué des sous-unités Vps22/EAP30 et Vps36/EAP45 garantit l'ancrage membranaire du complexe et l'association aux cargos ubiquitinés (Hirano *et al.*, 2006; Im and Hurley, 2008; Slagsvold *et al.*, 2005; Teo *et al.*, 2006), tandis que les deux autres branches du Y, chacune constituée d'une copie de Vps25/EAP20, supportent l'assemblage d'ESCRT-III (Im *et al.*, 2009), comme explicité dans la partie suivante (Figure I.4.2.).

À la surface des endosomes, ESCRT-I et II forment transitoirement un super-complexe dont les fonctions sont principalement dictées par les propriétés structurales de l'édifice moléculaire (Boura *et al.*, 2012). Ainsi, la conformation en croissant du super-complexe lui confère une capacité intrinsèque de courbure membranaire (Boura *et al.*, 2012; Im *et al.*, 2009), à l'origine de l'initiation et/ou de la stabilisation du bourgeonnement des vésicules (Wollert and Hurley, 2010). De plus, par l'intermédiaire du double embranchement Vps25/EAP20, ESCRT-II catalyse le recrutement simultané de deux copies de Vps20/Chmp6, molécule support de la polymérisation des sous-unités d'ESCRT-III (Teis *et al.*, 2010; Teo *et al.*, 2004). Enfin, il est à noter que l'assemblage de ce sous-complexe Vps25-Vps20 impose une courbure membranaire

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.3. : Voies alternatives de recrutement d'ESCRT-III chez les mammifères

Selon la fonction réalisée, les protéines responsables du recrutement et de la nucléation d'ESCRT-III varient et sont représentées ici. La fonction de Chmp7 comme facteur responsable de la nucléation de Chmp4b dans la reformation de l'enveloppe nucléaire a depuis été confirmée. PM : plasma membrane ; NPC : nuclear pore complex ; NE : nuclear envelope. Tiré de Campsteijn *et al.*, (2016).

négative (Im *et al.*, 2009), essentielle à la nucléation accélérée des filaments d'ESCRT-III (Lee *et al.*, 2015) (Figure I.4.2.).

4.1.2. Voie alternative de recrutement d'ESCRT-III chez les mammifères : rôle d'Alix

Si ESCRT-II s'avère absolument nécessaire à la formation des EMVs dans tous les organismes eucaryotes, son rôle accessoire et redondant dans la réalisation de certaines fonctions spécifiques aux mammifères, comme le bourgeonnement viral (Langelier *et al.*, 2006; Martin-Serrano *et al.*, 2003), la cytokinèse (Morita *et al.*, 2007) ou la réparation membranaire (Jimenez *et al.*, 2014; Skowryra *et al.*, 2018) suggère l'existence de voies alternatives de recrutement d'ESCRT-III. Dans ce cadre de toutes les fonctions sus-citées, l'adaptateur Alix, notamment recruté par la protéine virale Gag ou par le régulateur centrosomal Cep55, outrepassé ESCRT-I et/ou ESCRT-II en liant directement Chmp4, principal constituant des filaments d'ESCRT-III (Katoh *et al.*, 2003; McCullough *et al.*, 2008) (Figure I.4.3.). De façon intéressante, Alix est capable de se dimériser par l'intermédiaire de son domaine central et entraînerait donc, à la manière d'EAP20 (ESCRT-II), la nucléation parallèle de deux filaments simples d'ESCRT-III (Pires *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009) par des mécanismes encore mal définis.

Quels que soient les processus étudiés et la dépendance relative des différents événements biologiques vis-à-vis d'ESCRT-II, toutes les voies convergent vers le recrutement d'ESCRT-III, véritable catalyseur de la déformation membranaire.

4.2. ESCRT-III, catalyseur de la déformation membranaire

Les fonctions biologiques portées par la machinerie ESCRT reposent entièrement sur la capacité de déformation membranaire d'ESCRT-III. Contrairement aux complexes ESCRT-0, I et II, tous préformés dans le cytoplasme, ESCRT-III représente un édifice multiprotéique extrêmement dynamique, dont l'assemblage progressif repose sur la polymérisation, directement au niveau des membranes biologiques, de sous-unités cytosoliques. Dans cette partie, je m'attacherai à définir les bases moléculaires à l'origine de la capacité de polymérisation

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.4. : Structure des sous-unités d'ESCRT-III

Structure primaire des sous-unités constitutives du complexe ESCRT-III chez l'homme. Au sein de ces structures, l'hélice $\alpha 5$ joue le rôle d'hélice auto-inhibitrice (voir Figure I.4.5.), et l'hélice $\alpha 6$ comprend souvent les domaines MIM1, responsables des interactions avec des protéines porteuses d'un domaine MIT comme Vps4 ou la spastine (bien que les domaines MIM2 puissent aussi lier les domaines MIT, avec une affinité moindre cependant). Tiré de Schöneberg *et al.*, (2017).

d'ESCRT-III avant de me concentrer sur les modalités de déformation membranaire induites par cette polymérisation.

4.2.1. Structure des sous-unités d'ESCRT-III

En dépit de leur faible homologie de séquence, les sous-unités d'ESCRT-III (8 chez la levure, 12 chez l'homme – voir Tableau I. 4. 1.) présentent une grande conservation de leurs propriétés biochimiques et structurales. Longues d'environ 200 acides aminés, ces protéines sont toutes constituées de six hélices α et montrent, à l'exception de Chmp7 (Horii *et al.*, 2006), une ségrégation acido-basique des résidus qui les composent (Figure I.4.4.). Ainsi, les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ situées à l'extrémité N-terminale sont enrichies en acides aminés basiques chargés positivement, tandis que les résidus acides prédominent dans les hélices $\alpha 3$ à $\alpha 6$ (Babst *et al.*, 2002b; Nickerson *et al.*, 2006; Shim *et al.*, 2007; Yorikawa *et al.*, 2005). La région C-terminale, chargée négativement, comporte également certains domaines remarquables, appelés domaines « MIM » (MIM1 et/ou MIM2 selon les sous-unités considérées), et nécessaires à l'interaction des sous unités d'ESCRT-III avec certains partenaires moléculaires cruciaux porteurs d'un domaine MIT, comme Vps4, sur laquelle je reviendrai par la suite (Kieffer *et al.*, 2008) (Figure I.4.4.). Ces caractéristiques biochimiques notables, partagées par tous les membres d'ESCRT-III, dictent l'adoption par ces protéines d'une structure tridimensionnelle commune, élucidée grâce aux données cristallographiques d'abord obtenues chez l'homme. Ainsi, au sein de la structure initialement décrite pour Chmp3 et ensuite généralisée aux autres composants d'ESCRT-III, les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment une longue épingle à cheveux à laquelle viennent s'associer les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$, plus courtes (Muziol *et al.*, 2006; Shim *et al.*, 2007). Cette structure « cœur » est complétée par le repliement perpendiculaire de l'hélice $\alpha 5$ sur $\alpha 2$, facilité par des interactions de type électrostatiques établies entre résidus acides et basiques (Bajorek *et al.*, 2009) (Figure I.4.5., structure du haut).

Cette conformation métastable particulière, dite « fermée » et par ailleurs inactive, est caractéristique des monomères d'ESCRT-III. Si la plupart de ces monomères présentent une localisation cytosolique exclusive, Chmp4 et Chmp6 montrent respectivement une association partielle aux membranes endosomale et plasmique (Shim *et al.*, 2007), favorisée dans le cas de Chmp6 par le groupement myristoyl situé à l'extrémité N-terminale (Yorikawa *et al.*, 2005). Le

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.5. : Structure « fermée » (auto-inhibée) et « ouverte » (active) de Chmp4b

Représentation schématique des formes ouvertes et fermées de Chmp4b qui illustre les très larges réarrangements opérés au sein de la structure de la protéine. L'adoption d'une conformation ouverte permet non seulement l'association aux membranes biologiques mais également l'oligomérisation de la protéine. Tiré de Christ *et al.*, (2017).

passage sous conformation ouverte, initié par le repositionnement de l'hélice $\alpha 5$, révèle des implications fonctionnelles majeures, développées ci-après.

4.2.2. Le principe d'auto-inhibition

La mise en évidence d'interactions intramoléculaires au sein de la conformation fermée des monomères d'ESCRT-III s'est accompagnée de la découverte de leur rôle auto-inhibiteur. Ainsi, l'élimination des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ de Chmp4 (Lin *et al.*, 2005; Shim *et al.*, 2007), Chmp3 (Shim *et al.*, 2007; Zamborlini *et al.*, 2006) et Chmp2a (Shim *et al.*, 2007) génère des mutants constitutivement actifs, capables de s'associer spontanément aux membranes plasmique et/ou endosomale et d'y polymériser par l'intermédiaire de leur extrémité basique N-terminale. Les bases structurales de ce phénomène ont également été identifiées grâce aux structures cristallographiques de Chmp3 et semblent impliquer $\alpha 2$ et $\alpha 5$ (Bajorek *et al.*, 2009; Muziol *et al.*, 2006). En effet, l'introduction de mutations dans l'une ou l'autre de ces hélices suffit à perturber leur interaction et à stimuler l'association de Chmp3 avec Chmp2a au sein de polymères caractéristiques que je détaillerai en section 4.2.4 (Bajorek *et al.*, 2009). Ces observations structurales et fonctionnelles ont conduit à l'émergence d'un modèle commun de fonctionnement des sous-unités d'ESCRT-III : dans le cytoplasme, ces protéines adoptent une conformation « fermée » en raison du repliement des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ sur la structure « cœur », composée des hélices $\alpha 1$ à $\alpha 4$. En masquant des sites cruciaux pour l'association des sous-unités entre elles et avec les membranes, cette interaction intramoléculaire maintient les sous-unités Chmp d'ESCRT-III sous forme monomérique et soluble. Le passage en conformation ouverte, provoqué par le déplacement de l'hélice $\alpha 5$, libère l'extrémité N-terminale chargée positivement et facilite donc l'association des différentes sous-unités aux membranes biologiques, riches en phosphoinositol -3-phosphates (Figure I.4.5.). Par ailleurs, cette levée de l'auto-inhibition portée par l'extrémité C-terminale implique souvent de larges réarrangements structuraux qui conditionnent en partie l'homo- ou l'hétérodimérisation des sous-unités d'ESCRT-III et la capacité de déformation membranaire qui en découle (Saksena *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2015).

Ce modèle, désormais largement validé expérimentalement, requiert cependant des précisions supplémentaires en ce qui concerne la nature des signaux responsables du changement conformationnel opéré par les membres d'ESCRT-III. L'hypothèse la plus

répandue propose l'établissement d'interactions intermoléculaires (lipides, protéines) de forte affinité, à l'origine de la déstabilisation de l'interaction électrostatique faible entre $\alpha 2$ et $\alpha 5$ (Xiao *et al.*, 2009).

4.2.3. Assemblage d'ESCRT-III au niveau des membranes

L'assemblage membranaire des sous unités d'ESCRT-III se déroule selon une séquence d'évènements extrêmement ordonnée dans le temps et dans l'espace et principalement définie dans le modèle levure. Dans ce modèle, les sous-unités Vps20, Snf7, Vps24 et Vps2 d'ESCRT-III sont recrutées de façon séquentielle, dans cet ordre et selon une stœchiométrie définie (1 :10 :5 :3), et forment deux sous-complexes distincts : Vps20-Snf7 (Chmp6-Chmp4b) et Vps24-Vps2 (Chmp3-Chmp2) (Saksena *et al.*, 2009; Teis *et al.*, 2008).

Comme précédemment décrit, l'assemblage d'ESCRT-III débute par la double interaction entre Vps25 (ESCRT-II) et Vps20 (ESCRT-III). Chez la levure, cette association, à l'origine de la levée de l'auto-inhibition et du passage des deux copies de Vps20 sous forme ouverte et donc active, provoquerait une courbure membranaire qui accélérerait la nucléation parallèle de deux filaments de Snf7 (Im *et al.*, 2009; Teis *et al.*, 2010). La situation pourrait être différente chez les eucaryotes supérieurs, comme le ver *Caenorhabditis elegans* : dans cet organisme, Vps20 acquiert spontanément une conformation ouverte, indépendamment de sa liaison à Vps25 (Schuh *et al.*, 2015). Chez le ver, l'interaction avec Vps25 confère à l'hétérodimère formé une capacité de détection des membranes courbées vers lesquelles sont dirigés le recrutement et la polymérisation des filaments de Snf7 (Fyfe *et al.*, 2011; Schuh *et al.*, 2015). Quel que soit le scénario considéré, ces deux hypothèses soulignent le rôle majeur joué par la présence d'invaginations membranaires, générées ou détectées par Vps25-Vps20, dans l'accélération de la nucléation des filaments d'ESCRT-III (Lee *et al.*, 2015). De plus, l'engagement par Vps20 des sous-unités cytosoliques de Snf7 favoriserait la transition de ces dernières vers une conformation ouverte (Henne *et al.*, 2012), notamment caractérisée par le dépliement des hélices de la structure « cœur » (Tang *et al.*, 2015). Ainsi libérées, ces hélices cationiques permettent non seulement de stabiliser Snf7 au niveau des membranes endosomales (Buchkovich *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2015) mais également de faciliter l'homopolymérisation de Snf7 par un effet domino (Tang *et al.*, 2015). En effet, l'interaction de Snf7 activée avec d'autres protomères pourrait favoriser leur ouverture

INTRODUCTION

et ainsi de suite, jusqu'à former deux filaments circulaires parallèles encerclant les cargos à séquestrer dans les vésicules intraluminales (Adell *et al.*, 2014, 2017; Teis *et al.*, 2010). Lorsque le périmètre délimité par ces filaments juxtaposés atteint un certain diamètre (40 à 60 nm en moyenne selon Adell *et al.*, (2014)), le recrutement du sous-complexe constitué de Vps24 et Vps2 entraîne l'arrêt de la polymérisation de Snf7 (Mierzwa *et al.*, 2017; Saksena *et al.*, 2009). Par ailleurs, par des mécanismes encore hypothétiques, l'association des filaments de Snf7 à l'hétérodimère Vps24-Vps2 induit un remodelage de ces spirales planes sous forme d'hélices tridimensionnelles, responsables d'une profonde invagination membranaire (Henne *et al.*, 2012). Enfin, par l'intermédiaire de l'exposition des domaines MIM1, Vps24-Vps2 dicte également le recrutement du complexe de dissociation Vps4, dont la fonction discutée sera explicitée ultérieurement (Mierzwa *et al.*, 2017; Wollert and Hurley, 2010; Wollert *et al.*, 2009).

Chez les mammifères, en dépit de la détermination moins fine de la séquence des évènements, le mécanisme global d'assemblage séquentiel semble conservé. Ainsi, lors du bourgeonnement viral, l'homologue mammifère de Snf7, Chmp4 et notamment l'isoforme Chmp4b, recruté via ESCRT-I/II ou Alix, lie directement Chmp2a, qui recrute à son tour Vps4 (Morita *et al.*, 2011). Ces trois sous-unités sont absolument nécessaires à la libération des virions, tandis que Chmp3 et ESCRT-II n'y contribuent que de façon accessoire (Morita *et al.*, 2011), contrastant ainsi avec leur implication obligatoire dans la formation des EMVs chez la levure (Babst *et al.*, 2002a; Teis *et al.*, 2008, 2010; Wollert and Hurley, 2010). De façon analogue, l'abscission cytokinétique requiert également l'assemblage séquentiel et ordonné de Chmp4b, Chmp3, Chmp2a et Vps4b (Christ *et al.*, 2016; Guizetti *et al.*, 2011). Enfin, chez les mammifères aussi, Chmp2a modifie la structure des filaments constitués de Chmp4 (Cashikar *et al.*, 2014). Si le remodelage induit par Chmp2a participe indiscutablement à l'acquisition de propriétés de déformation membranaire par ces structures spiralées initialement planes, les sous-unités d'ESCRT-III s'assemblent également selon d'autres structures types, développées ci-après.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.6. : Structures formées par les filaments d'ESCRT-III

(a) Formation de spirales planes par des polymères de Snf (levure) sur membranes artificielles (Chiaruttini *et al.*, 2015) ou par des polymères de Chmp4a-FLAG (Hanson *et al.*, 2008) et Chmp4a (Cashikar *et al.*, 2014) à la surface de cellules COS-7. (b) Formation de tubes protrusifs par des cellules COS-7 co-exprimant Chmp4a ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) « ouverte » et Chmp2a (longueur totale) (Cashikar *et al.*, 2014), ou par des cellules COS-7 co-exprimant Chmp4a et une version dominant négative de Vps4b (E235Q) (Hanson *et al.*, 2008). Des structures analogues sont observées lors de la surexpression du domaine N-terminal (1-116) de Chmp4a (Hanson *et al.*, 2008). Ces formations tubulaires sont également formées *in vitro*, en présence de version tronquées pour l'extrémité C-terminale de Chmp2a et Chmp3 (Lata *et al.*, 2008). (c) Il arrive que ces tubes se ferment à l'une ou l'autre des extrémités (panel de gauche tiré de Lata *et al.*, (2008) ; panel de droite tiré de Effantin *et al.*, (2013)). L'astérisque indique un tube fermé par une extrémité en dôme.

4.2.4. Structures tridimensionnelles adoptées par les filaments d'ESCRT-III

La capacité d'ESCRT-III à déformer les membranes, support des fonctions biologiques portées par cette machinerie, repose exclusivement sur la formation de structures particulières décrites ici et dont les implications fonctionnelles en termes de scission membranaire seront discutées en partie 4.2.6.

4.2.4.1. Spirales planes

La microscopie électronique de type « deep-etch », particulièrement adaptée à l'observation des matrices et réseaux cellulaires, a permis de caractériser les structures formées par Chmp4a/b, à la suite de leur surexpression dans des cellules de mammifères. Dans cette configuration expérimentale, la concentration importante de ces sous-unités d'ESCRT-III conduit à la formation de filaments simples de 5-6 nanomètres de diamètre, enroulés de façon concentrique et plane, et assemblés au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique (Hanson *et al.*, 2008) (Figure I.4.6. panel du haut). Ces structures ont également été rapportées *in vitro*, au niveau de membranes synthétiques, par polymérisation de l'isoforme Snf7 de levure (Chiaruttini *et al.*, 2015) ou de son homologue chez *C. elegans* (Shen *et al.*, 2014b) (Figure I.4.6. panel du haut). Quel que soit l'organisme d'origine, les spirales formées à partir d'homopolymères de la forme native de Snf7/Chmp4 sont systématiquement constituées d'un filament simple brin et adoptent une conformation plane. Cette observation comprend deux implications majeures. D'une part, la structure simple brin des spirales leur confère une grande flexibilité, à l'origine d'importants degrés de courbure, observés notamment au centre des hélices (Chiaruttini *et al.*, 2015). En polymérisant, ces spirales planes accumulent une quantité élevée d'énergie élastique qu'elles peuvent libérer à la manière d'un ressort, sous l'effet de différents facteurs, pour produire une déformation membranaire. Ainsi, la déformation membranaire requiert la contribution additionnelle d'autres membres d'ESCRT-III, parmi lesquels Vps4 ou Chmp2a, comme mentionné dans la section suivante.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.7. : Modèle proposé de constriction des spirales par Vps4

Selon le modèle proposé par Shen *et al.*, (2014b), l'hélice $\alpha 6$ porteuse des domaines MIM d'interaction avec Vps4 jouerait un rôle d'« écarteur » entre les tours de spirale constitués par le même filament (panel de gauche). A la suite de la liaison de Vps4, cette hélice serait déplacée, ce qui conduirait à la compaction des spirales et à la libération de l'énergie contenue (panel de droite).

4.2.4.2. Tubes protrusifs

De façon surprenante, la co-expression de Chmp4a/b et d'une forme tronquée de Chmp2a (Cashikar *et al.*, 2014) ou d'un dominant négatif de Vps4, incapable d'hydrolyser l'ATP (Hanson *et al.*, 2008), entraîne l'apparition de protrusions membranaires similaires aux hélices observées chez la levure en présence de Vps24-Vps2 (Henne *et al.*, 2012) (Figure I.4.6. panel du milieu). Si les bases mécanistiques à l'origine de la transition spirale/extrusions tubulaires demeurent obscures, une piste de réflexion intéressante a été fournie grâce aux travaux conduits chez *C. elegans*. Les auteurs de cette étude suggèrent en effet que les domaines MIM2, présents à l'extrémité C-terminale de Snf7/Chmp4, pourraient contacter deux filaments adjacents au sein d'une même spirale et limiteraient de ce fait le niveau de compaction de l'ensemble de la structure (Shen *et al.*, 2014b) (Figure I.4.7.). L'interaction des spirales avec Vps4, directement grâce au domaine MIM2 de Snf7/Chmp4 (Kieffer *et al.*, 2008) ou par l'intermédiaire du domaine MIM1 de Vps2/Chmp2 (Stuchell-Brereton *et al.*, 2007), provoquerait un déplacement de l'extrémité C-terminale et favoriserait la constriction des spirales (Shen *et al.*, 2014b) (Figure I.4.7.). La libération simultanée de l'énergie élastique contenue catalyserait à son tour la déformation membranaire, possiblement sous la forme des protrusions observées par les auteurs précédemment cités. En accord avec ce modèle, la surexpression d'un mutant de Chmp4, tronqué au niveau de son extrémité C-terminale, suffit à générer des protubérances membranaires similaires à celles observées en présence du dominant négatif de Vps4 (Hanson *et al.*, 2008).

Ces formations tubulaires ne sont pas l'apanage de Snf/Chmp4 et sont également constituées *in vitro* par des hétéropolymères hélicoïdaux de Chmp2a et Chmp3, tous deux tronqués à l'extrémité C-terminale (Lata *et al.*, 2008) (Figure I.4.6. panel du milieu). Au sein de ces édifices creux, les sous-unités d'ESCRT-III exposent leurs domaines d'interaction membranaire à la surface externe du tube, tandis que leurs domaines MIM1 s'orientent à l'intérieur du tube (Lata *et al.*, 2008). Cette organisation particulière, partagée par d'autres homopolymères d'ESCRT-III (Bajorek *et al.*, 2009; Bodon *et al.*, 2011), revêt une importance certaine dans l'élaboration d'un des modèles physiques de scission par ESCRT-III, développé en partie 4.2.6.

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.8. : Structure et fonctionnement proposé pour Vps4

(a) Structure hexamérique de l'ATPase Vps4 basée sur Caillat *et al.*, (2015). Le pore central, délimité par les 6 protomères (A à F – les protomères identiques sont de la même couleur), est particulièrement visible. (b) Sur la base des travaux de Yang *et al.*, (2015), il est proposé que Vps4 désassemble complètement les sous-unités d'ESCRT-III, en les dépliant et les transloquant à travers le pore central. Tiré de Schöneberg *et al.*, (2017).

4.2.4.3. Tubes fermés par un dôme – cônes

Les hétéropolymères Chmp2a-Chmp3 décrits précédemment, lorsqu'ils atteignent une certaine longueur, ferment l'une ou l'autre de leurs extrémités sous forme de dômes (Effantin *et al.*, 2013; Lata *et al.*, 2008) (Figure I.4.6. panel du bas).

Si ces formations, observées pour la plupart *in vitro*, servent de base au développement de modèles physiques, leur pertinence physiologique et leur implication dans les grandes fonctions biologiques médiées par ESCRT-III restent cependant à démontrer avec certitude. Il est cependant intéressant de noter les similitudes frappantes entre ces structures formées *in vitro* et les filaments striés présents au niveau du cou des virions (Morita *et al.*, 2011; von Schwedler *et al.*, 2003) ou enserrant la zone de constriction lors de la cytokinèse (Guizetti *et al.*, 2011). En dépit de leur composition indéterminée, ces filaments pourraient raisonnablement correspondre à des polymères d'ESCRT-III, puisque leur formation apparaît strictement dépendante de Chmp2a (Guizetti *et al.*, 2011). La caractérisation fine de ces filaments souffre probablement aussi du caractère transitoire de leur assemblage membranaire (von Schwedler *et al.*, 2003). En effet, les polymères d'ESCRT-III sont rapidement dissociés en monomères recyclés dans le cytoplasme, grâce à l'action du complexe Vps4.

4.2.5. Vps4, agent de dissociation des polymères d'ESCRT-III et de la scission membranaire

À la fin des années 1990, l'équipe de Scott Emr démontre que l'expression d'un mutant catalytiquement inactif de Vps4 provoque l'accumulation des sous unités d'ESCRT-III à la membrane des compartiments de classe E (Babst *et al.*, 1998). Cette observation initiale a durablement inscrit l'idée que cette ATPase était principalement requise pour la dépolymérisation du complexe ESCRT-III et le recyclage cytoplasmique de ses composants. Afin d'exécuter cette fonction, Vps4 adopte une configuration active sous forme d'anneau hexamérique, constitué à partir de monomères ou de dimères cytosoliques (Adell *et al.*, 2017; Baumgärtel *et al.*, 2011) (Figure I.4.8.). La régulation de l'oligomérisation et de l'activité ATPasique de Vps4 est extrêmement complexe et l'objectif n'est pas d'en dresser ici une carte

exhaustive. Dans cette section, je m'attacherai donc à caractériser uniquement certaines modalités de contrôle de la fonction de Vps4, avant d'expliciter le déroulement de la dépolymérisation d'ESCRT-III et de discuter la récente implication de cette ATPase dans le processus de fission membranaire.

Comme abordé brièvement dans les parties précédentes, Vps4 comporte un domaine MIT, situé en N-ter, et capable d'interagir simultanément avec les domaines MIM1 de Vps2/Chmp2 et Did2/Chmp1 (Adell *et al.*, 2014; Obita *et al.*, 2007; Stuchell-Brereton *et al.*, 2007) et MIM2 portés par Vps20/Chmp6 et Snf7/Chmp4 (Adell *et al.*, 2014; Kieffer *et al.*, 2008), malgré une affinité moindre pour ces derniers. Cette interaction initiale constitue un mécanisme de régulation non seulement spatial (Adell *et al.*, 2014), mais aussi temporel de l'activité de Vps4. Ainsi, la concentration membranaire locale de Vps4 favoriserait son oligomérisation en présence d'ATP (Monroe *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2007). De plus, l'engagement direct des sous-unités d'ESCRT-III par Vps4 provoquerait également une levée de l'auto-inhibition exercée par le domaine MIT, et par extension une maximisation de la fonction ATPasique de Vps4 (Azmi *et al.*, 2008; Merrill and Hanson, 2010; Shestakova *et al.*, 2013). Par ailleurs, ESCRT-III participe également indirectement à une « super-activation » de Vps4, par l'intermédiaire de la potentialisation du cofacteur Vta1/LIP5 (Davies *et al.*, 2014; Norgan *et al.*, 2013; Skalicky *et al.*, 2012). Cette protéine accessoire du complexe de dissociation joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité de Vps4. En effet, les dimères de Vta1/LIP5 enjambent les sous-unités adjacentes de Vps4 et stabilisent la structure hexamérique de l'enzyme (Monroe *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). En conséquence, Vta1/LIP5 stimule l'hydrolyse de l'ATP et la dissociation du complexe ESCRT-III par Vps4 (Azmi *et al.*, 2006).

Récemment, les bases moléculaires de la déstructuration des polymères d'ESCRT-III ont été partiellement élucidées : au lieu d'induire des perturbations locales au sein des sous-unités d'ESCRT-III, Vps4 induit un dépliement total de ces dernières (Yang *et al.*, 2015), préalable à leur translocation à travers le pore central de l'hexamère (Caillat *et al.*, 2015; Monroe *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). La déstructuration progressive d'une fraction des composants du complexe suffit à entraîner la dissociation spontanée de l'ensemble du polymère et le recyclage des sous-unités qui le constituent (Yang *et al.*, 2015) (Figure I.4.8).

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.9. : Modèle du dôme (exemple de la cytokinèse)

Le modèle du dôme postule une croissance du filament « from wide to narrow », représentée sur le panel du milieu. L'accumulation d'énergie élastique au niveau du cou de la vésicule provoquerait la scission (panel de droite). Vps4 n'aurait qu'un rôle accessoire dans le processus de fission, selon ce modèle. Adapté de Guizetti and Gerlich, (2012).

Le consensus autour de la fonction dépolymérisante de Vps4 s'accompagne d'une controverse quant à son implication dans le processus de scission membranaire. Ainsi, sur la base d'observations réalisées dans des vésicules unilamellaires géantes, une première hypothèse attribue un rôle prépondérant à ESCRT-III dans le processus de scission membranaire. Dans ce modèle, Vps4 assure simplement la dissociation du complexe ESCRT-III et le recyclage, sous forme auto-inhibée, de ses sous-unités en vue de la répétition des cycles de bourgeonnement et de scission (Wollert and Hurley, 2010; Wollert *et al.*, 2009). À l'inverse, dans le second modèle, Vps4 catalyse la fission membranaire grâce à sa fonction ATPasique. Cette conception concorde avec des données expérimentales, obtenues dans un contexte d'infection virale. En effet, Vps4 montre un recrutement massif au niveau du cou des virions, immédiatement avant la scission virale (Baumgärtel *et al.*, 2011; Jouvenet *et al.*, 2011), ce qui suggère un rôle direct de l'enzyme dans le processus de fission. Par ailleurs, la mise en évidence récente de la dépendance absolue de la scission membranaire vis-à-vis de l'activité catalytique de Vps4 constitue un nouvel élément, plus direct, en faveur du second modèle (Schöneberg *et al.*, 2018). Ces deux hypothèses relatives au rôle de Vps4 dans la fission membranaire sont en partie à l'origine des deux principaux modèles physiques de scission, détaillés ci-après.

4.2.6. Modèles de scission membranaire par ESCRT-III et Vps4

L'assemblage progressif et la polymérisation d'ESCRT-III concourent *in fine* à la fission membranaire et à la libération de vésicules. Si le mécanisme responsable de la scission n'est toujours pas connu avec certitude, deux grands modèles physiques ont été proposés pour tenter de l'expliquer.

4.2.6.1. Modèle du dôme (« dome model »)

Le modèle du dôme trouve son origine dans l'observation des structures tubulaires fermées décrites en section 4.2.4.3. (Effantin *et al.*, 2013; Lata *et al.*, 2008), hypothétiquement formées par des hétéropolymères de Vps24/Chmp3-Vps2/Chmp2 à la base des vésicules. Ce type de conformation « en dôme » implique une polymérisation « from wide to narrow », c'est-à-dire initiée par des filaments relâchés, dont la courbure s'accroît au fur et à mesure de la croissance des oligomères (Figure I.4.9.). Physiquement, il a été proposé que l'accumulation

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.10. : Modèle de l'effondrement

Contrairement au modèle du dôme, le modèle de l'effondrement propose une polymérisation d'ESCRT-III « from narrow to wide » (indiquée sur le panel du haut). Ce type de croissance est associé à une augmentation de l'énergie contenue dans le filament (voir code couleur en bas à gauche du schéma). Lorsque l'énergie contenue dans la spirale plane devient supérieure à celle nécessaire à la déformation membranaire, elle est transférée à la membrane sous-jacente et conduit à son remodelage (flèche vers le bas). Alternativement, les filaments d'ESCRT-III pourraient s'assembler sur des surfaces membranaires déjà courbées (panel du bas). Dans ce scénario, le passage d'une conformation hélicale à une conformation plane, semblable au relâchement d'un ressort et possiblement médié par Vps4, provoquerait la scission. Adapté de Carlson *et al.*, (2015).

d'énergie élastique au niveau du cou de la vésicule, induite par l'interaction étroite entre le dôme d'ESCRT-III et la membrane (voir 4.2.4.2.), provoque la scission (Fabrikant *et al.*, 2009). Le rôle de Vps4, associée à ESCRT-III à l'intérieur du dôme comme décrit en partie 4.2.4.2., apparaît ici limité au renforcement de la rigidité de la structure. Par ce biais, l'ATPase faciliterait la scission, sans toutefois l'initier (Fabrikant *et al.*, 2009).

S'il présentait des caractéristiques attrayantes en raison de son adaptabilité à différents types de constriction membranaire, le modèle du dôme a été récemment révisé et l'assemblage de ces structures au niveau du cou des vésicules s'avère en réalité impossible d'un point de vue énergétique (Agudo-Canalejo and Lipowsky, 2018). À cette incohérence physique s'en ajoute une seconde, révélée par les expériences conduites à l'aide de matrices membranaires de courbure variable. En effet, comme abordé précédemment, la nucléation des filaments d'ESCRT-III est favorisée par la présence d'une courbure membranaire négative (Lee *et al.*, 2015). Autrement dit, les sous-unités d'ESCRT-III polymérisent depuis les zones les plus courbées de la membrane en direction de zones plus plates, peu incurvées. Cette observation suggère une croissance du filament « from narrow to wide », accompagnée d'un élargissement du diamètre défini au fur et à mesure de la polymérisation, à l'opposé de celle supposée par le modèle du dôme.

Le modèle du dôme et ses variations ultérieures (comme le modèle du dôme inversé – « reverse dome model ») s'accommodent donc mal du critère fondamental de courbure membranaire, ce qui a conduit à l'émergence d'une seconde conception physique du déroulement de la scission membranaire, appelée « modèle de l'effondrement ».

4.2.6.2. Modèle de l'effondrement (« buckling model »)

Théorisé dès la fin des années 2000 (Lenz *et al.*, 2009), le modèle de l'effondrement a connu une validation expérimentale assez récente : l'observation en temps réel de la polymérisation de Snf7 a révélé la formation de petits anneaux de nucléation à partir desquels se produit la croissance « from narrow to wide » des spirales (Chiaruttini *et al.*, 2015) (Figure I.4.10.). Dans cette configuration expérimentale, l'oligomérisation de Snf7 est réalisée sur des surfaces planes. Au fur et à mesure de la polymérisation de Snf7, les filaments acquièrent un fort degré de relâchement et emmagasinent de grandes quantités d'énergie élastique. Lorsque cette

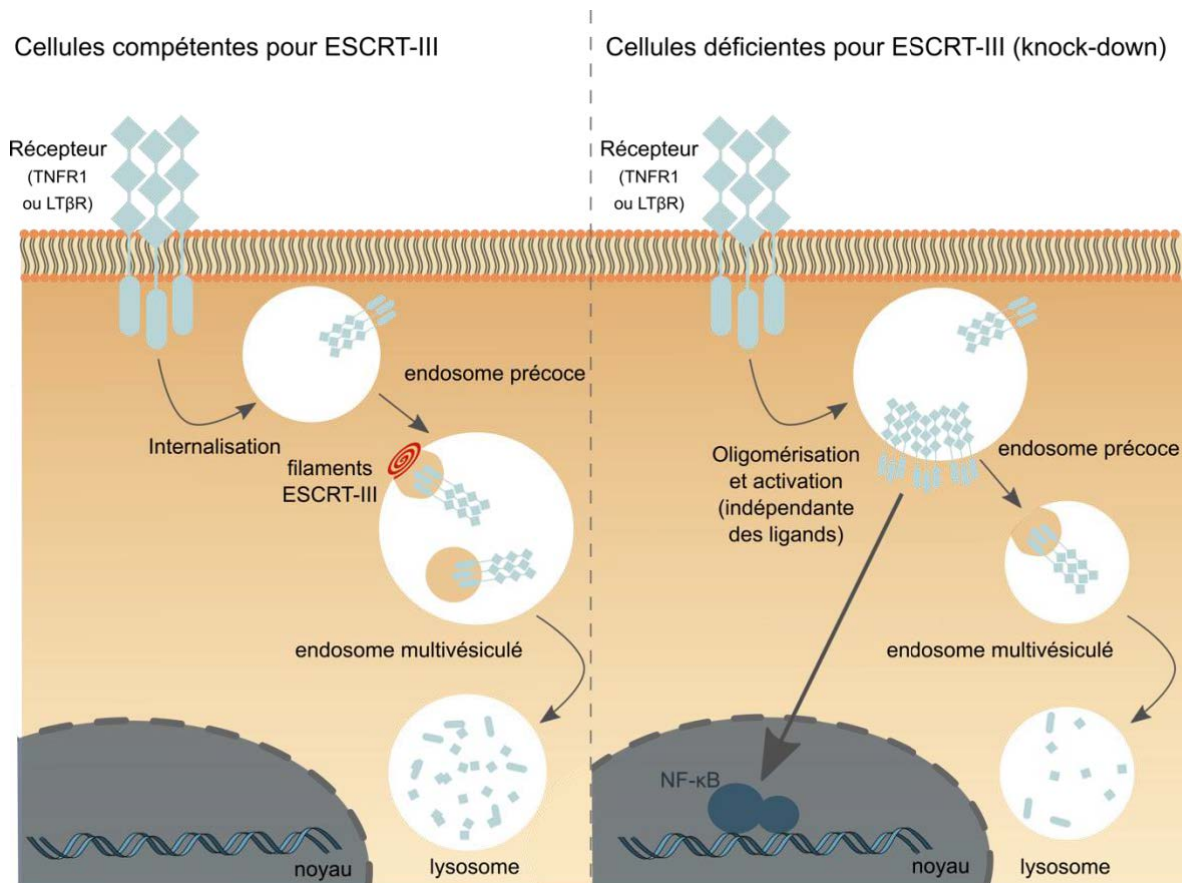


Figure I.4.11. : Régulation de la signalisation NF- κ B par ESCRT-III

A l'état basal, la machinerie ESCRT-III cible les récepteurs membranaires de la famille TNFR vers des compartiments multi-vésiculés en vue de leur dégradation lysosomale. Le trafic de ces récepteurs, y compris en l'absence de ligands permet d'empêcher leur accumulation et leur activation. A l'inverse, dans des cellules déficientes pour ESCRT-III, l'internalisation des récepteurs au sein de vésicules intraluminales est perturbée. En conséquence, ces récepteurs s'accumulent au niveau de la membrane des compartiments précoces où ils s'oligomérisent et signalent, en l'absence de ligands. Ce schéma basé sur l'étude de Mamińska *et al.*, (2016) fait figurer un faible degré d'internalisation luminale/dégradation des récepteurs, car il s'agit uniquement d'un contexte « knock-down » (les auteurs ne détectent pas d'augmentation des niveaux cellulaires de ces récepteurs à la suite du silencing d'ESCRT-III, ce qui suggère une dégradation incomplètement inhibée).

dernière devient trop importante, elle est transférée à la membrane sous-jacente et induit son « effondrement » et sa déformation (Figure I.4.10.). Or, comme abordé en parties 4.1.1.2. et 4.2.1., il est probable qu'*in vivo*, les filaments d'ESCRT-III s'assemblent non pas sur des surfaces planes, mais au niveau de zones déjà préalablement courbées par l'action conjointe des complexes ESCRT-II et Vps25/EAP20-Vps20/Chmp6. Dans ce cas, la libération de l'énergie contenue les polymères hélicoïdaux de Snf7 conduit, à la manière du relâchement d'un ressort, à l'aplatissement de l'hélice corrélé au processus de scission (Figure I.4.10.). Ici Vps4 pourrait, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, dicter le passage de la conformation tubulaire/hélicoïdale du filament à une structure spirale plane et, par extension la fission membranaire elle-même, comme suggéré par les travaux de Schöneberg *et al.* (2018).

4.3. Illustration des capacités de déformation membranaire d'ESCRT-III au travers de trois processus physiologiques

Bien que la machinerie ESCRT-III contrôle drastiquement la formation des EMVs, le bourgeonnement viral et l'abscission cytokinétique, je choisis dans cette partie de développer trois autres de ses fonctions qui présentent un intérêt majeur en raison de leur réévaluation récente et/ou leur lien avec ce travail de thèse.

4.3.1. Régulation de la signalisation NF- κ B

Cette fonction d'ESCRT-III est intimement liée à son rôle dans la biogénèse des EMVs et la dégradation des cargos qu'ils contiennent, parmi lesquels on dénombre des récepteurs transmembranaires, responsables de l'induction de différentes voies de signalisation. Ainsi, les cellules déficientes pour TSG101 (ESCRT-I) montrent une accumulation du récepteur à l'EGF à la membrane limitante du compartiment endocytique, associée à la persistance de la signalisation MAP kinase en aval de ce récepteur (Bache *et al.*, 2006). De façon analogue, ESCRT-I et ESCRT-III contrôlent également la dégradation luminale des récepteurs au TNF ou à lymphotoxine- β (LT β R). En l'absence de TSG101 (ESCRT-I), Vps28 (ESCRT-I) ou Chmp4b (ESCRT-III), ces récepteurs persistent au niveau de compartiments EEA1+ précoces, où leur accumulation provoque l'oligomérisation de TNFR et LT β R, indépendamment de la

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.12. : Fermeture du phagophore par ESCRT-III

(a) Système expérimental à l'origine de la mise en évidence du rôle d'ESCRT-III dans la fermeture du phagophore. A la suite de l'induction de l'autophagie, les cellules HT-LC3 sont perméabilisées afin de relarguer les protéines LC3 cytosoliques, non-associées aux membranes des compartiments autophagiques. Les cellules sont ensuite incubées en présence du ligand MIL, incapable de passer les membranes cellulaires, afin de détecter LC3 lié aux membranes des phagophores en formation. Ensuite, les cellules sont marquées à l'aide d'un second ligand, MPL, couplé à un autre fluorochrome et capable de traverser les membranes biologiques. Ce ligand se lie aux molécules LC3 internalisées à l'intérieur de compartiments clos, non accessibles au ligand MIL. Ce système de double marquage permet d'identifier les différents stades de maturation des compartiments autophagiques. Tiré de Takahashi *et al.*, (2018) (b) Modèle de fermeture du phagophore par ESCRT. Vps37A dirige l'assemblage d'ESCRT-III au niveau de la membrane du phagophore en vue de sa fermeture, à la suite de la fission médiée par Vps4. Tiré de Takahashi *et al.*, (2019).

fixation de leurs ligands respectifs (Figure I.4.11.). À l'instar des événements observés à la membrane plasmique et détaillés en section 3.1.2.1., l'oligomérisation de ces récepteurs à la membrane endosomale initie les voies NF- κ B canonique et non-canonique, à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, TNF α) (Mamińska *et al.*, 2016) (Figure I.4.11.). À l'état basal, la machinerie ESCRT régule donc le devenir intracellulaire de différents récepteurs de signalisation et limite par extension l'induction de voies de transduction du signal, comme NF- κ B.

4.3.2. Contrôle du flux autophagique

L'intuition de l'existence d'un lien entre machinerie ESCRT et autophagie est ancienne et trouve sa source dans l'accumulation de structures intracellulaires caractéristiques, appelées autophagosomes et observées notamment à la suite de la déplétion de certains constituants d'ESCRT ou de Vps4 (Filimonenko *et al.*, 2007; Lee and Gao, 2008; Rusten *et al.*, 2007). À cette époque, malgré l'existence d'autres hypothèses (Rusten and Stenmark, 2009), on considère qu'ESCRT est probablement requise pour la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Filimonenko *et al.*, 2007) et que l'inhibition de cette étape conduit au phénotype observé. Il faudra attendre 2018 et le développement d'un élégant système de double marquage des compartiments autophagiques pour que soit élucidée formellement la fonction d'ESCRT dans ce processus. Grâce à l'utilisation successive de deux ligands fluorescents de la protéine LC3, l'un traversant les membranes et l'autre pas (Figure I.4.12.), les auteurs parviennent à distinguer les différents stades de maturation de l'autophagosome, caractérisés par des degrés de fermeture variables du compartiment (Takahashi *et al.*, 2018). De façon frappante, la déplétion de Chmp3, Chmp2a ou Vps4 conduit à l'accumulation de phagophores, c'est-à-dire de structures ouvertes correspondant au stade le plus précoce de formation de l'autophagosome (Takahashi *et al.*, 2018). Ainsi, le complexe ESCRT-III apparaît nécessaire à la fermeture des phagophores, médiée par fission membranaire, et à la biogenèse résultante des autophagosomes (Figure I.4.12.).

Enfin, il est intéressant de noter qu'en plus de son implication macroautophagique sus-décrite, ESCRT-III contrôle également l'internalisation sélective ou non-sélective de protéines

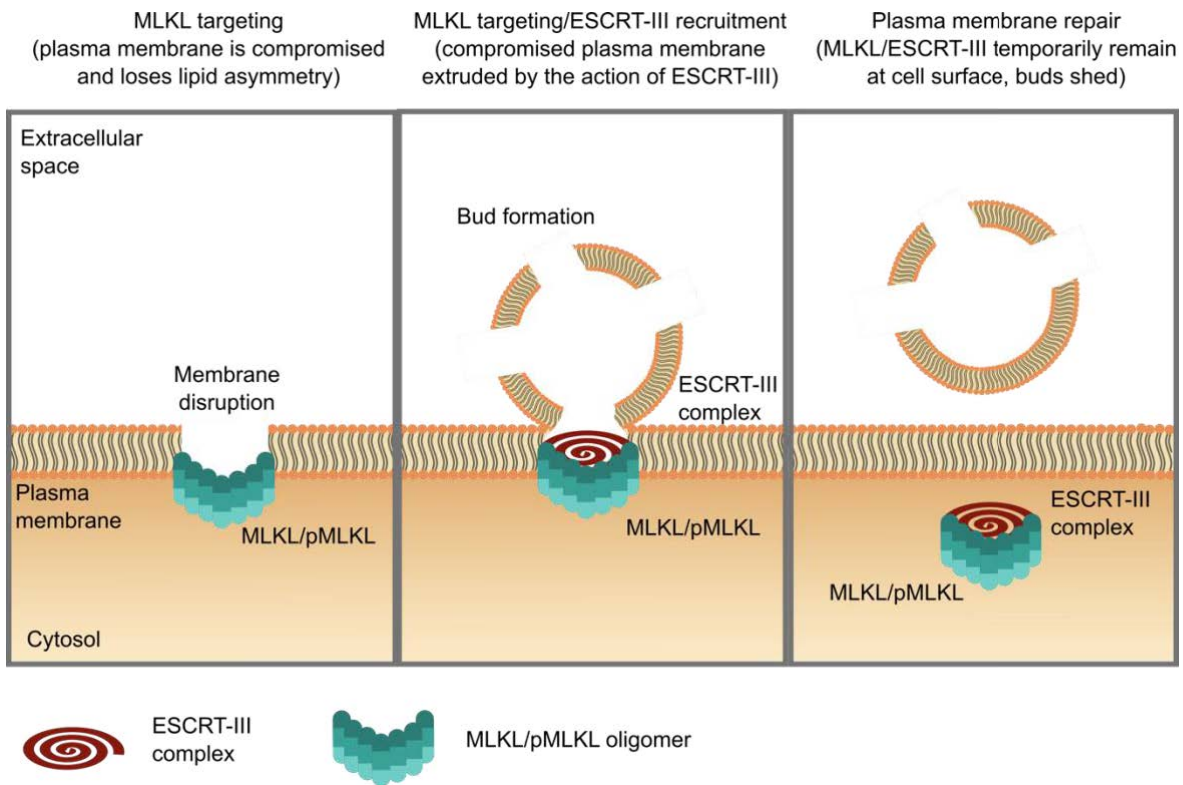


Figure I.4.13. : Réparation des dommages (ici nécroptotiques) touchant la membrane plasmique par ESCRT-III

A la suite de l'induction nécroptotique, MLKL forme des oligomères insérés dans la membrane plasmique. Ces pores génèrent, par des mécanismes encore inconnus, des lésions membranaires à l'origine d'un influx calcique dans le cytosol. Ce flux entraîne le recrutement du complexe ESCRT-III au lieu de la lésion. Par l'intermédiaire de la formation d'un bourgeon libéré *in fine* dans le milieu extracellulaire, ESCRT-III excise les portions de membrane plasmique endommagées. Sur la base de seules observations microscopiques, les oligomères de MLKL sont supposés être relargués dans le cytosol où ils seraient dissociés (?). Dans le cas de dommages pyroptotiques, gasdermine D (à l'origine de la formation des dommages) est détectée, avec ESCRT-III, dans les vésicules libérées. ESCRT-III pourrait donc, de façon analogue, exciser les pores de MLKL en même temps que les portions membranaires lésées. Cela reste à démontrer formellement. Adapté de Gong *et al.*, (2017b).

cytosoliques dans des vésicules intraluminales au cours d'un processus appelé « microautophagie » (Sahu *et al.*, 2011).

Quelle que soit la voie autophagique considérée, l'implication spécifique d'ESCRT-III lors de l'étape de scission (plutôt que lors de la fusion phagolysosomale, comme initialement suggéré) souligne une nouvelle fois l'incroyable diversité des processus biologiques régulés par cette machinerie, également illustrée par l'exemple suivant.

4.3.3. Réparation des membranes biologiques

4.3.3.1. Membrane plasmique

La découverte du rôle probablement ancestral d'ESCRT-III dans la réparation des membranes biologiques débute en 2014, avec la mise en évidence du recrutement rapide de Chmp4b à l'emplacement de dommages membranaires localisés, induits notamment par un faisceau laser (Jimenez *et al.*, 2014). Dans ce contexte, la perturbation de l'intégrité de la membrane plasmique provoque un influx calcique dans le cytoplasme, détecté par la protéine ALG-2 (Scheffer *et al.*, 2014). Cette dernière facilite le recrutement d'Alix, et par extension d'ESCRT-I et III, à l'endroit lésé. L'apparition de *foci* composés de Chmp4b, Chmp3 ou encore Chmp2a/b précède la fermeture des « plaies » membranaires et régule la survie cellulaire, par l'intermédiaire de l'excision, dépendante de l'activité ATPasique de Vps4, de vésicules comprenant les portions de membrane endommagées (Jimenez *et al.*, 2014).

Si ces résultats initiaux ont été obtenus en réponse à des stimuli destructeurs largement artificiels, comme l'exposition à un faisceau laser intense ou à des concentrations élevées de détergents ou de toxines bactériennes, ils revêtent également une importance physiologique majeure. En effet, ESCRT-III contrôle également la résistance des cellules vis-à-vis de l'induction de voies de mort cellulaire, comme la nécroptose (Gong *et al.*, 2017b) ou la pyroptose (Rühl *et al.*, 2018), grâce aux mêmes mécanismes (Figure I.4.13.). En plus d'éliminer les lésions causées par l'insertion de phospho-MLKL dans la membrane plasmique sous forme de bourgeons (Gong *et al.*, 2017b), ESCRT-III permet aussi l'incorporation de cette protéine au sein des vésicules intraluminales des EMVs (Yoon *et al.*, 2017), libérées *in fine* sous la forme d'exosomes. La séquestration de phospho-MLKL dans les exosomes limite son association à la

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure I.4.14. : Reformation/réparation de l'enveloppe nucléaire par ESCRT-III

(a) Pendant l'anaphase, ESCRT-III est dirigé par Chmp7 aux endroits où l'enveloppe nucléaire enserme les microtubules du fuseau mitotique. ESCRT-III, par l'intermédiaire des domaines MIT, recrute les spastines M1 et M87. ESCRT-III et les spastines œuvrent de concert afin de réaliser la constriction membranaire, associée à la section des microtubules. Tiré de Vietri *et al.*, (2015) (b) Afin de passer les constriction rencontrées, les cellules déforment leur noyau. Ce phénomène conduit à une augmentation de la pression intranucléaire et à la formation de bourgeons nucléaires. La rupture de ces structures transitoires entraîne la fuite de matériel nucléaire dans le cytoplasme ainsi que le recrutement d'ESCRT-III au lieu du dommage. De façon analogue à ses fonctions à la membrane plasmique, ESCRT-III re-selle l'enveloppe nucléaire et limite l'irruption de dommages chromatiniens. Adapté de Raab *et al.*, (2016).

membrane plasmique et constitue donc un second mécanisme de protection en réponse à l'induction de la nécroptose (Yoon *et al.*, 2017).

4.3.3.2. Enveloppe nucléaire

La découverte de l'implication d'ESCRT-III dans la réparation de la membrane plasmique fut rapidement suivie de la révélation de son rôle dans la reconstitution de l'enveloppe nucléaire, en fin de mitose. Dans ce cadre, Chmp7, recruté par la protéine LEM2 (Gu *et al.*, 2017), nucléée la formation des filaments d'ESCRT-III spécifiquement au niveau de zones où l'enveloppe nucléaire capture des faisceaux de microtubules (Olmos *et al.*, 2016). Par l'intermédiaire des domaines MIM, les sous-unités d'ESCRT-III interagissent avec les spastines M1 et M83, porteuses de domaines MIT. L'ensemble de ces protéines catalyse ensuite la dissociation des microtubules et autorise la reformation ultérieure de l'enveloppe nucléaire (Olmos *et al.*, 2015; Vietri *et al.*, 2015) (Figure I.4.14.). À l'inverse, la déplétion de Chmp3 ou Chmp2 induit la persistance des microtubules ce qui compromet l'intégrité de l'enveloppe nucléaire et la séquestration des composants nucléo-cytoplasmiques (Olmos *et al.*, 2015; Vietri *et al.*, 2015).

La sortie de mitose ne constitue pas l'unique situation biologique dans laquelle le complexe ESCRT-III est recruté au niveau de l'enveloppe nucléaire. En effet d'élégants travaux, conduits par les équipes de Matthieu Piel et Jan Lammerding, ont démontré que la migration cellulaire dans un environnement contraint s'accompagne de ruptures locales de l'enveloppe, générées par l'augmentation de la pression intra-nucléaire (Denais *et al.*, 2016; Raab *et al.*, 2016) (Figure I.4.14.). Ces évènements de rupture coïncident avec la survenue de cassures double-brin de l'ADN, qui menacent sérieusement la survie cellulaire, en cas de non-réparation. Dans ce contexte, le recrutement d'ESCRT-III au niveau des lésions de l'enveloppe nucléaire revêt une importance vitale, notamment dans les cellules immunitaires largement soumises aux stress mécaniques liés à la migration.

4.3.3.3. Compartiments endolysosomaux

Enfin, la capacité de réparation des membranes biologiques par ESCRT-III a récemment été étendue aux endomembranes, selon des modalités analogues à celles décrites pour la membrane plasmique (Radulovic *et al.*, 2018; Skowrya *et al.*, 2018). La réparation des endomembranes médiée par ESCRT-III pourrait non seulement garantir l'intégrité cellulaire en réponse à des menaces physiques (internalisation de cristaux de silice ou d'acide urique), mais également contribuer à la séquestration de pathogènes intracellulaires comme *Mycobacterium smegmatis* et ainsi, contenir l'infection (López-Jiménez *et al.*, 2018; Philips *et al.*, 2008).

5. OBJECTIFS DE LA THÈSE

La découverte de la présentation croisée il y a quarante ans a constitué une révolution dans notre compréhension de la biologie fondamentale des cellules dendritiques. La caractérisation moléculaire de la voie cytosolique, prépondérante *in vivo*, a concentré les efforts de nombreuses équipes de recherche et fait émerger l'idée, très largement acceptée, que le transporteur Sec61 contrôle l'export cytosolique des antigènes (Ackerman *et al.*, 2006; Zehner *et al.*, 2015). Cependant, la seule implication de ce translocon apparaît insuffisante et insatisfaisante à de nombreux égards (développés en partie 2.2.2.1.) et suggère donc la contribution de mécanismes régulateurs additionnels (Dingjan *et al.*, 2016; Grotzke *et al.*, 2017). La seconde hypothèse évoquée lors de la mise en évidence de l'export cytosolique des antigènes réside dans la rupture temporaire de la membrane limitante du compartiment contenant l'antigène (Reis e Sousa and Germain, 1995). Longtemps rejeté en raison de l'absence supposée de mécanismes de contrôle de l'intégrité membranaire, ce modèle requiert une réévaluation au regard de la découverte récente du rôle central joué par ESCRT-III dans la réparation des membranes biologiques (Jimenez *et al.*, 2014; Olmos *et al.*, 2015; Raab *et al.*, 2016; Radulovic *et al.*, 2018; Skowyra *et al.*, 2018).

Dans ce cadre conceptuel, mon travail de thèse a principalement consisté en la caractérisation de l'implication de la machinerie ESCRT-III dans l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée par les cellules dendritiques. Selon le mécanisme biologique étudié, la contribution relative des différentes sous-unités d'ESCRT-III varie. Nous avons choisi de concentrer notre étude sur les sous-unités Chmp2a et Chmp4b, nécessaires au déroulement de tous les processus biologiques médiés par ESCRT-III (Jimenez *et al.*, 2014; Morita *et al.*, 2010, 2011; Skowyra *et al.*, 2018; Takahashi *et al.*, 2018). Dans un second temps, les résultats obtenus et l'importance décrite d'ESCRT-III dans la réparation des dommages nécroptotiques (Gong *et al.*, 2017b) nous ont amenés à évaluer la possible contribution de ces lésions, en partie endomembranaires, dans l'export cytosolique des antigènes. Ainsi, en excisant les dommages nécroptotiques de la membrane plasmique ou des compartiments endocytiques, ESCRT-III régulerait l'activation croisée en contrôlant non seulement l'émission de cytokines par les cellules donneuses d'antigènes (comme décrit en partie 3.2.2.3.), mais aussi en modulant l'export

INTRODUCTION

cytosolique des antigènes dans les cellules dendritiques. Grâce à l'utilisation de cellules dendritiques murines primaires ou immortalisées et invalidées pour Chmp2a et Chmp4b ainsi qu'au développement de différentes approches expérimentales (microscopie, inhibition pharmacologique de la nécroptose, analyses fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*), les résultats présentés ici démontrent l'implication des fonctions de réparation d'ESCRT-III dans un processus immunologique majeur. Ce travail de doctorat permet par conséquent de revisiter l'hypothèse dite de « la rupture du compartiment » et d'améliorer la compréhension des processus cellulaires impliqués dans la présentation croisée.

RÉSULTATS

**ARTICLE I: ENDOCYTTIC MEMBRANE REPAIR BY ESCRT-III
CONTROLS ANTIGEN EXPORT TO THE CYTOSOL DURING
ANTIGEN CROSS-PRESENTATION**

Marine Gros¹, Marianne Burbage¹, Mathieu Bertrand^{2,3}, Elodie Segura¹, Derek Rookhuizen¹,
Nina Burgdorf¹, Mathieu Maurin¹, Eugene Kapp⁴, Richard Simpson⁴, Patrycja Kozik⁵, Jose
Villadangos⁴, Sebastian Amigorena^{1*§}.

¹ INSERM U932, Institut Curie, 75248 PARIS Cedex 05, France

² VIB Center for Inflammation Research, 9052 Ghent, Belgium

³ Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, 9052 Ghent, Belgium.

⁴ Department of Microbiology and Immunology, Peter Doherty Institute for Infection and
Immunity, University of Melbourne, VIC 3086, Melbourne, Australia⁵

⁵ Protein & Nucleic Acid Chemistry Division, MRC Laboratory of Molecular Biology,
Cambridge Biomedical Campus, Cambridge CB2 0QH, United Kingdom

* Corresponding author : sebastian.amigorena@curie.fr

§ Lead contact

(article soumis à Immunity, et rejeté – possibilité de resoumission)

Résumé

Contexte : Le laboratoire de Sebastian Amigorena s'intéresse de longue date aux cellules dendritiques avec pour objectif de caractériser les bases moléculaires à l'origine de leur supériorité en termes de présentation antigénique et plus spécifiquement en termes de présentation croisée. Les travaux de l'équipe ont notamment permis de mettre en évidence l'importance fondamentale de l'alcalinisation du compartiment endocytique, dépendante de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et contrôlée au cours de la présentation croisée par de nombreux acteurs clés parmi lesquels Rab27a, NOX2 ou encore Rac2. La contribution de ces protéines à l'export cytosolique des antigènes, par l'intermédiaire de la génération des ROS, suggère l'implication d'événements de rupture membranaire dans ce processus mal caractérisé. Cette hypothèse séduisante souffre cependant de l'absence de caractérisation différentielle des perturbations endomembranaires induites dans les cDC1 et cDC2, ainsi que d'une méconnaissance de la régulation des dommages produits. En effet, l'occurrence de ces perturbations suppose le recrutement d'une machinerie de réparation membranaire, comme ESCRT-III, en vue de limiter leurs conséquences potentiellement dommageables pour la cellule.

Méthodes : Afin de rendre compte de leur pertinence physiologique, la survenue de dommages intracellulaires a été suivie grâce à l'apparition caractéristique de *foci* constitués du marqueur galectine-3. Par ailleurs, l'implication d'ESCRT-III dans l'export cytosolique des antigènes, possiblement consécutif à la rupture des endomembranes, a été évaluée grâce à une approche perte de fonction, conduite par ciblage shARN dans une lignée de cDC1 murine. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques d'une voie de mort cellulaire particulière, la nécroptose, a révélé certaines perspectives intéressantes quant à la nature des dommages responsables de la fuite cytosolique des antigènes et réparés par ESCRT-III.

Résultats : Les résultats présentés ici démontrent que les cDC1, spécialisées dans l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée, montrent davantage de dommages intracellulaires, révélés par les *foci* galectine-3+, que leurs homologues cDC2. Cette observation corrèle de façon frappante avec le recrutement accru de certaines sous-unités de la machinerie de réparation ESCRT-III dans les compartiments intracellulaires de cette sous-population de cellules dendritiques. De plus, la déplétion de Chmp4b et Chmp2a, deux sous-unités effectrices

du complexe ESCRT-III, provoque une élévation drastique de la capacité des cellules dendritiques à réaliser l'export cytosolique des antigènes. Cet effet, intrinsèque aux cellules déficientes pour ESCRT-III et majoritairement indépendant de l'induction de NF- κ B liée au silencing, suggère qu'ESCRT-III contribue à l'état basal à la réparation de dommages endomembranaires et limite de ce fait l'export cytosolique des antigènes. De plus, la fuite cytosolique des antigènes, provoquée par l'absence d'une machinerie de réparation fonctionnelle, s'accompagne de l'augmentation de l'efficacité de la présentation croisée dans les cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo*. Enfin, la déplétion de Chmp4b et Chmp2a provoque l'accumulation d'oligomères de la protéine MLKL, responsables de lésions membranaires et endomembranaires normalement excisées par ESCRT-III. Ainsi, en l'absence d'une machinerie ESCRT-III fonctionnelle, la persistance de ces dommages endomembranaires causés par MLKL pourrait générer une perméabilité accrue, à l'origine du phénotype d'export cytosolique observé. En effet, l'inhibition pharmacologique de RIPK3, kinase activatrice de MLKL, entraîne une forte diminution de l'export cytosolique dans les cellules dendritiques déficientes pour ESCRT-III.

Conclusion : L'ensemble de ces résultats apporte des preuves supplémentaires en faveur de l'hypothèse de la « rupture membranaire » et démontre que la fuite cytosolique des antigènes, consécutive à la survenue de perturbations endomembranaires, est finement régulée par ESCRT-III. Si la nature des dommages intracellulaires induits reste à caractériser avec précision, la présente étude suggère cependant qu'ils pourraient être la conséquence de l'insertion endomembranaire de pores de MLKL. Ce travail participe à la réhabilitation d'une hypothèse ancienne, longtemps rejetée, et ouvre des perspectives nouvelles et fascinantes quant à la régulation de la présentation croisée et des réponses antitumorales qu'elle initie.

Contribution personnelle : J'ai réalisé, avec l'aide précieuse de Marianne Burbage, Derek Rookhuizen, Nina Burgdorf et Mathieu Maurin, toutes les expériences de cette étude, hormis la protéomique présentée en Figure R.1.1C (effectuée par Elodie Segura, Eugene Kapp et Richard Simpson), et les immunoblots des figures R.1.7A, R.1.7B, RS.1.8A et RS.1.8B (effectués par Mathieu Bertrand à partir de lysats obtenus par nos soins).

Abstract

Despite its crucial role in the initiation of cytotoxic immune responses, the molecular mechanisms underlying antigen cross-presentation remain incompletely understood. How antigens exit endocytic compartments to enter the cytosol for processing by the proteasome is a long-standing matter of controversy, confronting two main models: transfer through specific channels/transporters, or rupture of endocytic membranes and leakage of luminal content. We reasoned that the latter model could only be operational if membrane damages were contained by effective repair, to preserve cell survival. To test this possibility, we inhibited in conventional dendritic cells (cDCs) the expression of ESCRT-III, the main repair system for intracellular membranes. Consistent with their higher capacity to export and cross-present antigens, cDC1 display superior intracellular membrane injuries, as well as enriched ESCRT-III subunits in endocytic compartments, as compared to their cDC2 counterparts. Silencing of Chmp2a or Chmp4b, two effector subunits of the repair complex, enhances both cytosolic antigen export and cross-presentation by cDCs. These results show a critical role for membrane repair in containing antigen export to the cytosol and cross-presentation in cDCs. They are consistent with antigen exiting endocytic compartments after membrane disruption, rather than through specific transporters or translocons, identifying a new fundamental cell mechanism involved in antigen cross-presentation, and opening new opportunities for therapeutic immune manipulation.

Introduction

Conventional dendritic cells (cDCs) initiate immune responses against pathogens and tumors. To do so, they present exogenous antigens on both Major Histocompatibility Complex (MHC) class II (MHC-II) and class-I (MHC-I) molecules. Presentation of internalized antigens by MHC-I, or “cross-presentation”, mediates priming of CD8⁺ naïve T lymphocytes, or “cross-priming”, a process first described over forty years ago (Bevan, 1976a, 1976b). At steady state, CD8⁺ CD11b⁻ cDC1 display a superior ability to cross-present antigens compared to CD8⁻ CD11b⁺ cDC2, due to specialized machinery delivering antigens to cross-presentation pathway (Blander, 2018). Our current understanding of the latter pathway is that, following uptake, antigens are exported from intracellular compartments to the cytosol, where they are degraded by the proteasome. The resulting peptides are then loaded on MHC-I (in the endoplasmic reticulum -ER- or in endocytic compartments) and subsequently presented at the cell surface (reviewed in Cruz *et al.*, (2017)). Whereas several steps of antigen cross-presentation are now well described, the molecular mechanisms underlying antigen export to the cytosol remain elusive.

Although the idea that antigens are exported to the cytosol was proposed in the early nineties (Kovacovics-Bankowski and Rock, 1995), the first insights into the molecular mechanisms involved came from studies using Exotoxin A (ExoA), a bacterial inhibitor of Sec61 (Koopmann *et al.*, 2000). ExoA blocked cytosolic export-dependent function of ICP47 protein (which inhibits peptide import into the ER or phagosomes by interacting with the cytosolic face of TAP (Ackerman *et al.*, 2006)), involving Sec61 in the process. Sec61 mediates signal peptide-dependent protein import in the ER and was proposed at that time to be involved in retro-translocation of misfolded proteins back into the cytosol (Römisch, 2017). Sec61-dependent export of antigens was further supported by results showing that siRNA-mediated depletion of Sec61, as well as retention of Sec61 in the ER by an intrabody, inhibited cytosolic antigen translocation and cross-presentation (Zehner *et al.*, 2015). In contrast, more recent study showed that inhibition of Sec61 α with a more specific inhibitor, mycolactone, had no direct effect on antigen export to the cytosol (Grotzke *et al.*, 2017). Sustained inhibition, however, diminished antigen cross-presentation following reduced expression of MHC class I molecules

at the plasma membrane. This study argues against Sec61 acting as a retrotranslocon in antigen export to the cytosol (Grotzke *et al.*, 2017).

Furthermore, the role of Sec61 in retro-translocation remains controversial, even in the ER. The pore size of Sec61, adapted for the insertion of extended unfolded polypeptides (Voorhees *et al.*, 2014), seems insufficient to export large folded, post-translationally-modified proteins, known to be exported to the cytosol during antigen cross-presentation (Singh and Cresswell, 2010), suggesting the contribution of additional export mechanisms.

A recent study, indeed, highlights a role for reactive oxygen species (ROS)-dependent lipid peroxidation in triggering endosomal membrane destabilization and subsequent antigen escape into the cytosol (Dingjian *et al.*, 2016). If leakage of endocytic compartments indeed occurs during antigen cross-presentation in cDCs, why does it not result in cell death? Indeed, permeabilization of endolysosomal membranes leads to release of cathepsins and hydrolases that initiate cell death pathways (Boya and Kroemer, 2008). Therefore, if membrane leaks were somehow involved in any physiological cell function, such as antigen cross-presentation, damages would need to be strictly contained to avoid cell death.

Several recent studies identify the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) as a major player in repairing different types of cellular membranes following damage, including plasma (Jimenez *et al.*, 2014), nuclear (Olmos *et al.*, 2015; Vietri *et al.*, 2015) and endolysosomal membranes (Radulovic *et al.*, 2018; Skowyrza *et al.*, 2018). The highly conserved ESCRT machinery is composed of four different complexes (from ESCRT-0 to ESCRT-III), sequentially recruited to membranes and displaying a wide range of cellular functions, from cytokinetic abscission (Carlton *et al.*, 2012) to virus budding (Garrus *et al.*, 2001). During repair, ESCRT-III constitutes the core complex forming helical filaments around damaged portions of membranes. The latter are ultimately shed away from the cytosol, in the form of buds, following filament constriction (Schöneberg *et al.*, 2017).

Here, we tested the hypothesis that ESCRT-III, by repairing membrane damages, controls antigen leakage to the cytosol during antigen cross-presentation in cDCs. We targeted Chmp4b, the main component of ESCRT-III helical filaments (Chiaruttini *et al.*, 2015; Hanson *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2014b), and Chmp2a, a subunit required for the recruitment of the unfolding protein Vps4b (Adell *et al.*, 2014; Fujita *et al.*, 2004; Saksena *et al.*, 2009) by shRNA.

RÉSULTATS

We show that depletion of ESCRT-III results in a drastic enhancement of antigen export to the cytosol and cross-presentation, in a cell-intrinsic manner, both *in vitro* and *in vivo*. ESCRT-III is recruited to damaged intracellular compartments, limiting both cell death and antigen leakage into the cytosol, which in turn controls antigen cross-presentation. Our results thus support the model of membrane leakage for antigen export to the cytosol in cross-presenting cDCs and suggest that necroptotic pathways may modulate the occurrence and efficiency of this process.

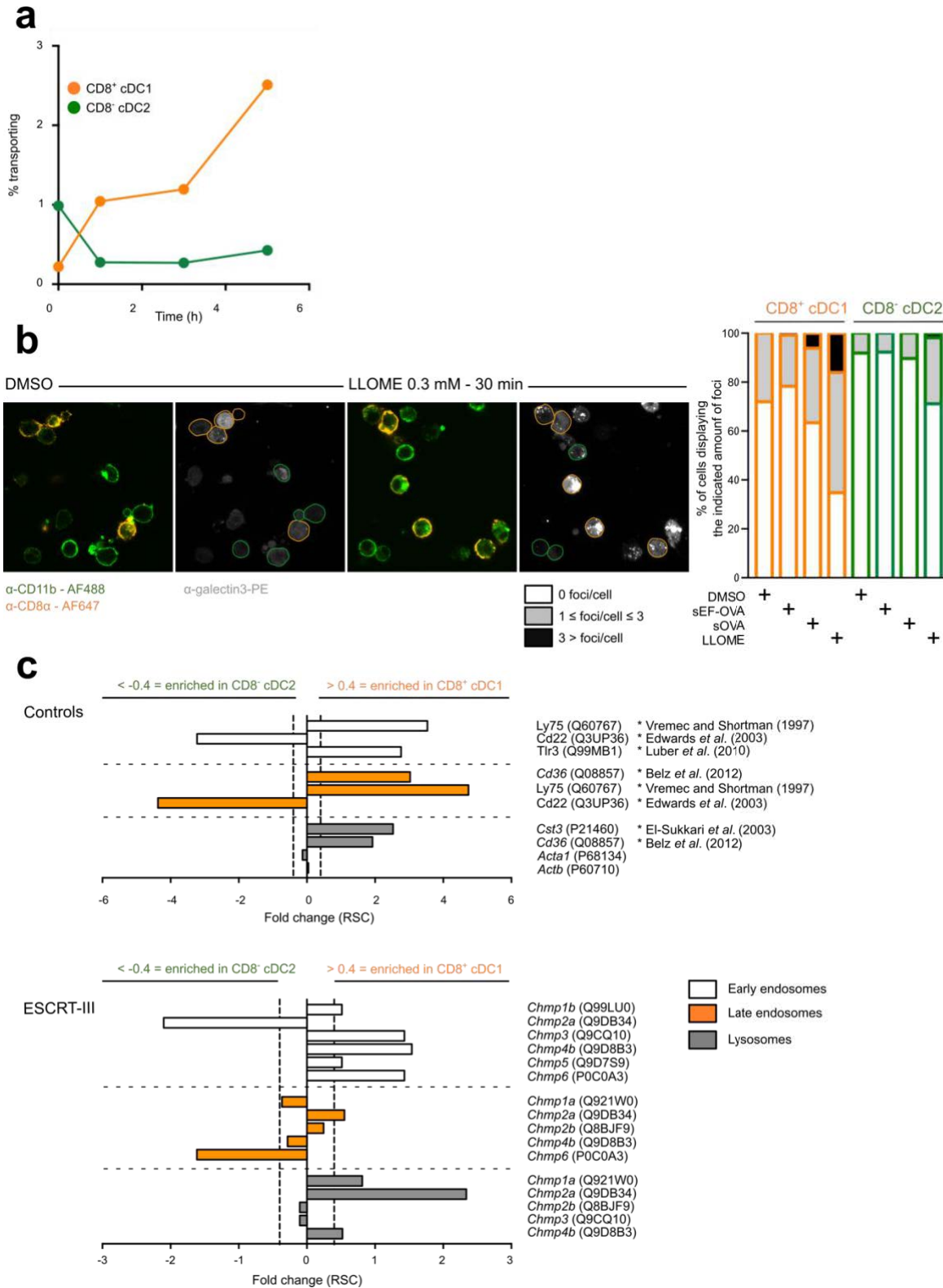


Figure R.1.1.: ESCRT-III subunits are enriched in damage-prone cross-presenting CD8+ cDC1

(a) Splenic cDCs from C57BL/6 mice were isolated and incubated with β -lactamase for various timepoints before CCF4 loading, antibody staining and analysis by flow cytometry. Graph shows the result of $n = 1$ experiment (performed with technical duplicates). (b) Splenic dendritic cells were purified and treated for 30 min with 0.3 mM LLOME or incubated with endotoxin-contaminated or endotoxin-free OVA for 4h, before fixation and galectin-3 intracellular staining. Images shown were acquired with a confocal microscope equipped with 100X objective. Frequencies in right panel display the results of $n = 3$ (LLOME and endotoxin-contaminated OVA) or $n = 2$ (endotoxin-free OVA) independent experiments. (c) Intracellular compartments of cDC1 or cDC2 purified from B16-FLT3L-injected mice were isolated by subcellular fractionation and analyzed by mass spectrometry. ESCRT-III components found on the various compartments are shown. Values below 0.4 represent enrichment in endocytic compartments of cDC2, while above 0.4 show enrichment in endocytic compartments of cDC1. * indicates the references used for fraction purity controls. RSC was calculated as in (Segura et al., 2010)

Results

Increased damage in intracellular compartments of cross-presenting cDCs correlates with enhanced ESCRT-III recruitment in this subset's endolysosomes

It was previously shown that CD8⁺ cDC1 cross-present antigen more effectively than CD11b⁺ cDC2 at steady state (Pooley *et al.*, 2001; Schnorrer *et al.*, 2006), partly owing to their higher capacity to export antigens into the cytosol (Imai *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2008). To confirm these findings, we used another experimental approach, namely the β -lactamase assay for antigen export to the cytosol. Briefly, cDCs were fed with β -lactamase for 1, 3 or 5 h and then loaded with CCF4, a cytosolic β -lactamase substrate emitting green fluorescence due to FRET between its two constitutive subunits. When β -lactamase is efficiently transported from intracellular compartments to the cytosol, it cleaves CCF4, thereby disrupting the FRET signal and resulting in the emission of blue fluorescence. Ratio between blue and green fluorescence was then measured by flow cytometry as a read-out for antigen export to the cytosol. Similar to previous findings, this assay also shows that cDC1 export antigens to the cytosol more efficiently than cDC2 (Figure R.1.1A).

To get initial insights into the mechanisms underlying this functional specialization, we monitored the possible occurrence of endomembrane rupture events by labeling purified splenic dendritic cells with galectin-3. This cytosolic lectin enters endocytic compartments in the event of damage, thereby serving as a marker for endocytic leakage (Aits *et al.*, 2015). At steady state (DMSO control condition), cDC1 display significantly higher amounts of galectin-3 *foci* than their cDC2 counterparts (Figure R.1.1B, Figure RS.1.1A and RS.1.1B), thus suggesting that cross-presenting dendritic cells undergo superior endolysosomal rupture events. Although cDC1 show increased expression of galectin-3, as compared to cDC2 (Figure RS.1.1C), the absence of correlation at the cell level between galectin-3 fluorescence intensity and the number of *foci* (Figure RS.1.1D) suggests that the observed differences in galectin-3 *foci* numbers between cDC1 and cDC2 are not solely due to variations in galectin-3 expression. Furthermore, the greater occurrence of endolysosomal damage in cDC1 was confirmed, and even exacerbated, after incubation of splenic dendritic cells with L-Leucyl-L-leucine methyl ester (LLOME) (Figure R.1.1B and Figure RS.1.1A), a drug causing endolysosomal membrane rupture

subsequent to cathepsin C cleavage in lysosomes (Aits *et al.*, 2015; Maejima *et al.*, 2013; Repnik *et al.*, 2017). This observation cannot be explained by discrepant cathepsin C levels, since cDC1 and cDC2 equally express this protease (Luber *et al.*, 2010). Interestingly, cDC2 display elevated levels of cell death upon LLOME treatment, but this sole parameter seems insufficient to account for differences in galectin-3 patterns (Figure RS.1.1E). Indeed, cDC1 also display increased galectin-3 *foci* formation at steady-state or after 4h culture of cells with the model antigen ovalbumin (OVA) (Figure R.1.1B and RS.1.1A), conditions where no differences in viability are observed. Remarkably, the endotoxin contamination status of OVA, known to modulate the efficiency of cross-presentation (as shown later in this study, in Figure R.1.6F), also influences the appearance of galectin-3 *foci*. As shown in Figure R.1.1B and RS.1.1A, endotoxin-contaminated OVA increases the frequency of galectin-3 *foci* in cDC1, as compared to treatment with the endotoxin-free form of this antigen. In summary, we show here that the occurrence of endolysosomal damage, reflected by the appearance of galectin-3 *foci*, mirrors the intrinsic capacity of antigens to be cross-presented efficiently as well as the enhanced ability of cDC1 to export and cross-present antigens.

We reasoned that if endolysosomal membrane rupture underlies increased cytosolic antigen export in cDC1, then molecular repair machineries, such as ESCRT-III, should be actively recruited to cDC1 intracellular compartments. Thus, we isolated early endosomes, late endosomes and lysosomes from splenic cDC1 and cDC2 by subcellular fractionation and compared their protein composition using semi-quantitative label-free mass spectrometry (Segura *et al.*, 2009, 2010). As controls, we confirmed that typical markers of each cDC subset, such as Ly75 for cDC1 (Vremec and Shortman, 1997) and CD22 for cDC2 (Edwards *et al.*, 2003) are present in the corresponding subset (Figure R.1.1C, upper panel). At the sole exception of Chmp2a, ESCRT-III subunits are enriched in cDC1 early endocytic compartments (Figure R.1.1C, lower panel), further supporting the notion that more frequent endocytic membrane damages occur in this subset. Of note, Chmp2a is found enriched in late endosomes and lysosomes in cDC1.

Silencing of ESCRT-III proteins enhances antigen export to the cytosol

To directly test a role for ESCRT-III proteins in antigen export to the cytosol, we silenced two ESCRT-III components required for membrane repair (Jimenez *et al.*, 2014; Olmos

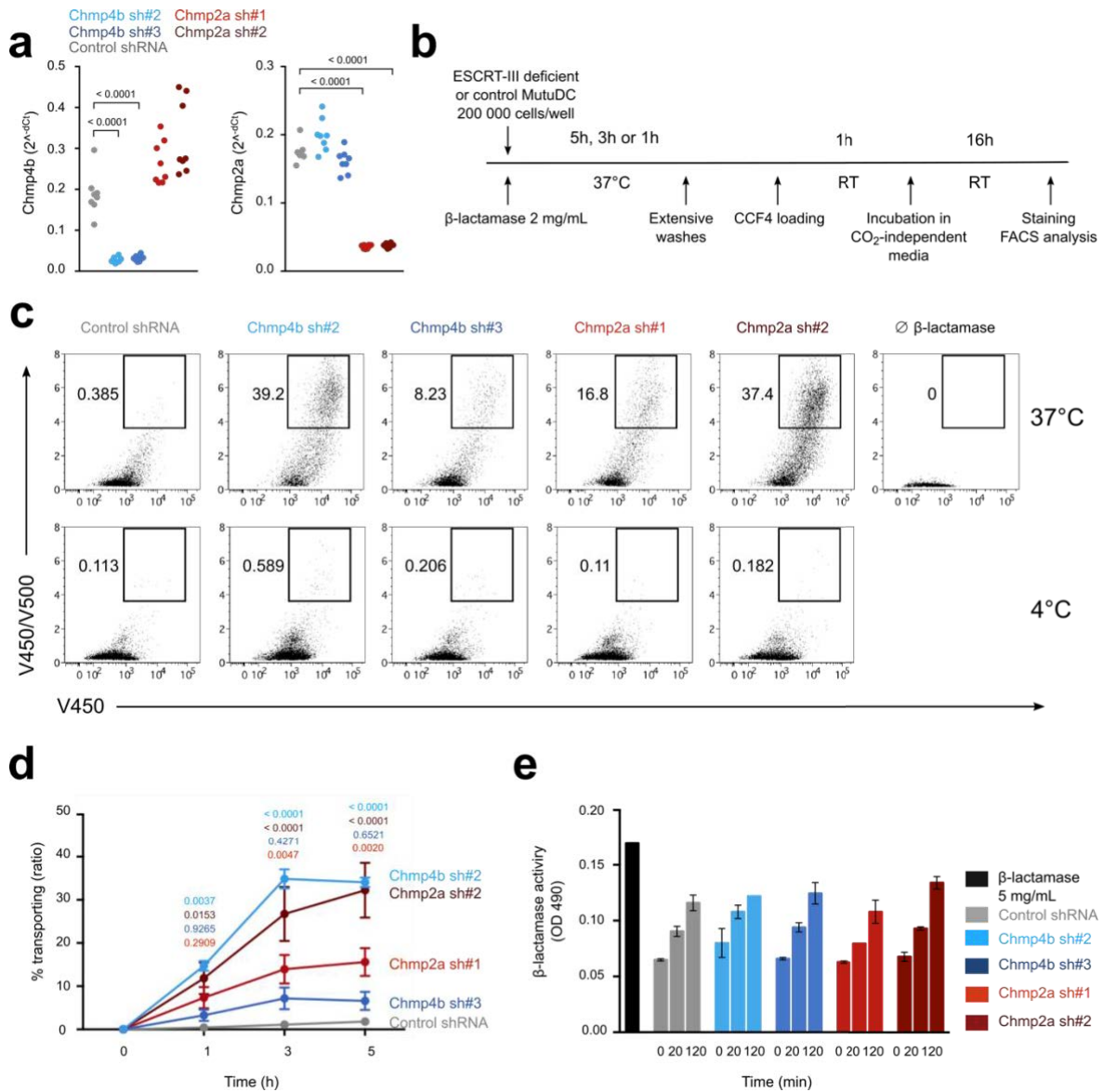


Figure R.1.2.: ESCRT-III-silenced cDCs display increased antigen export to the cytosol

(a) RT-qPCR expression analysis of Chmp4b and Chmp2a in MutuDC expressing the different shRNAs. Data show the result of $n=8$ independent experiments. Exact p-values resulting from Student's t-test are shown. (b) Experiment timeline for β -lactamase assay performed in (c-d). (c-d) ESCRT-III or shRNA control-transduced MutuDC were incubated for 1 to 5h with β -lactamase before loading with the CCF4 FRET-sensitive probe. After overnight incubation, conversion of CCF4 was measured by flow cytometry and quantified in (d). $n = 4$ independent experiments (two-way ANOVA; mean and SEM) Shown are plots observed after 3h of incubation with or without β -lactamase. (e) ESCRT-III deficient or control MutuDC were incubated for 20 min or 2h with 2 mg/mL β -lactamase. Total enzymatic activity was analyzed by spectrophotometry after 1h incubation of lysates with nitrocefin substrate. $n=2$ independent experiments (mean and SEM). Due to two aberrant values, two-way ANOVA could not be performed. Experiment is to be repeated.

et al., 2015; Vietri *et al.*, 2015), namely Chmp4b or Chmp2a in the cDC1 Mutu line (Fuentes Marraco *et al.*, 2012). The latter is derived from splenic cDC1 and shares functional properties with this subset, including selective use of the cytosolic pathway for cross-presentation (as suggested by our unpublished data), contrary to BMDCs that partially target antigens to the vacuolar pathway (Murshid *et al.*, 2010). For each target, we used two different shRNAs (sh#2 and sh#3 for Chmp4b and sh#1 and sh#2 for Chmp2a) that decreased mRNA expression by day 3 post-transduction (Figure R.1.2A). As previously described (Gong *et al.*, 2017b), silencing of Chmp4b or Chmp2a results in spontaneous cell death over time (Figure RS.1.2A), most likely due to unrepaired necroptotic MLKL-associated membrane damage. We therefore performed all functional experiments at day 3 post-transduction, a timepoint that systematically yielded efficient silencing and maintained over 70% viability.

To evaluate the effect of ESCRT-III silencing on antigen export to the cytosol, we used the previously described β -lactamase assay (Figure R.1.2B). As shown in Figure R.1.2C (upper panel) and R.1.2D, Chmp4b and Chmp2a-silenced cDCs export β -lactamase into the cytosol more efficiently than cDCs transduced with a control shRNA. This effect is unlikely due to β -lactamase passive entry through putative unrepaired holes into the plasma membrane, as ESCRT-III-deficient cDCs incubated with β -lactamase for 5h on ice do not show any CCF4 conversion (Figure R.1.2C, lower panel). The higher efficiency of Chmp4b sh#2, as compared to Chmp4b sh#3, may be explained by earlier decrease in Chmp4b mRNA (Figure RS.1.2B), even if the transcript levels at day 3 post-transduction were similar (Figure R.1.2A). Therefore, reduced expression of two different ESCRT-III subunits in cDCs enhances antigen export to the cytosol.

To further investigate the functional consequences of ESCRT-III silencing, we tested whether the higher antigen export efficiency is due to increased antigen uptake. For this purpose, we incubated ESCRT-III-silenced or control cDCs with various concentrations of AF647-labeled OVA for different periods (Figure RS.1.3A, left panel). ESCRT-III-silenced cells endocytose antigens at similar, or even lower rates than control cells (Figure RS.1.3A, right panel), indicating that increased export to the cytosol is not a consequence of increased uptake. Previous studies showed that depletion of Chmp3 (Bache *et al.*, 2006) or Chmp4b (Mamińska *et al.*, 2016) leads to delayed endo-lysosomal fusion following receptor-mediated endocytosis,

whereas degradation of proteins endocytosed by fluid-phase remains unaffected (Bache *et al.*, 2006). To monitor proteasomal or lysosomal degradation, we used BSA-DQ, which emits increased fluorescence when degraded, in the presence or absence of MG-132, a reversible proteasome inhibitor (Figure RS.1.3B). ESCRT-III-silenced cells display reduced degradation, as compared to control cells (Figure RS.1.3C, left panel). Of note, degradation of BSA-DQ, as measured in this assay, is abolished upon treatment with MG-132 (Figure RS.1.3C, right panel), suggesting proteasome dependence (even if we cannot totally exclude some unspecific lysosomal inhibition triggered by MG-132).

To determine whether increased export to the cytosol in ESCRT-III-depleted cells is due to undegraded β -lactamase accumulation in the cytosol, rather than to increased export, we measured export in presence or absence of the proteasome inhibitor. Proteasomal inhibition does not affect CCF4 conversion in control or ESCRT-III-silenced cDCs (Figure RS.1.3D). Furthermore, in the presence of MG-132, ESCRT-III silencing still induces increased export (Figure RS.1.3D), suggesting that changes in β -lactamase degradation by the proteasome do not account for the observed phenotype. As an additional control, the total amount of endocytosed β -lactamase was evaluated enzymatically in total cell lysates, after different times of internalization and subsequent sonication (Figure R.1.2E). The amount of intact β -lactamase is comparable in ESCRT-III-silenced and control DCs, indicating that differences in uptake or enzymatic degradation are unlikely to account for the increased shift in CCF4 conversion observed after ESCRT-III depletion (Figure R.1.2E). Collectively, these results show that ESCRT-III silencing in cDC1 induces a strong increase in the export of soluble endocytic cargo to the cytosol, most likely independently of uptake or degradation.

ESCRT-III-mediated control of antigen export to the cytosol is cell intrinsic

As reported previously in other cells types (Mamińska *et al.*, 2016), ESCRT-III silencing in cDCs triggers NF- κ B activation. CD86 and MHC-II surface expression (Figure RS.1.2C), as well as the production of TNF- α , IL-1 β and RelB transcripts (Figure RS.1.2D), are increased in ESCRT-III-silenced cDCs. To examine whether enhanced antigen export to the cytosol in these cells is a consequence of silencing-mediated cDC activation, we pre-activated ESCRT-III-silenced and control cells with CpG, a TLR ligand to which cDC1 (and MutuDCs) respond strongly (Fuertes Marraco *et al.*, 2012). In comparison with their resting counterparts, CpG-

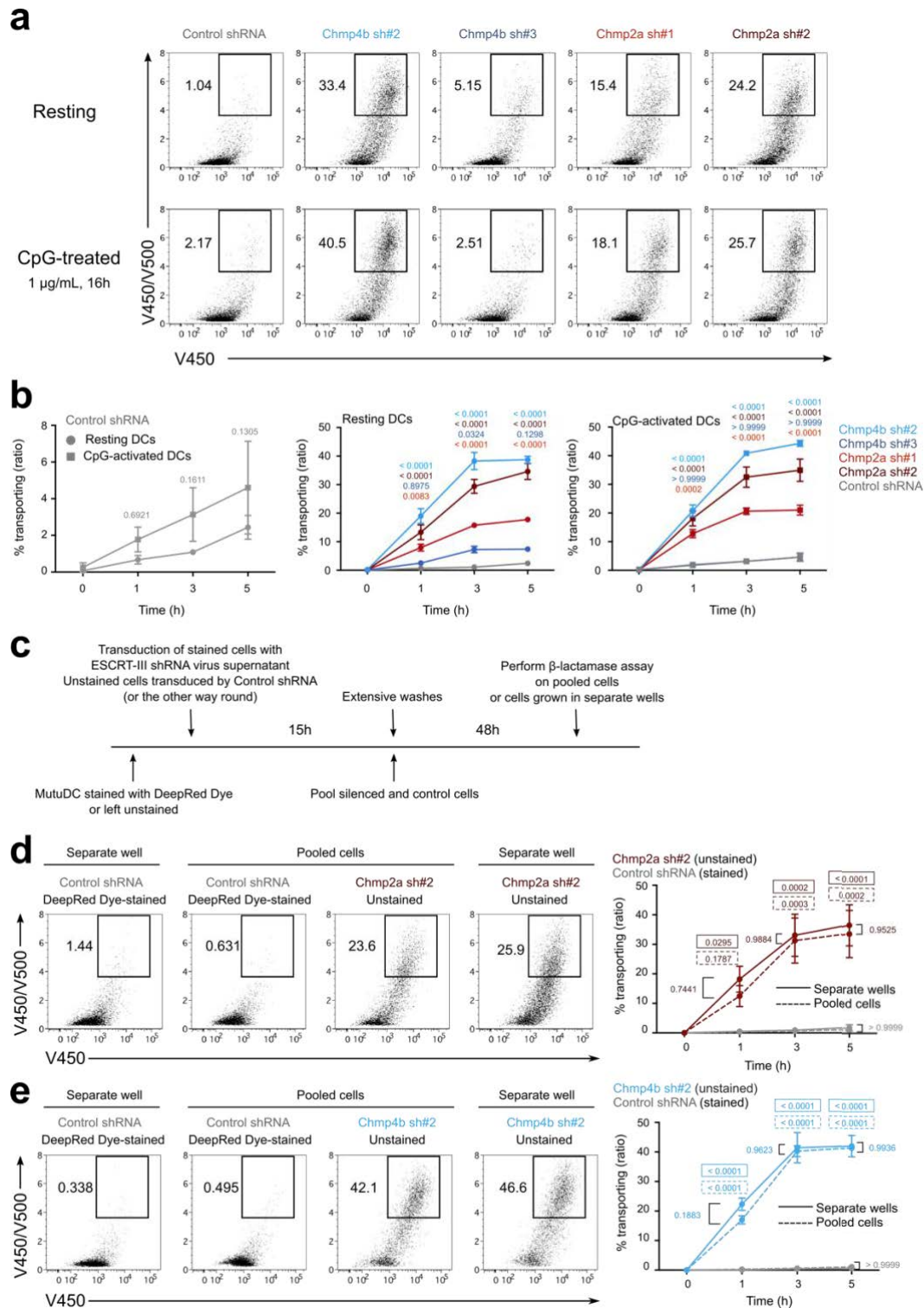


Figure R.1.3.: ESCRT-III-mediated increased antigen export to the cytosol is cell-intrinsic

(a) ESCRT-III or shRNA control-transduced MutuDC pre-activated or not for 16h with CpG were incubated for 1 to 5h with β -lactamase before loading with the CCF4 FRET-sensitive probe. After overnight incubation, conversion of CCF4 was measured by flow cytometry and quantified in (b). $n = 3$ independent experiments. (two-way ANOVA; mean and SEM) Shown are plots observed after 3h of incubation with β -lactamase. (c) Experiment timeline for ESCRT-III intrinsic assay co-culture experiment. (d) Unstained Chmp2a sh#2-silenced and DeepRed Dye-labeled control MutuDC were co-cultured for 2 days or left to grow in separate wells, before β -lactamase assay. Representative plots of cells co-cultured or grown in separate wells are depicted (left panel) and quantified (right panel). (e) Unstained Chmp4b sh#2-silenced and DeepRed Dye-labeled control MutuDC were co-cultured for 2 days or left to grow in separate wells, before β -lactamase assay. Representative plots of cells co-cultured or grown in separate wells are depicted (left panel) and quantified (right panel). $n = 2$ experiments (two-way ANOVA, mean and SEM). Exact p-values depicted into a solid-line box shows comparison between ESCRT-targeting and control shRNA-transduced MutuDC cultured in separate wells, for each timepoint. Exact p-values depicted into a dotted-line box shows comparison between ESCRT-targeting and control shRNA-transduced MutuDC cultured in pooled well, for each timepoint.

treated control cDCs show slightly increased antigen export to the cytosol (Figure R.1.3A and R.1.3B, left panel), but retain poor exporting capacity as compared to ESCRT-III-silenced cells (Figure R.1.3A and R.1.3B, middle panel). As shown in Figure R.1.3A and B (middle and right panel), CpG treatment does not further enhance the robust exporting capacity of ESCRT-III-silenced cells. Similar results were obtained after 16h pre-activation with high molecular weight (HMW) polyI:C (Figure RS.1.4A, RS.1.4B, RS.1.4C and RS.1.4D). Of note, β -lactamase is contaminated with endotoxins and induces cDC activation *per se*, in both silenced and control cDCs (data not shown). Therefore, the increased exporting capacity of ESCRT-III-silenced cells is unlikely to be a direct consequence of NF- κ B activation.

If the effect of ESCRT-III silencing on export to the cytosol is due to reduced endosomal membrane repair, it should be intrinsic to individually silenced cDCs, while if it is related to cDC activation, it could be mediated by secreted factors. To address this question, we co-cultured MutuDCs silenced for Chmp4b or Chmp2a together with control cells, labeled or not with a cytosolic dye so that they could be distinguished by flow cytometric analysis. At day 3, we performed the β -lactamase assay on cells pooled on day one post-transduction or on cells cultured in separate wells (Figure R.1.3C). For each ESCRT-III subunit, we chose the most efficient targeting shRNA, in order to maximize activation and secretion of cytokines in the cell media. After co-culture with Chmp4b or Chmp2a-deficient cells, control cells display a shift in CD86 and MHC-II surface expression, as compared to control cells cultured in separate wells (Figure RS.1.5A and RS.1.5B), indicating that silenced cDCs secrete soluble factors that can activate control bystander cDCs. Despite exposure to ESCRT-III depletion-induced inflammatory cytokines, co-cultured control cDCs retain poor exporting capacity (Figure R.1.3D and R.1.3E), indicating that enhanced export to the cytosol in ESCRT-III-silenced cDCs is cell-intrinsic.

Together, these results demonstrate that NF- κ B activation observed in ESCRT-III-deficient cells is not sufficient to account for the strong enhancement of cytosolic antigen export. This further supports the notion that ESCRT-III controls cytosolic export of antigens in a cell-intrinsic fashion.

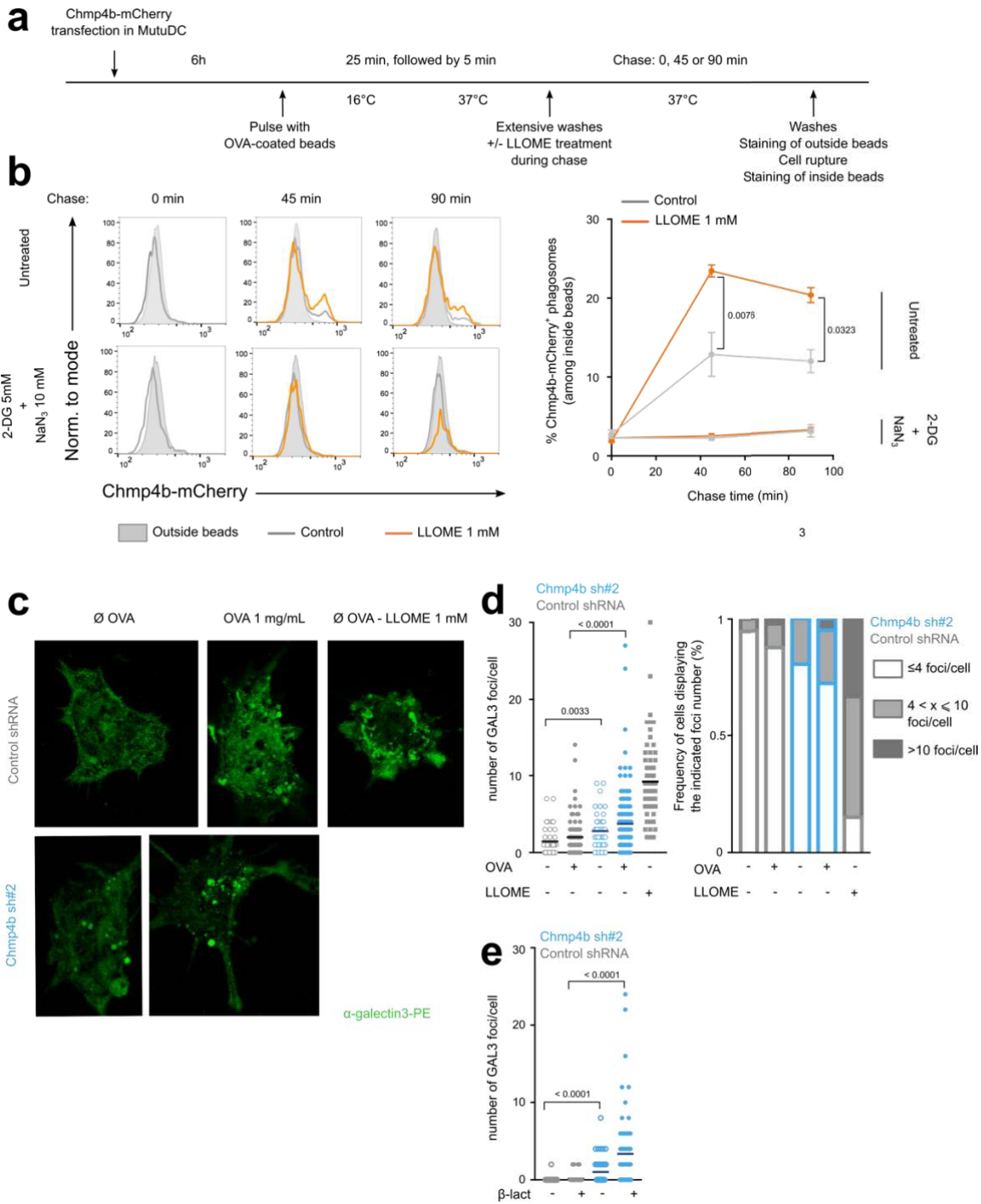


Figure R.1.4.: ESCRT-III is recruited to damaged intracellular compartments and limits antigen export to the cytosol

(a) Experiment timeline for PhagoFACS represented in (b). (b) Chmp4b-mCherry-transfected MutuDC were pulsed with OVA-coated beads for 25 min and chased for various timepoints, in presence or absence of LLOME, in presence of ATP or under ATP-deprived conditions. Recruitment of Chmp4b-mCherry on phagosomes was evaluated by flow cytometry. Plots representative of 2 experiments are shown in left panels. Results plotted on right panel are representative of at least 2 independent experiments (two-way ANOVA, mean and SEM). (c) Chmp4b-silenced or control cells were incubated for 45min with or without OVA-AF647 before fixation and galectin-3 staining. Images representative of 2 independent experiments are shown. Exact p-values obtained with Mann-Whitney t-test are depicted. Number of galectin-3 foci per cell was quantified in (d). Alternatively, Chmp4b-silenced or control cells were incubated for 3h with or without β -lactamase, $n = 1$. Number of galectin-3 foci per cell is quantified in (e). Exact p-values obtained with Mann-Whitney t-test are depicted.

ESCRT-III is recruited to endocytic compartments to repair damages

Seeking to identify the cellular mechanism underlying ESCRT-III-mediated restriction of cytosolic export, we hypothesized it could occur *via* repair of endolysosomal membranes. Importantly, recent studies revealed that ESCRT-III components are key players in repairing damaged membranes of the endolysosome (Radulovic *et al.*, 2018; Skowyra *et al.*, 2018). To investigate ESCRT-III recruitment to cDCs at steady state or following endolysosomal damage, we transfected MutuDC with Chmp4b-mCherry and monitored the recruitment of Chmp4b to phagosomes by PhagoFACS as described previously (Hoffmann *et al.*, 2016). Transfected cDCs were pulsed with OVA-coated beads as indicated (Figure R.1.4A, Figure RS.1.6A), and chased for various timepoints either in the presence or absence of LLOME. As shown in Figure R.1.4B, in the absence of LLOME, Chmp4b is recruited to approximately 13% of OVA-containing phagosomes. Notably, recruitment is further increased to over 20% of mCherry-positive phagosomes by treatment with LLOME, a result concordant with previous reports (Radulovic *et al.*, 2018; Skowyra *et al.*, 2018). Moreover, ESCRT-III recruitment to phagosomes is dependent on phagosome maturation, as it is completely abolished upon ATP deprivation with 2-DG and NaN₃ (Figure R.1.4B, Figure RS.1.6B). These results further connect ESCRT-III recruitment at sites of damage to endocytic compartments.

Likewise, increased cytosolic export in ESCRT-III-depleted cells suggests that the absence of ESCRT-III triggers endolysosomal damage in cDCs. To investigate this possibility, we labeled Chmp4b-silenced or control MutuDCs with galectin-3, after incubation in the presence or absence of OVA (Figure R.1.4C and R.1.4D) or β -lactamase (Figure R.1.4E). While control cells show diffuse, cytosolic galectin-3 distribution, Chmp4b-silenced cells display intense galectin-3⁺ *puncta* (Figure R.1.4C, R.1.4D and R.1.4E), that resemble those observed after addition of LLOME (Figure R.1.4C, upper right panel). The appearance of galectin-3⁺ *foci* in Chmp4b-silenced cells confirms that ESCRT-III is indeed required to repair intracellular compartments and protect them from deleterious damage. We conclude that ESCRT-III is recruited to repair damaged intracellular compartments and thereby restricts antigen export to the cytosol.

Interestingly, when control or Chmp4b-depleted cells are incubated with antigens that contain endotoxin (OVA-AF647 or β -lactamase), galectin-3⁺ *puncta* formation is enhanced (Figure

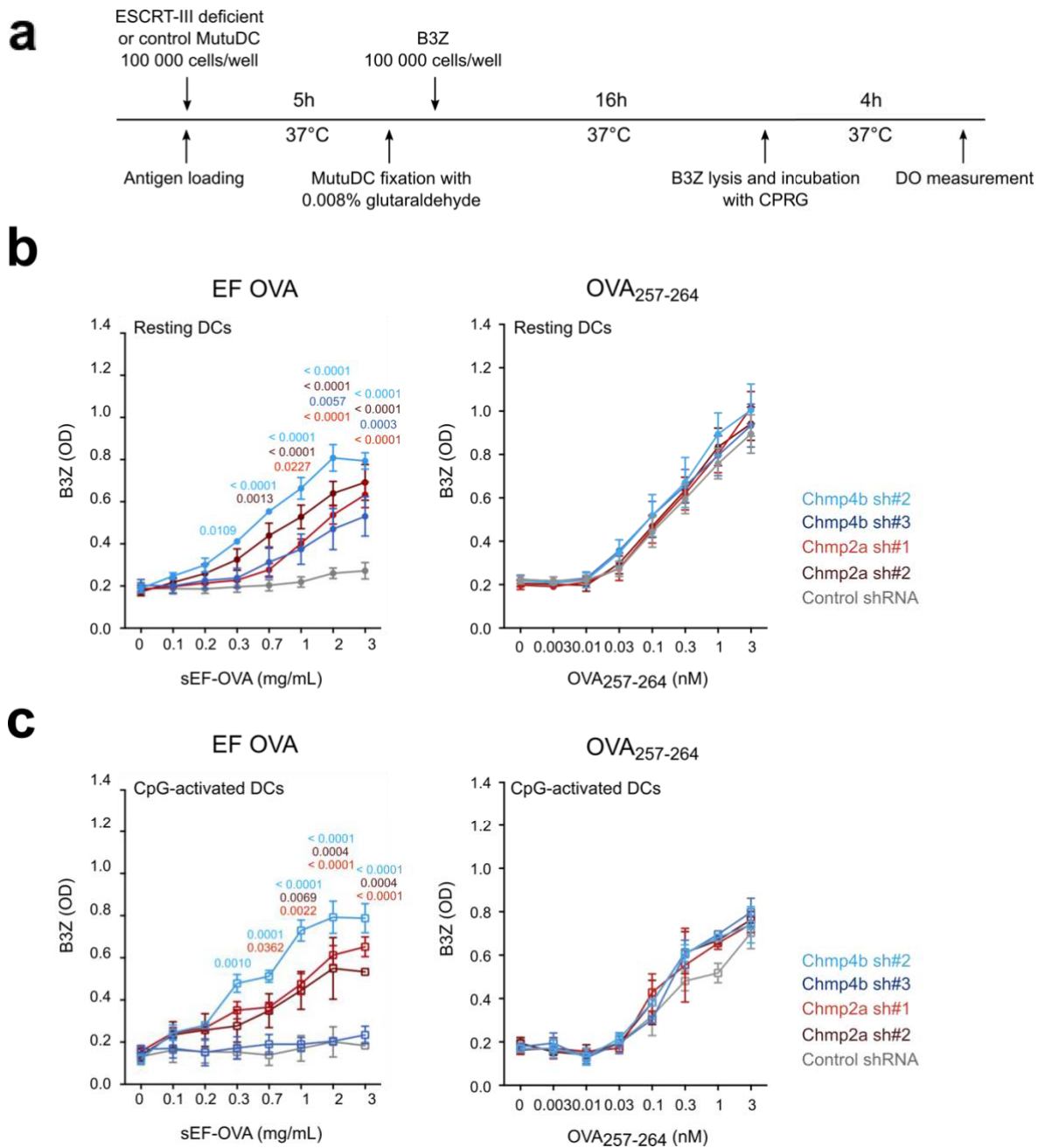


Figure R.1.5.: ESCRT-III silencing enhances cross-presentation

(a) experiment timeline used for B3Z assay. (b-c) Resting (b) or CpG-activated (c) ESCRT-deficient or control MutuDC were incubated for 5h with sEF-OVA (left panel) or OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (right panel) before fixation. Cross-presentation efficiency of cDCs was measured by co-culture with B3Z cells after 16h. Graphs represent the result of at least three independent experiments (b) or two-independent experiments (c). (two-way ANOVA; mean and SEM. For all panels, only exact p-values < 0.05 are shown, for clarity reasons).

R.1.4D and R.1.4E, respectively), suggesting that endolysosomal membrane rupture is modulated by endotoxins present in antigen formulation.

Antigen cross-presentation is enhanced in ESCRT-III-silenced dendritic cells

To explore whether the increased damage to endocytic membranes and cytosolic export observed following ESCRT-III silencing is associated with enhanced cross-presentation, we used the OVA-specific B3Z CD8⁺ T cell hybridoma (Karttunen *et al.*, 1992). We incubated ESCRT-III-silenced or control MutuDCs with soluble (sEF-OVA) or bead-coated endotoxin-free OVA or with the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide, as a control for MHC-I expression. MutuDCs were then fixed and B3Z activation was monitored (Figure R.1.5A). While control cDCs fail to cross-present sEF-OVA or bead-bound EF-OVA efficiently, ESCRT-III-deficient cDCs show a strong enhancement of soluble or bead-coated EF-OVA cross-presentation (Figure R.1.5B, left panel and Figure RS.1.7A). Interestingly, silencing with the different shRNAs leads to different levels of increased sEF-OVA cross-presentation, remarkably mirroring the effects of the respective shRNA on cytosolic export (compare with Figure R.1.2B). Despite slight variations in MHC-I surface expression in cells silenced with Chmp4b sh#2 and Chmp2a sh#2 (Figure RS.1.7B and RS.1.7C), the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide, which does not require processing, is presented with equal efficiencies by control or ESCRT-III-silenced cDCs (Figure R.1.5B, right panel). Additionally, MutuDCs pre-activation with CpG (Figure R.1.5C) or HMW polyI:C (Figure RS.1.4E) shows no (Figure R.1.5C) or little (Figure RS.1.4E) increase of sEF-OVA cross-presentation in control cells, suggesting that NF- κ B induction plays little role in enhancing cross-presentation in this model. We conclude that ESCRT-III is a negative regulator of antigen cross-presentation.

ESCRT-III silencing enhances T cell cross-priming *in vivo*

Next, to determine whether ESCRT-III silencing could affect MHC-II antigen presentation, we repeated our previous assay with OT-II T cells (OVA-specific CD4⁺ TCR-transgenic T cells) (Figure R.1.6A). As shown in Figure R.1.6B, the presentation of sEF-OVA to OT-II CD4⁺ T cells remains unaffected by ESCRT-III depletion, while a tendency to increased presentation of OVA₃₂₃₋₃₃₉ control peptide by ESCRT-III-silenced cDCs may reflect their higher MHC-II expression (Figure RS.1.2C). In contrast and similar to what has been previously shown in B3Z

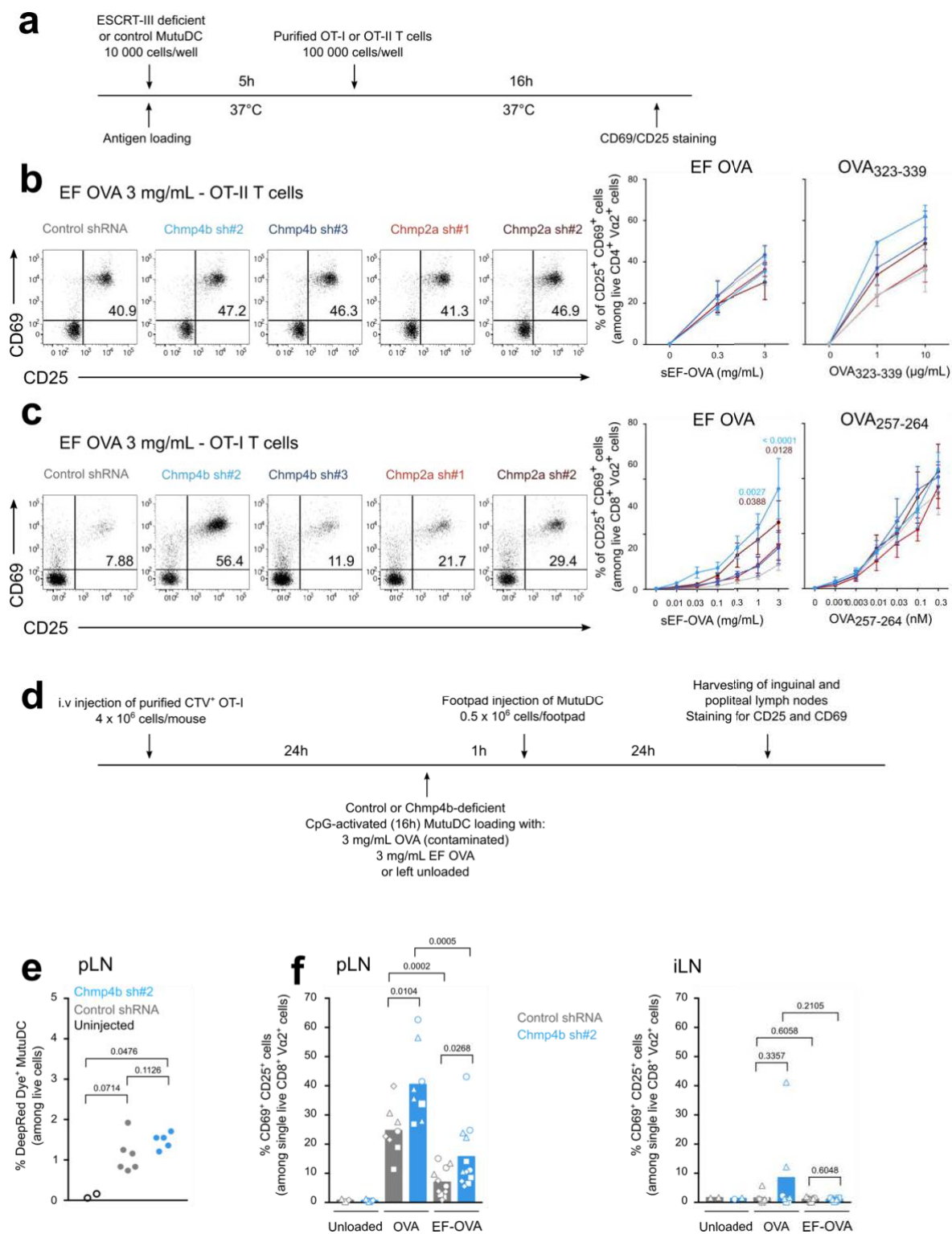


Figure R.1.6.: ESCRT-III controls cross-presentation both *in vitro* and *in vivo*

(a) experiment timeline used for OT-I and OT-II presentation assays. (b-c) ESCRT-deficient or control MutuDCs were incubated for 5h with EF-OVA (left panel) or OVA₃₂₃₋₃₃₉ or OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptides (right panel). Cross-presentation efficiency of cDCs was measured by CD69 and CD25 expression on OT-II (b) or OT-I (c) T cells after 16h of co-culture. Shown are pooled data from $n = 3$ experiments. (two-way ANOVA; mean and SEM. In (b) and (c), only exact p-values < 0.05 are shown, for clarity reasons) (d) experiment timeline used for the *in vivo* cross-priming assay. (e) DeepRed Dye-labeled Chmp4b-silenced or control MutuDC were injected into the footpad. 24h after injection, the proportion of injected MutuDC in the popliteal draining lymph node was analyzed by flow cytometry. $n = 2$. P-values resulting from a Mann-Whitney test are shown. (f) Proportion of CD69+ CD25+ live OT-I T cells was measured in the popliteal draining (f: left panel) or inguinal non-draining lymph node (f: right panel) 24h after Chmp4b-silenced or control MutuDC injection in the footpad. Graph show the result of four independent experiments represented by different symbols on the graphs (mean, Mann-Whitney t-test).

T cells, cross-presentation of soluble EF-OVA to OT-I (OVA-specific CD8⁺ TCR-transgenic T cells) is increased in ESCRT-III-depleted cells, relative to control cells (Figure R.1.6C), highlighting again the crucial role of ESCRT-III in this process.

We next sought to investigate the capacity of ESCRT-III-silenced cDCs to cross-prime CD8⁺ T cells *in vivo*. For this purpose, following adoptive transfer of OT-I T cells, ESCRT-III-silenced or control cDCs, loaded or not with sEF-OVA or endotoxin-contaminated OVA, were injected in the footpad. The next day, popliteal draining lymph nodes (pLN) and inguinal non-draining lymph nodes (iLN) were harvested and OT-I cells were stained for CD69 and CD25 to monitor cross-priming *in vivo* (Figure R.1.6D). Chmp4b-silenced and control MutuDC displayed similar migratory capacities to the popliteal lymph node (Figure R.1.6E). In addition, no differences in frequencies of CD8⁺ OT-I T cells, both in the popliteal and inguinal lymph nodes, were detected on the day of sacrifice (Figure RS.1.7D and RS.1.7E). As an additional control, we also examined OT-I CD8⁺ T cells in the non-draining inguinal lymph node and observed no CD8⁺ T cell activation (Figure R.1.6F, right panel). In the popliteal draining lymph node, Chmp4b-deficient cells show increased cross-priming ability as compared with control shRNA-transduced cells (Figure R.1.6F, left panel). These findings highlight the importance of ESCRT-III as a critical regulator of cross-presentation both *in vitro* and *in vivo*.

Inhibition of necroptotic pathways impairs the enhancement of antigen export to the cytosol mediated by ESCRT-III silencing

To decipher the molecular bases of endomembrane rupture events responsible for antigen export to the cytosol, we decided to explore the possible involvement of cell death pathways. Indeed, ESCRT-III prevents necroptotic cell death by excising portions of the plasma membrane damaged by MLKL oligomers (Gong *et al.*, 2017b). Consequently, impairment of ESCRT-III repair function not only results in unrepaired membrane lesions but may also lead to MLKL pore persistence at plasma membrane. In agreement with these previously published results (Gong *et al.*, 2017b), we confirm that ESCRT-III silencing results in necroptosis, as reflected by increased cellular levels of active phospho-MLKL (Figure R.1.7A). Aside from necroptosis, cleavage of caspase-3, caspase-8, Parp (Figure RS.1.8A, left panel) and of gasdermin-D, caspase-1 and caspase-11 (Figure RS.1.8A, right panel) respectively demonstrate parallel induction of apoptosis and pyroptosis (Rühl *et al.*, 2018). Interestingly, the latter

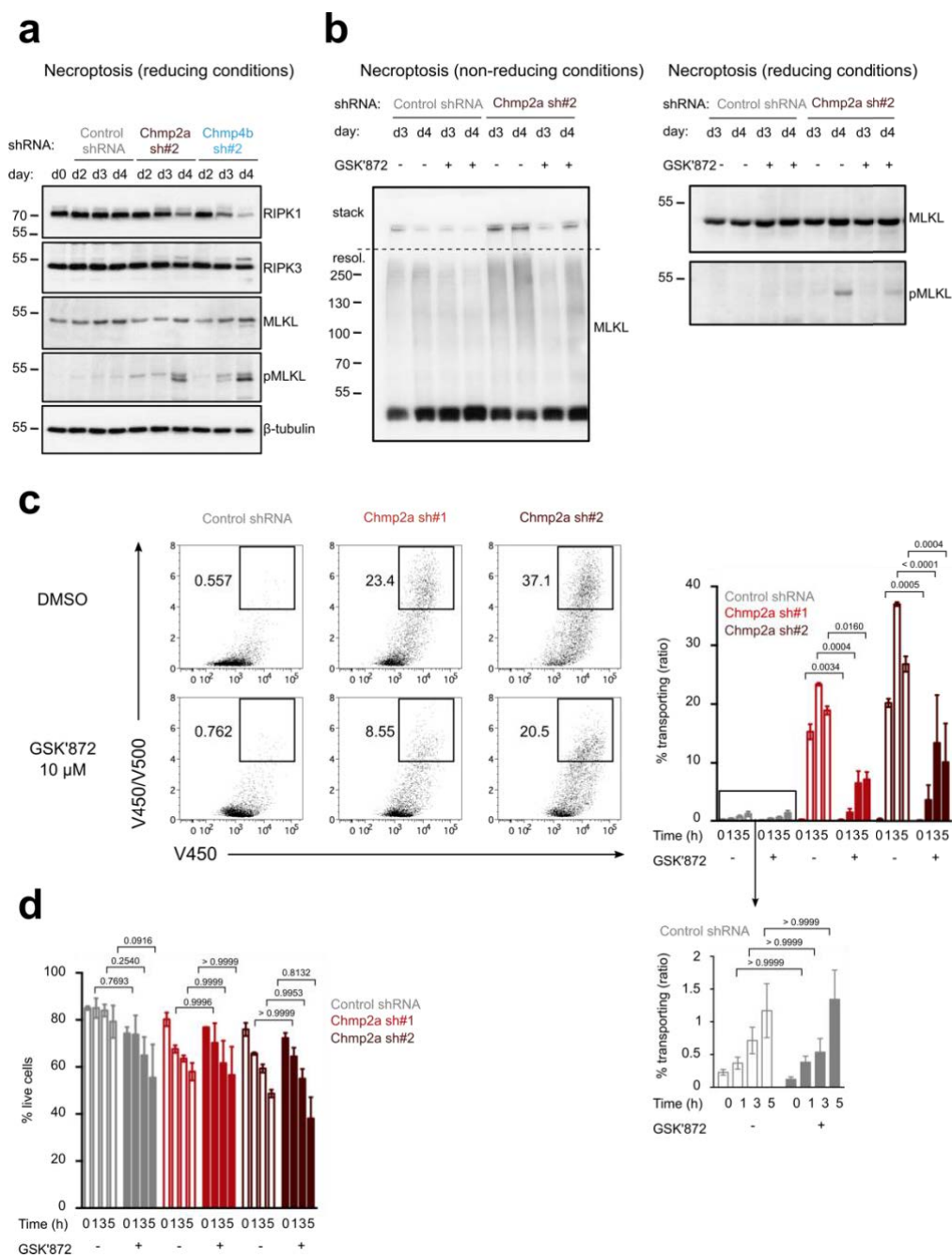


Figure R.1.7.: RIPK3 inhibition restricts antigen export to the cytosol in ESCRT-III-deficient dendritic cells

(a) ESCRT-III-silenced and control MutuDC were lysed at different times post-transduction and induction of necroptotic mediators was assessed by immunoblotting. Data are representative of 2 independent experiments. (b) At day 2 post-transduction, Chmp2a-silenced and control MutuDC were treated with 10 μ M GSK'872 or equivalent amounts of DMSO as control and lysed at different days post-transduction. Immunoblotting was performed under non-reducing conditions (left panel) to assess the presence of MLKL oligomers or under reducing conditions (right panels), to detect MLKL and phospho-MLKL monomers. $n = 1$. (c-d) Chmp2a-silenced or control MutuDC treated or not with 10 μ M GSK'872 at day 2 post-transduction were incubated for 1 to 5 h with β -lactamase before loading with the CCF4 FRET-sensitive probe. After overnight incubation, conversion of CCF4 (c) and viability (d) were measured by flow cytometry and quantified. GSK'872 was maintained in media during the whole course of the assay. $n = 2$ independent experiments (two-way ANOVA, mean and SEM). Representative plots of 3 h incubation with β -lactamase are depicted.

pathways are induced only at day 4 post-transduction, while MLKL oligomers appear sooner, as early as d3 post-transduction (Figure R.1.7B, left panel “stack” line), when cell viability among the different conditions remains at 70%. These results suggest: 1) that the pore-forming function of MLKL precedes the onset of cell death by at least 24h and 2) that necroptosis might be the primary pathway leading to cell death following ESCRT-III silencing.

Considering that MLKL also assembles on endomembranes (Frank *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2017), we hypothesized that ESCRT-III may also fulfill its damage-excising function there, limiting endomembrane rupture and subsequent antigen export to the cytosol. To test this possibility, we took advantage of GSK’872, a pharmacological inhibitor of RIPK3 (Mandal *et al.*, 2014). Indeed, by inducing a phosphorylation-dependent conformational change in MLKL (Hildebrand *et al.*, 2014), the RIPK3 kinase governs the acquisition of MLKL pore-forming activity and therefore regulates necroptosis. Strikingly, treatment of Chmp2a-silenced MutuDCs with GSK’872 decreases the formation of MLKL oligomers (Figure R.1.7B, left panel), as well as MLKL phosphorylation (Figure R.1.7B, right panel), thus revealing efficient and selective blockade of RIPK3 kinase function, since other cell death pathways were not affected (Figure RS.1.8B). Functionally, GSK’872 did not rescue the viability of ESCRT-III-deficient MutuDC, but dramatically impaired their ability to export antigens into the cytosol, compared to RIPK3-competent cells (Figure R.1.7C and R.1.7D), uncoupling the cytosolic antigen export and cell death phenotypes in ESCRT-III-silenced cells. Collectively, these results reveal shared mechanisms between necroptotic and cross-presentation pathways, suggesting that ESCRT-III-mediated repair of endomembrane-targeted necroptotic damages restrains antigen export to the cytosol.

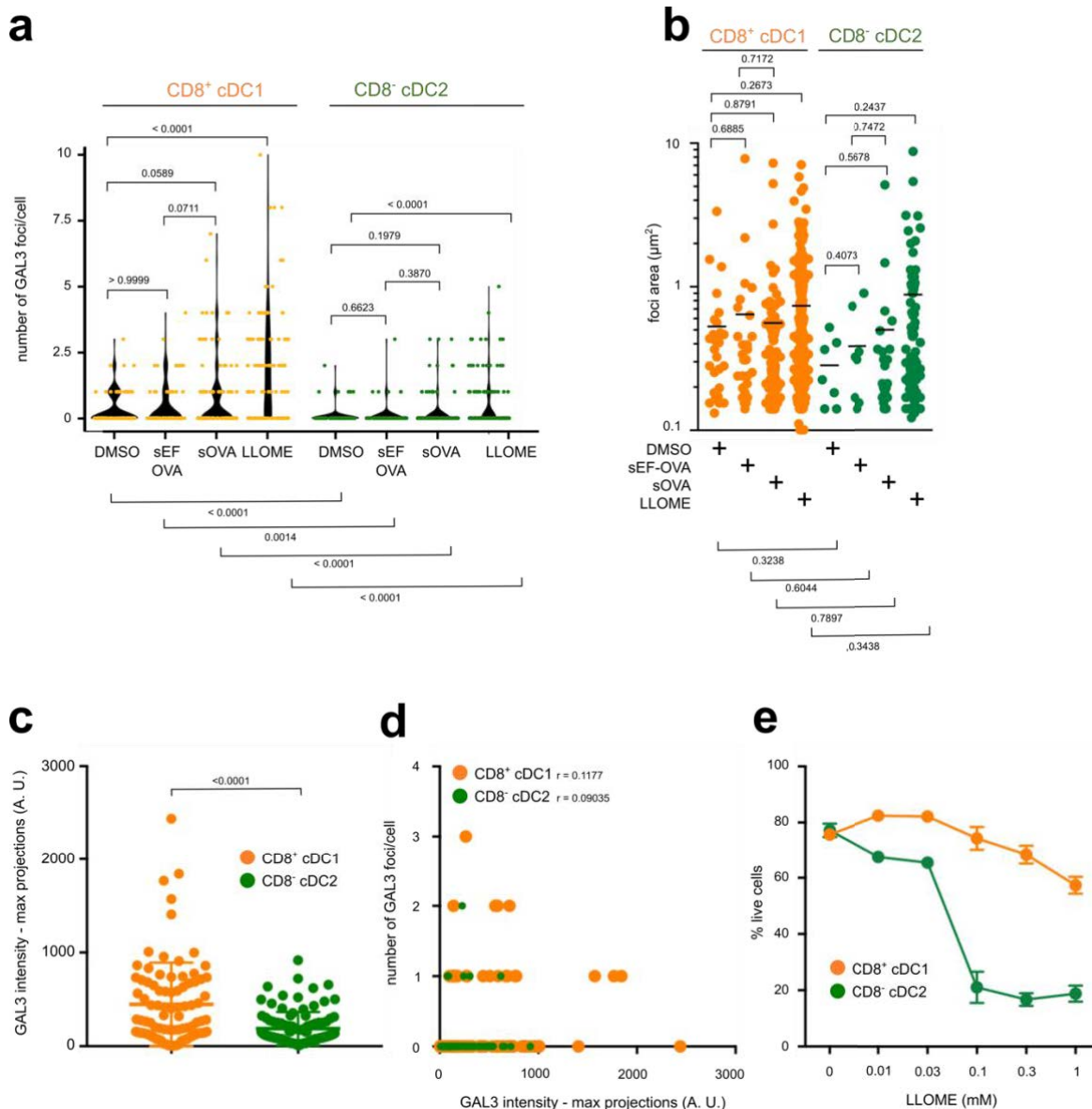


Figure RS.1.1., related to Figure R.1.1.: Characterization of galectin-3 damages in cDC1 and cDC2 splenic dendritic cells

(a-b) Splenic dendritic cells were purified and treated for 30 min with 0.3 mM LLOME or incubated with endotoxin-contaminated or endotoxin-free OVA for 4h, before fixation and galectin-3 intracellular staining. Macro quantification of the number of galectin-3 *foci* (a) and of *foci* area (b) display the results of $n = 3$ (LLOME and endotoxin-contaminated OVA) or $n = 2$ (endotoxin-free OVA) independent experiments. Exact p-values obtained after a Mann-Whitney test are depicted. (c) Quantification of galectin-3 fluorescence intensity in cDC1 and cDC2 in DMSO condition is shown. $n = 4$ independent experiments (Student's t-test, mean). (d) Correlation between galectin-3 intensity and number of *foci* displayed by cDC1 and cDC2 under DMSO condition. $n = 4$ independent experiments (Pearson correlation test). (e) Purified splenic dendritic cells were incubated with various concentrations of LLOME for 30 min. Viability of both dendritic cell subsets was analyzed by flow cytometry. $n = 1$ to 5 independent experiments (mean and SEM).

Discussion

Understanding how cDCs export antigens from intracellular compartments to the cytosol during cross-presentation has been a major challenge for immunologists since the discovery of this process, over twenty years ago (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995). The best evidence available pointed so far to a role of the Sec61 translocon in the transport of extracellular antigen into the cytosol, and by extension, in cross-presentation (Ackerman *et al.*, 2006; Koopmann *et al.*, 2000; Zehner *et al.*, 2015). Nevertheless, since Sec61 is required for the signal-peptide-dependent import of all membrane proteins into the ER, its inhibition blocks numerous proteins in the cytosol, including MHC-I. It is therefore extremely difficult to exclude indirect effects of Sec61 blocking. An alternative model for antigen export to the cytosol proposes local destabilization of endocytic membranes. In this study, we bring additional evidence supporting the alternative “membrane disruption” hypothesis, in showing that ESCRT-III is recruited to repair disrupted intracellular membranes, thereby regulating antigen export to the cytosol and cross-presentation. A consequent body of literature suggest early endosomes to be the main site for antigen leakage into the cytosol. Interestingly, our results indicate that intracellular damages target not only early endosomes, but also lysosomes in cDC1 (unpublished data), as well as early maturing phagosomes in MutuDCs. Although mostly occurring from compartments with low degradative properties, antigen export may then not only occur from early endosomes. The biophysical properties of the vesicles from which this process is initiated will be very interesting to determine in future studies.

More intriguing and critical to understand the biology of antigen cross-presentation, is the mechanism triggering membrane damage. In this regard, Hidde Ploegh proposed a lipid-based explanation for antigen export to the cytosol (Ploegh, 2007). Indeed, one of the models raised to describe lipid body biogenesis involves the transient formation of bicellar structures, resulting from the fusion of the cytoplasmic and luminal sides of the ER. Severing of these lipid droplets from the ER generates a transient pore in the ER membrane (reviewed in Saka and Valdivia, (2012)). Based on the luminal topology equivalence of the ER and intracellular compartments, one could hypothesize that similar events could mediate cytosolic antigen export from endocytic structures. Along with others, we have shown that Igtg-dependent lipid body accumulation in cDCs correlates with high cross-presentation efficiency (Bougnères *et al.*, 2009),

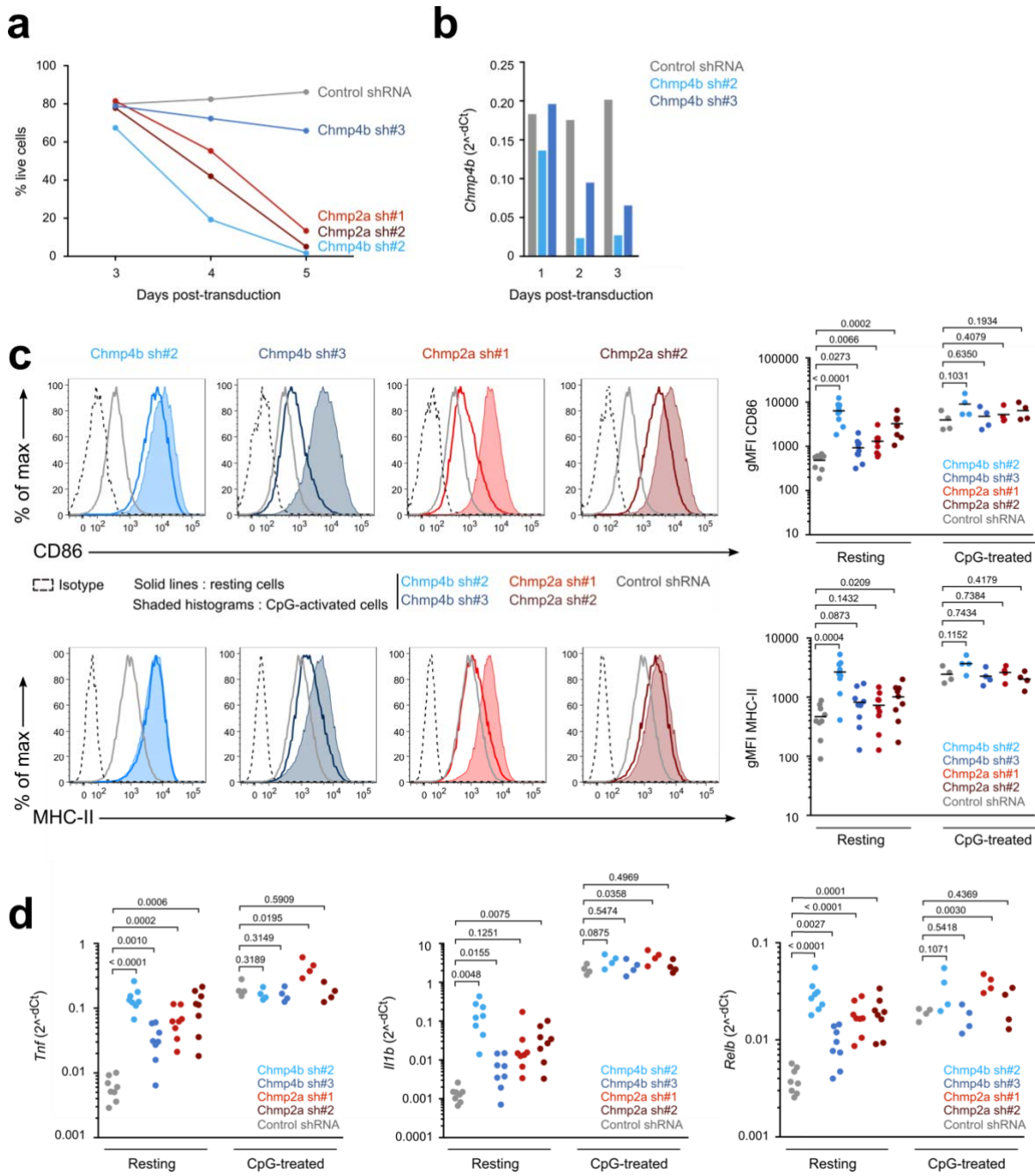


Figure RS.1.2., related to Figure R.1.2.: Phenotype of ESCRT-III silenced cDCs

(a) Viability of ESCRT-III-silenced or control MutuDC over time. $n = 1$. (b) Kinetics for expression of Chmp4b mRNA following virus transduction. $n = 1$ (c) Surface expression of CD86 and MHC-II displayed by resting or CpG-activated ESCRT-III-silenced or control cells (left panels). Quantification of gMFI (*i. e.* gMFI of the indicated marker – gMFI of the corresponding isotype) for at least 4 experiments is shown in right panel. (Student's t-test; mean) (d) NF- κ B activation in resting or CpG-activated ESCRT-III-silenced or control cells is analyzed by qPCR. Quantification of TNF α , IL-1 β and RelB transcripts for at least 4 experiments is shown. (Student's t-test; mean)

possibly by mediating antigen export to the cytosol. However, inconsistent with this hypothesis, pharmacological inhibition of lipid droplet formation proved this process to be dispensable for endosomal leakage of antigens (den Brok *et al.*, 2016). Nevertheless, investigating lipid composition of intracellular membranes may still be instrumental to decipher the nature of the damage-inducing signal. Indeed, a recent study showed that NOX2-mediated ROS production induces lipid peroxidation causing local membrane disruption and endosomal antigen leakage (Dingjan *et al.*, 2016). Along the same line, our previous work demonstrated increased phagosomal NOX2-dependent ROS production in cDC1 (Savina *et al.*, 2009), as compared to their cDC2 counterpart, consistent with the superior frequency of intracellular damages observed in cDC1, reported in the present study. Higher occurrence of damages in cDC1 logically imposes a greater requirement for endocytic repair and correlates with enhanced ESCRT recruitment to intracellular membranes, as described in this work.

Recent biophysical studies provide interesting insights into the molecular mechanisms of membrane rupture related to lipid peroxidation. Peroxidation results in severe lipid conformational changes, characterized by increased membrane curvature that destabilizes bilayers and can ultimately lead to pore formation (Agmon *et al.*, 2018). In addition, high concentrations of oxidized lipids in membranes are associated with higher permeability (Wong-Ekkabut *et al.*, 2007), possibly contributing to the induction of ferroptosis, a form of regulated cell death. While ESCRT-III involvement in repairing ferroptotic pores is unknown, ESCRT-III-mediated shedding of damaged portions of plasma membrane is critical to sustain cell viability following MLKL activation and necroptosis induction (Gong *et al.*, 2017b). Consequently, silencing of Chmp2a or Chmp4b results in spontaneous necroptosis, due to unrepaired necroptotic MLKL-induced plasma membrane damages. Increased antigen leakage in ESCRT-III-deficient cells may not solely derive from passive membrane rupture but could also occur through MLKL pores in unrepaired endolysosomal membranes, as suggested by the present work. Additionally, necroptosis induction is often associated with MLKL-dependent release of mitochondrial ROS (Yang *et al.*, 2018), that may contribute to endomembrane rupture and resulting antigen export to the cytosol. Finally, involvement of necroptosis could also provide insights into the molecular mechanisms triggering cDC activation observed following ESCRT-III silencing. Indeed, oligomerization of RIPK3, a core protein in necroptosis induction, is responsible for RIPK1-dependent activation of NF- κ B (Yatim *et al.*, 2015).

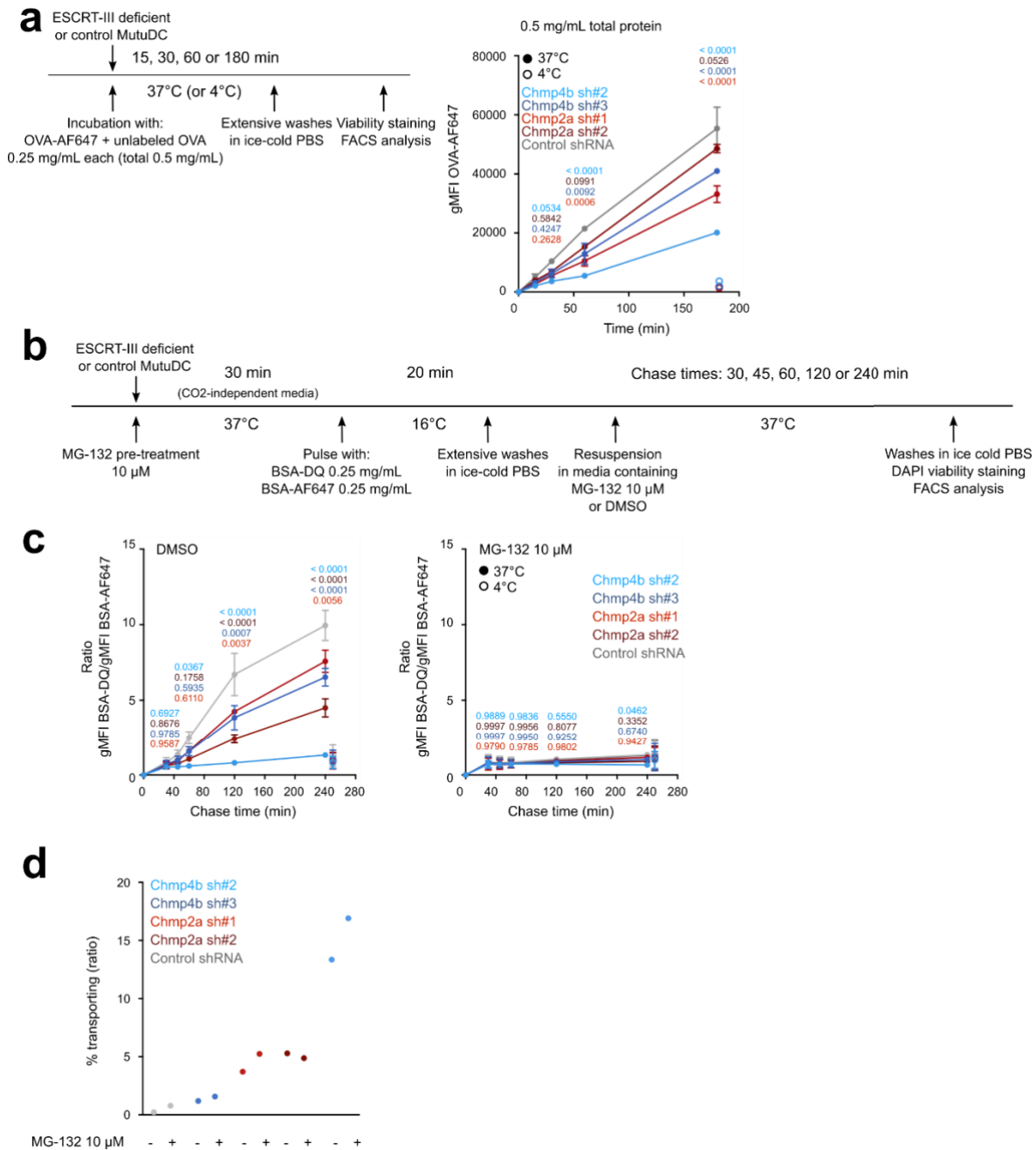


Figure RS.1.3., related to Figure R.1.2.: Defects in antigen degradation in ESCRT-III-silenced cells are unlikely to account for the increased exporting phenotype

(a) experiment timeline for OVA-AF647 uptake assay (left panel). After various times of incubation with OVA-AF647 + unlabeled OVA, antigen uptake by ESCRT-III-silenced or control MutuDC was analyzed by flow cytometry (right panel). $n = 2$ independent experiments (two-way ANOVA, mean and SEM). (b) experiment timeline for BSA-DQ assay. (c) ESCRT-silenced or control MutuDC were pulsed for 20 min with BSA-DQ + BSA-AF647 in presence or absence of MG-132. After chase timepoints in presence or absence of MG-132, cells were stained with DAPI and degradation was measured by flow cytometry. Ratio of gMFI for BSA-DQ and gMFI for BSA-AF647 (internal uptake control) is represented in (c). $n = 2$ independent experiments (two-way ANOVA, mean and SEM). (d) ESCRT-silenced or control MutuDC were pre-treated with or without MG-132 before incubation with β -lactamase. After CCF4 loading and overnight incubation in CO₂-independent media, CCF4 conversion, reflecting antigen export to the cytosol, was measured by flow cytometry. Due to high mortality for 3h or 5h incubation with β -lactamase and MG-132, plots for 1h incubation are shown and quantified. $n = 1$.

Therefore, genetic ablation of RIPK3 or MLKL may not only demonstrate their involvement in antigen export to the cytosol, but also help dissociate silencing-mediated enhanced antigen export from cDC activation.

In this study, we addressed the issue by pre-activating ESCRT-III-competent cDCs for 16h with TLR ligands, to mimic sustained NF- κ B activation observed in ESCRT-III-silenced cDCs. Under these conditions, antigen export was not greatly enhanced, suggesting a dispensable role for NF- κ B activation in enhancing export to the cytosol. Previous studies, however, indicated that BMDCs displayed enhanced exporting capacities after acute LPS activation (3-5h) (Gil-Torregrosa *et al.*, 2004). In contrast, BMDCs activated for longer periods of time (16h LPS treatment) displayed similar levels of cytosolic antigen transport as resting BMDCs (Alloatti *et al.*, 2015). Mechanisms underlying this transient increase in exporting efficiency remain largely unknown. Yet, short LPS-stimulation time (1 to 6h) results in a global decrease of ESCRT-0 to ESCRT-III transcript levels (data analyzed Garber *et al.*, 2012) in bone marrow-derived DCs, possibly decreasing endocytic membrane repair and subsequently increasing antigen export into the cytosol, as well as impairing cell viability. Interestingly, the latter hypothesis remarkably correlates with the observed enhanced turnover in cDC1, following LPS challenge (Kamath *et al.*, 2002).

A role of ESCRT-I in antigen export to the cytosol and cross-presentation had been suggested by a previous study, as TSG101 depletion caused an increase in both processes (Zehner *et al.*, 2011). This phenotype, similar to the one described in this study, had been attributed to TSG101's high structural homology with E2-ubiquitin ligases, allowing its binding to ubiquitin residues. However, contrary to E2 enzymes, TSG101 is unable to fulfill the same ubiquitination function and thereby prevents poly-ubiquitination of the mannose receptor, which is required for OVA export to the cytosol. Yet, as TSG101 silencing had been shown to delay, but not abolish, ESCRT-III recruitment to damaged endolysosomes (Skowyra *et al.*, 2018b), repair defects might also contribute to the previously shown phenotype. In contrast and despite their requirement for ubiquitinated cargo sorting in multivesicular bodies (MVBs), ESCRT-II and deubiquitinases AMSH and UBPY are dispensable for biological membrane repair. Interestingly, these proteins were respectively detected in both or not detected in cDC1 and cDC2 in our proteomic dataset, thereby suggesting that the enhanced ESCRT-III

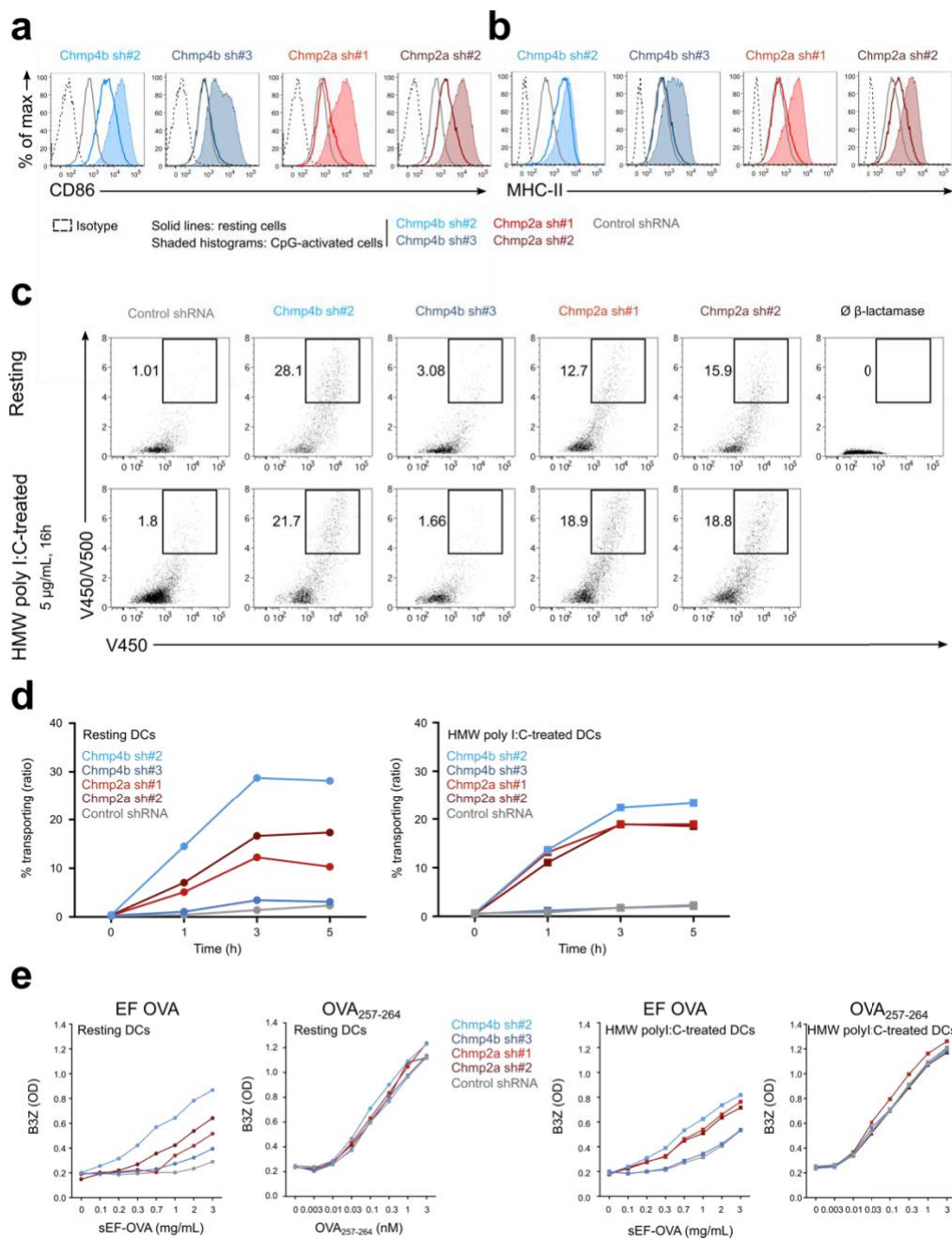


Figure RS.1.4., related to Figure R.1.3. and R.1.5.: Pre-activation of ESCRT-III or control MutuDC with HMW polyI:C does not lead to drastic changes in antigen export to the cytosol or cross-presentation

(a-b) Surface expression of CD86 (a) and MHC-II (b) displayed by resting or HMW polyI:C-activated ESCRT-III-silenced or control cells. (c-d) ESCRT-III or shRNA control-transduced MutuDC pre-activated or not for 16h with HMW polyI:C were incubated for 1 to 5h with β-lactamase before loading with the CCF4 FRET-sensitive probe. After overnight incubation, conversion of CCF4, reflecting antigen export to the cytosol, was measured by flow cytometry. (e) Resting (left panel) or HMW polyI:C-activated (right panel) ESCRT-deficient or control MutuDC were incubated for 5h with EF-OVA or OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide before fixation. Cross-presentation efficiency of cDCs was measured by co-culture with B3Z cells after 16h. n=1.

recruitment in cDC1 endolysosomes likely results from response to damages rather than from intense cargo sorting in MVBs.

In the same line, recruitment of ESCRT-III to damaged endocytic membranes is not a cDC-restricted process, as ESCRT-III was recently reported to repair endocytic membranes in HeLa epithelial cells (Skowrya *et al.*, 2018). Similar to other cell types and membranes, recruitment of ESCRT-III to disrupted cDC endosomes is likely triggered by local Ca²⁺ release sensed by ALG-2, which in turn, facilitates the recruitment of Alix and ESCRT-III (Jimenez *et al.*, 2014; Scheffer *et al.*, 2014; Skowrya *et al.*, 2018). Contrasting with the sequential canonical assembly of ESCRT-0, I and II complexes required for ESCRT-III recruitment and MVB formation (reviewed in Campsteijn *et al.*, (2016)), these complexes (with the exception of TSG101) were not detected at the plasma membrane wounding sites (Jimenez *et al.*, 2014). In the case of endocytic membranes, it was shown that ESCRT-I component TSG101 and accessory protein ALIX were both required for ESCRT-III assembly on damaged lysosomes (Skowrya *et al.*, 2018), thus suggesting a contribution of various pathways to restrict antigen export to the cytosol.

Altogether, our results show that ESCRT-III is a major negative regulator of antigen export to the cytosol and cross-presentation. These results further confirm the importance of ESCRT-III as an ancestral, conserved, non-selective membrane repair complex whose function might have been coopted to tightly and rapidly regulate a crucial immunity pathway.

Author contributions

M.G., M. Bur., D.R., M. Ber. and S.A. designed experiments. M.G., M. Bur., E.S. (Figure R.1.1C), and M. Ber. (Figure R.1.7A, R.1.7B, RS.1.8A and RS.1.8B) performed experiments. M. Bur., N.B., D.R. and M.M. helped for *in vivo* and microscopy experiments. E. K. and R.S. analyzed proteomic experiments (Figure R.1.1C). M.G., M. Bur. and M. Ber. analyzed the data. M.G. and S.A. prepared the figures. M.G. and S.A. wrote the manuscript, with input from all authors. S.A., P.K. and J.V. supervised the project.

The authors declare no conflict of interest.

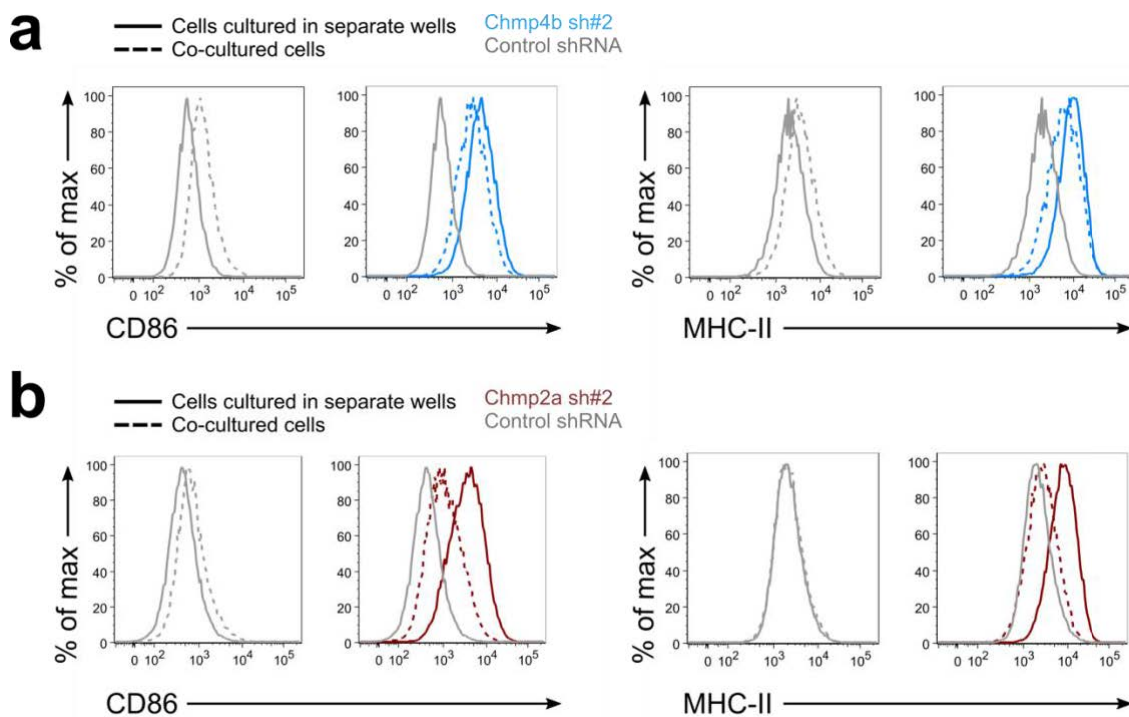


Figure RS.1.5., related to Figure R.1.3.: Phenotype of co-cultured cells

(a) CD86 (left panel) and MHC-II (right panel) surface expression of control and Chmp4b-silenced cells, either co-cultured (dotted line) or cultured in separate wells (solid line). (b) CD86 (left panel) and MHC-II (right panel) surface expression of control and Chmp2a-silenced cells, either co-cultured or cultured in separate wells.

Materials and methods

Flow cytometry

For flow cytometry, the following antibodies were used: anti-CD86-PE (clone GL1, BD Pharmingen #553692), anti-CD69-PE (clone H1.2F3, BD Pharmingen #553237), anti-CD25-PerCPCy5.5 (clone PC61, BD Pharmingen #551071), anti-CD8 α -APC (clone 53-6.7, BD Pharmingen #553035), anti-CD8 α -Pacific Blue (clone 53-6.7, BD Pharmingen #558106), anti-V α 2-PeCy7 (clone B20.1, BD Pharmingen #560624), anti-CD8 α -PerCPCy5.5 (clone 53-6.7, BD Pharmingen, #551162), anti-TCR V α 2-PE (clone B20.1, eBioscience #12-5812-82), anti-MHC-II-APC eFluor780 (clone M5/114.15.2, eBioscience #47-5321-82), anti-CD11c-PeCy7 (clone N418, eBioscience #25-0114-82), anti-H-2K_b-AF647 (clone AF6-88.5, BD Pharmingen #562832), anti-H-2K_b-BV421 (clone AF6-88.5, BD Pharmingen #562942), anti-CD44-FITC (clone IM7, BD Pharmingen #553133), anti-CD62L-PeCy7 (clone MEL-14, BD Pharmingen #560516), anti-CD4-APC (clone RM4-5, BD Pharmingen, #553051).

Cells were transferred in conical-bottom well plates (Greiner Bio-One, #650101) and stained with Fc Block (BD Pharmingen, #553142) and fixable Live/Dead dye violet (ThermoFisher, #L34955) or fixable Live/Dead Dye eFluor780 (eBioscience, #65-0865-14) diluted in PBS, for 20 min, on ice. Cells were then washed in FACS buffer (PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) and labeled for surface staining with the aforementioned antibodies or corresponding isotype controls, for 25 min, on ice.

Cell lines and cell culture

MutuDC (obtained from Hans Acha Orbea) cells were grown in IMDM (Sigma-Aldrich, #I3390-500ML), supplemented with 8% FCS (Biosera), 10 mM HEPES (#15630080), 2 mM glutamax (#35050061), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (#15140122) and 50 μ M β -mercaptoethanol (#31350010) (all from Life Technologies).

B3Z hybridomas were grown in RPMI-Glutamax (Gibco, #61870010), supplemented with 10% FCS (Biosera), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate (#11360070), 1% MEM non-essential

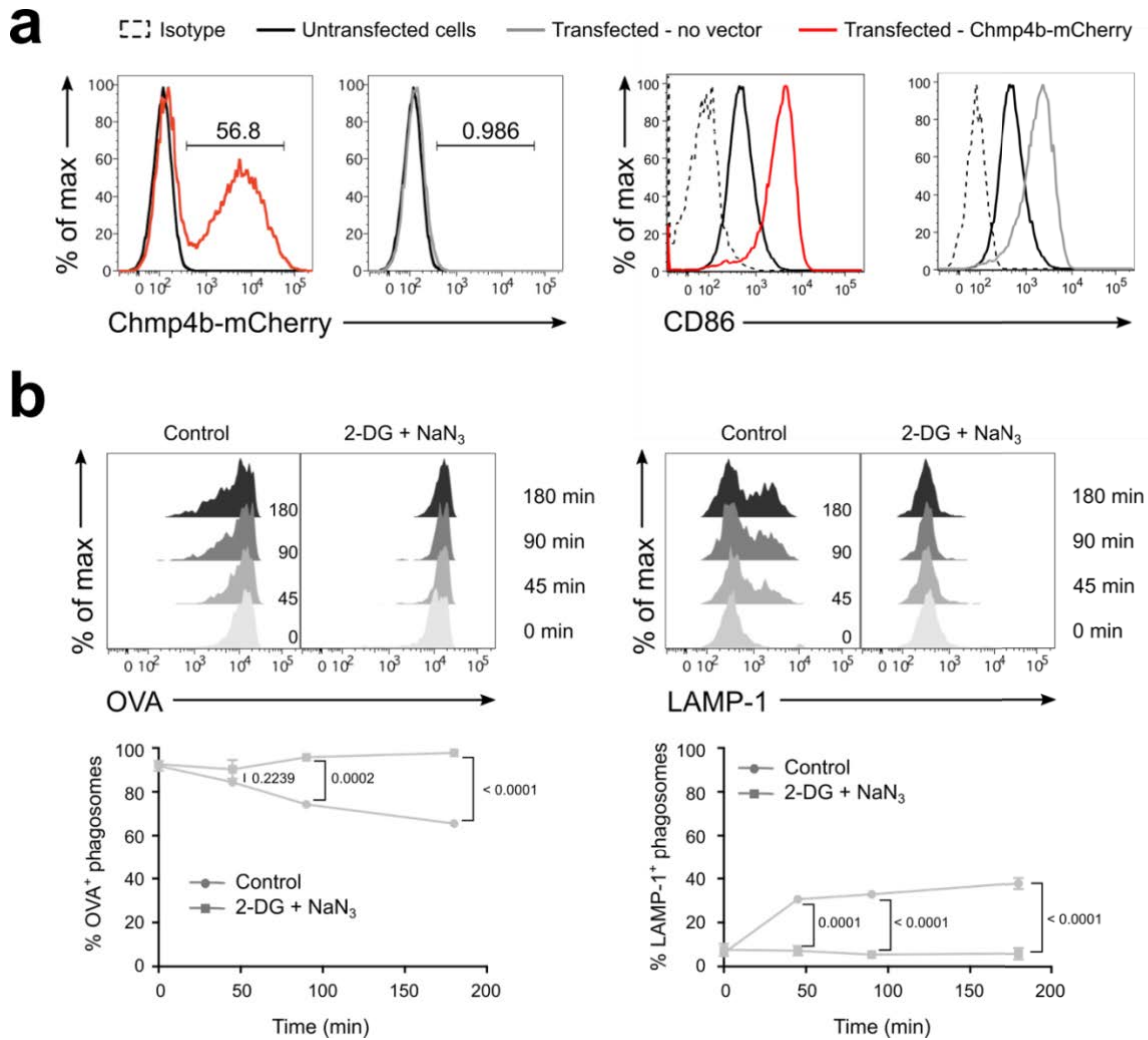


Figure RS.1.6., related to Figure R.1.4.: Phenotype and maturation of Chmp4b-mCherry MutuDCs in presence or absence of ATP

(a) mCherry and CD86 expression in Chmp4b-mCherry transfected cells, 6h after transfection. (b) Phagosomal maturation in Chmp4b-mCherry-transfected cells in presence or absence of ATP was evaluated by OVA degradation (left panel) and LAMP-1 recruitment (right panels). Graphs show the result of two independent experiments (two-way ANOVA, mean and SEM).

amino-acids (#11140035), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µM β-mercaptoethanol (all from Life Technologies).

HEK293T were grown in DMEM-Glutamax (Gibco, #31966021), supplemented with 10% FCS (Biosera).

Splenic dendritic cells were grown in RPMI-Glutamax (Gibco, #61870010), supplemented with 10% FCS (Biosera), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate (#11360070), 1% MEM non-essential amino-acids (#11140035), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 µM β-mercaptoethanol (all from Life Technologies).

Animals

C57BL/6J mice were obtained from Charles River Laboratories. C57BL/6N-recombination activating gene 1 deficient OT-I and OT-II TCR ($V\alpha 2$, $V\beta 5.1$) transgenic mice were bred at Institut Curie.

All mice used were less than six months old. Animal care and use for this study were performed in accordance with the recommendations of the European Community (2010/63/UE) for the care and use of laboratory animals. Experimental procedures were specifically approved by the ethics committee of the Institut Curie CEEA-IC #118 (CEEA-IC 2018-024) in compliance with the international guidelines.

Lentiviral shRNA knockdown of Chmp4b and Chmp2a

Lentivirus production

Plasmids encoding lentiviruses expressing shRNAs were obtained from the library of The RNAi Consortium (TRC) (Moffat *et al.*, 2006). Plasmids were purified with the Nucleobond Xtra Midi EF kit (Macherey-Nagel, #740420.10). Transfection was conducted as follows: HEK293T cells, plated the day before at a density of 3.5 million cells/10cm Petri dish, were transfected with a three-plasmid system (psPax2 7 µg/dish, vsv-g 0.7 µg/dish and plasmid encoding shRNA 7 µg/dish, all diluted in 1 mL Optimem #31985062 from Life Technologies supplemented with 45 µl TransIT-LT1 (#MIR2300-US, Mirus Bio)) to produce lentivirus.

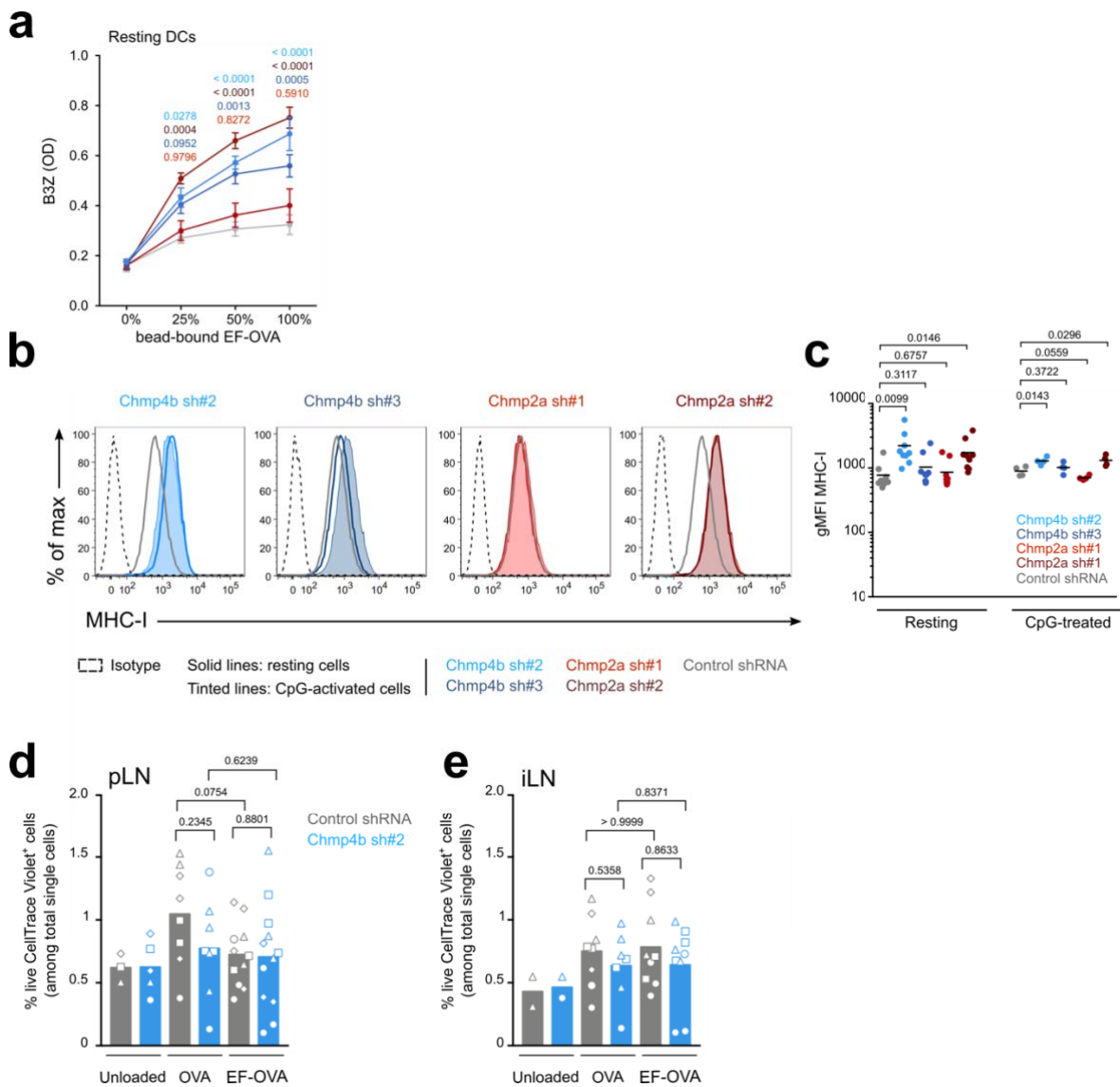


Figure RS.1.7., related to Figure R.1.5. and R.1.6. : *In vitro* cross-presentation of OVA-coated beads and MHC-I expression in ESCRT-III-silenced or control MutuDC

(a) ESCRT-deficient or control MutuDC were incubated for 5h with EF-OVA-coated beads before fixation. Cross-presentation efficiency of cDCs was measured by co-culture with B3Z cells after 16h. Graphs represent the result of three independent experiments. (two-way ANOVA; mean and SEM. Only exact p-values < 0.05 are shown, for clarity reasons). (b) Surface expression of MHC-I displayed by resting or CpG-activated ESCRT-III-silenced or control cells. (c) Quantification of gMFI for at least 4 experiments is shown. (Student's t-test; mean) (d-e) Proportion of CTV-stained OT-I T cells was measured in the popliteal draining (d) or inguinal non-draining lymph node (e) 24h after Chmp4b-silenced or control MutuDC injection in the footpad. Graphs represent the results of four independent experiments (Mann-Whitney test, mean).

RÉSULTATS

Eighteen hours after transfection, media was replaced by DMEM, 10% FCS and 2 mM glutamax supplemented with 1% BSA (Sigma-Aldrich, #A7979-50ML). Supernatants were harvested 48h after transfection and filtered on 0.22 μ m filter units (#SCGP00525, Merck Millipore). Supernatants were frozen at -80°C and aliquots were only thawed once. Titration was performed on thawed virus supernatants: the dose used for transduction was the minimal virus dose that does not lead to mortality after puromycin selection (i.e 100 μ l per well in a 6-well plate in our system).

The following shRNAs were produced (all from Sigma-Aldrich): Chmp4b sh#2 (target sequence

CCGGGCAGGCTCTGAAGCGCAAGAACTCGAGTTCTTGCGCTTCAGAGCCTGCTTTT*TG, #SHCLNG-NM_029362 TRCN0000105502), Chmp4b sh#3 (target sequence CCGGAGATGACGACATGAAGGAATTCTCGAGAATTCCITTCATGTCGTCATCTTT*TTG, #SHCLNG-NM_029362 TRCN0000105503), Chmp2a sh#1 (target sequence CCGGCAAGCCATGAAGGGTGTTACTCTCGAGAGTAACACCCTTCATGGCTTGTT*TTT*G, # SHCLNG-NM_026885, TRCN0000182144), Chmp2a sh#2 (target sequence CCGGCCTCAAGATACAGACTCTAAACTCGAGTT*TAGAGTCTGTATCTTGAGGTT*TTT*G, # SHCLNG-NM_026885 TRCN0000198105) and the non-targeting control (#SHC002, Sigma Aldrich).

Lentiviral transduction

MutuDC were plated in 6 well plates at a concentration of 0.4×10^6 cells per well in 2 mL of aforementioned media, 3h before virus transduction. Fifteen hours after transduction, viruses were removed; cells were washed once with media and put back to incubation. The next day (= day 2 post transduction), cells were selected with 2 μ g/ml of puromycin (#ant-pr-1, Invivogen). Cells were collected for analysis 24h after selection (= day 3 post transduction), a sufficient delay for puromycin-mediated cell killing.

Induction of cDC maturation

Maturation of MutuDC was induced by a 16h treatment preceding the harvesting of ESCRT-III-deficient or control cells on day 3 post-transduction. For this purpose, CpG (ODN 2395,

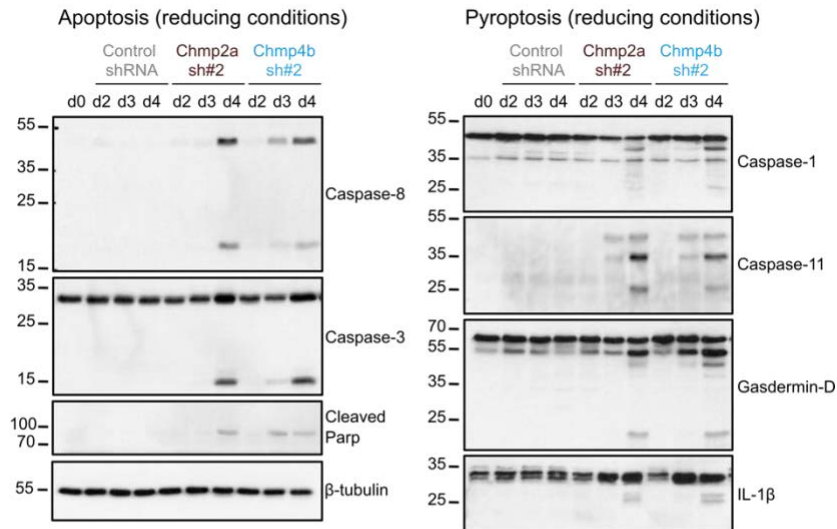
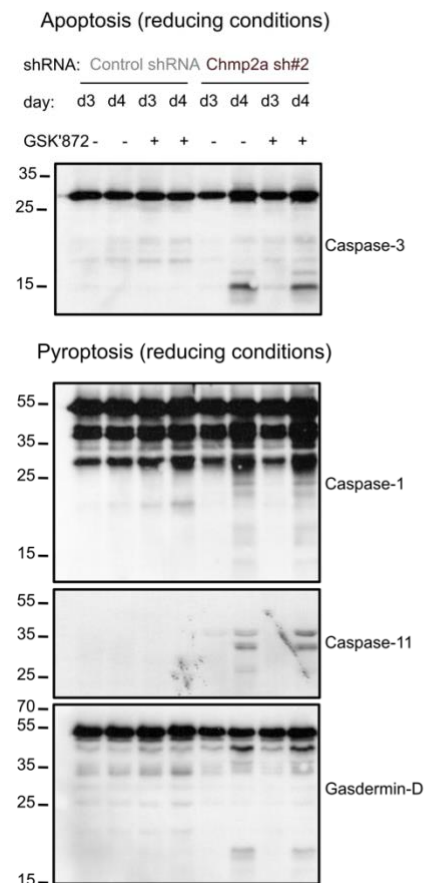
a**b**

Figure RS.1.8., related to Figure R.1.7.: ESCRT-III silencing induces late apoptosis and pyroptosis

(a) ESCRT-III-silenced and control MutuDC were lysed at different times post-transduction and induction of apoptotic (left panel) and pyroptotic (right panel) mediators was monitored by immunoblotting. Data are representative of $n = 2$ independent experiments. As same lysates were run in Figure R.1.7A and RS.1.8A, the β -tubulin panel displayed is identical (and copied) in both figures. (b) At day 2 post-transduction, Chmp2a-silenced and control MutuDC were treated with 10 μ M GSK'872 or equivalent amounts of DMSO as control and lysed at different days post-transduction. Immunoblotting for apoptotic or pyroptotic molecular players was then performed. $n = 1$.

#t1r1-2395-1, Invivogen) at a concentration of 1 µg/mL or untransfected high molecular weight polyI:C (#vac-pic, Invivogen) at a concentration of 5 µg/mL were used. cDC maturation was controlled both by surface staining for co-stimulatory, MHC-I and MHC-II molecules and by qPCR for NF-κB activation markers (TNF-α, IL-1β and RelB).

B-lactamase export assay

MutuDC were seeded at 0.2×10^6 cells/well in round-bottom 96-well plates and incubated for various timepoints (5h, 3h or 1h) at 37°C with 2 mg/mL β-lactamase (#P0389, Sigma-Aldrich). As negative controls, MutuDC were incubated with β-lactamase for 5h at 4°C, or without β-lactamase. Cells were then washed extensively in ice-cold PBS and loaded with 1 µM of the CCF4 probe during 1h at room temperature in EM buffer (120mM NaCl, 7mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 0.8mM MgCl₂, 5mM glucose and 25mM HEPES at pH 7.3) (Cebrian *et al.*, 2011) supplemented with 1:20 solution B (ThermoFisher, #K1095) and 1:100 probenecid (ThermoFisher, #P36400). In all steps following CCF4 loading, probenecid, a non-specific inhibitor of anion transport, was added in media and buffers to retain CCF4 into the cytosol and prevent its transport into endocytic compartments. To increase the assay's sensitivity, plates were then incubated for 16h, at room temperature in CO₂-independent (ThermoFisher, #18045088) media supplemented with 8% FCS, 2 mM glutamax and 1:100 probenecid. Immediately before flow cytometry analysis, cells were stained with eFluor-780 viability dye (#65-0865-14, eBioscience) diluted 1:2500 in PBS. Proportion of live cells with a high V450/V500 fluorescence ratio was used as read-out for their exporting capacity.

Splenic dendritic cells were stained with live/dead dye and CD11c, CD8 and CD11b markers right after CCF4 loading, and analyzed by flow cytometry. Overnight incubation was not performed in that case to avoid high cell mortality.

Alternatively, cells were seeded at 0.2×10^6 cells/well in round-bottom 96-well plates and incubated with or without MG-132 10 µM (#C2211-5MG, Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C, before addition of 2 mg/mL β-lactamase. MG-132 was maintained at a concentration of 10 µM during the whole course of the assay (including β-lactamase incubation, CCF4 loading and overnight incubation steps). Similarly, in experiments using GSK'872, the latter inhibitor was also maintained during the whole course of the assay.

Samples were acquired on a FACS Verse (BD Biosciences) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

Nitrocefin assay

Control or ESCRT-III-deficient MutuDC were seeded at 0.2×10^6 cells/well in flat-bottom 96-well plates and incubated for 20min or 2h with or without 2 mg/mL β -lactamase (#P0389, Sigma-Aldrich), at 37°C. Cells were then washed three times with ice-cold PBS, detached and resuspended in cold buffer containing 50 mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazole and 5mM mercaptoethanol pH8 (Cebrian *et al.*, 2011) at a concentration of 1×10^6 cells/100 μ l buffer. Samples were then sonicated (5 rounds of sonication, 30s ON, 30s OFF each) on Bioruptor Pico (Diagenode) and centrifuged at 16 000g, 15 min, 4°C to remove insoluble material. Lysates were then incubated for 1h, at 37°C, with 100 μ M nitrocefin (#484400-5MG, Calbiochem), a chromogenic lactamase substrate that undergoes distinctive color change from yellow to red (486 nm) upon lactamase hydrolysis. After 1h of incubation, optical density at 490 nm was measured by spectrophotometry. Soluble β -lactamase at 5 mg/mL was used as a positive saturation control.

Antigen uptake assay

ESCRT-III-deficient or control MutuDC were seeded at 0.2×10^6 cells/well in round-bottom 96-well plates and incubated at 37°C for various timepoints (15, 30, 60 or 180 min) with or without OVA-AF647 (#O34784, ThermoFisher) + unlabeled grade VII OVA (#A7641-250MG, Sigma-Aldrich) at the following concentration: 0.25 mg/mL each, for a total or 0.5 mg/mL OVA concentration. Cells were then washed extensively with ice-cold PBS before DAPI viability staining and subsequent flow cytometry analysis.

BSA-DQ assay

ESCRT-III-deficient or control MutuDC were incubated for 30 min, at 37°C in presence or absence of MG-132 at a concentration of 10 μ M in CO₂-independent media. BSA-DQ (#D12051, ThermoFisher) and BSA-AF647 (#A34785, ThermoFisher), used as an internal uptake control, were then added at a concentration of 0.25 mg/mL each for 20 min at 16°C, to

avoid endolysosomal fusion. Cells were then washed extensively in ice-cold PBS, resuspended in media containing or not 10 μ M MG-132, and distributed in round-bottom 96 well plates at 0.2×10^6 cells/well. At various timepoints (30, 45, 60, 120 or 240 min), cells were washed in ice-cold PBS, stained for viability with DAPI and analyzed by flow cytometry.

Samples were acquired on a MACSQuant VYB (Miltenyi) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

qPCR

Cells were harvested and lysed in Trizol buffer (#15596018, ThermoFisher), before phenol/chloroform extraction. Aqueous phase containing RNA was collected, pooled to an equal volume of absolute ethanol and RNA extracted on RNeasy micro kit columns (#74004, QIAGEN), according to manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using Nanodrop 2000 (#15220114, ThermoFisher Scientific). 1 μ g total RNA was retro-transcribed using the MAXIMA retrotranscriptase (#EP0741, ThermoFisher), in combination with oligo dT (#C1101, Promega), RNase inhibitor (#N2511, Promega) and dNTPs (Promega), following manufacturer's instructions. Transcripts were quantified by real time PCR on a 480 LightCycler instrument (Roche). Reactions were carried out in 10 μ L, using a master mix (#05-QP2X-03+WOUN, Eurogentec), with the following Taqman Assays primers (ThermoFisher): CHMP4B (Mm00551493_m1), CHMP2A (Mm00509883_m1), TNF (Mm00443258_m1), IL1B (Mm00434228_m1), RELB (Mm00485664_m1), HPRT (Mm03024075_m1), GAPDH (Mm99999915_g1). The relative expression of genes was calculated with the formula $2^{-\Delta C_t}$, where $\Delta C_t = C_t \text{ target gene} - C_t \text{ endogenous control gene}$ (Livak and Schmittgen, 2001). The mean of Hprt and Gapdh housekeeping gene Cts was used in the aforementioned formula.

Co-culture assay

MutuDC were stained for 20 min with 5 μ M Deep Red Dye (#C34565, Invitrogen) or left unstained, before transduction with control shRNA or Chmp4b sh#2/Chmp2a sh#2 respectively. Fifteen hours after transduction, Chmp4b sh#2/Chmp2a or control shRNA-transduced cells were extensively washed and pooled in equal amounts. As control, an activation

staining (MHC-II, MHC-I and CD86) was performed to ensure that cells were not yet activated at the time of pooling (data not shown). At day 3 post-transduction, β -lactamase assay was performed on pooled ESCRT-III-silenced MutuDC and control cells (or on cells cultured in separate wells) as described previously.

Of note, Deep Red dye staining does not lead to cDC activation and still allows discrimination of labeled versus unlabeled cells until the β -lactamase assay readout by flow cytometry.

Transfection

Plasmid encoding the Chmp4b-mCherry (human Chmp4b sequence) was described in (Jimenez *et al.*, 2014). 3×10^6 MutuDC were washed and resuspended in 100 μ l electroporation buffer (#VPA1011, Lonza) containing 1 μ g of the plasmid. Cells were then electroporated using Nucleofector device 2b (Lonza) (Y-001 program). Cells were recovered and diluted in warmed MutuDC media for 6h before PhagoFACS assay.

Bead preparation for phagoFACS

Bead preparation was described elsewhere (Hoffmann *et al.*, 2016). Briefly, 3 μ m polybeads (#17145-5, Polysciences), were washed, resuspended in 1 mL 8% glutaraldehyde (#16200, Euromedex) and incubated for 4h at room temperature, on a rotating wheel. Then, beads were washed again, resuspended in 0.5 mg/mL OVA (Worthington Biochemicals) and incubated overnight, on a rotating wheel, at 4°C. After overnight incubation, cells were washed, resuspended in 0.5 M glycine (#15527013, Invitrogen) and incubated for 30min, at 4°C on a rotating wheel. After two more PBS washes, beads were resuspended in initial volume of CO₂-independent media supplemented with 4 mM glutamax.

PhagoFACS

MutuDC were incubated with 3 μ m OVA-coated beads (with a bead:cell ratio of 10:1) for 25 min at 16°C, followed by 5 min of incubation at 37°C. Cells were immediately washed in ice-cold PBS, three times, and the remaining external beads were removed using an FCS gradient. Cells were then resuspended in pre-warmed PBS 8% FCS, 1 mM HEPES, containing or not 1

RÉSULTATS

mM Leu-Leu methyl ester hydrobromide (#L7392-500MG, Sigma-Aldrich) in presence or absence of ATP. ATP deprivation was induced by addition of 10 mM NaN₃ + 5 mM 2-deoxy-D-glucose (#D8375, Sigma-Aldrich) in glucose-free PBS 8% FCS, 1 mM HEPES. After various timepoints, cells were washed and outside beads were stained with anti-OVA (#C6534, Sigma-Aldrich) followed by anti-rabbit-AF647 staining (#A21245, ThermoFisher). Cells were then resuspended in homogenization buffer (PBS, 3 mM imidazole (#I202, Sigma-Aldrich), 8,6% sucrose, 2 mM DTT (#P2325, ThermoFisher), 2X protease inhibitors (000000011873580001, Sigma-Aldrich), pH=7.4) and mechanically disrupted with 2 mL syringes and 22-gauge needles (#050105B, Dutscher). Intact cells and nuclei were removed by a centrifugation at 150g for 4min at 4°C and postnuclear supernatant was then transferred to conical bottom-well plate. Non-specific binding was blocked by incubation in PBS 1% BSA, followed by labeling of phagosomes with anti-OVA (#A21245, ThermoFisher) and anti-LAMP-1 (#13-1071-82, eBioscience) antibodies (or isotype controls) and appropriate secondary antibodies. External beads were excluded from the analysis. Chmp4b-mCherry expression was directly measured by flow cytometry. Samples were acquired on a MACSQuant VYB (Miltenyi) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

Antigen presentation assay

Bead coating

Beads (#17134, Polysciences) were coated with endotoxin-free OVA (#321001, Hyglos) by adsorption, as previously described (Alloatti *et al.*, 2016b). Briefly, 250 µl of beads were washed three times with PBS, before resuspension in final volume of 750 µl of various OVA:BSA concentration ratios (100% OVA = 10 mg/mL OVA, 50% OVA:50% BSA (Sigma-Aldrich, #A7979-50ML) = 5 mg/mL OVA and 5 mg/mL BSA, 25% OVA: 75% BSA = 2,5 mg/mL OVA and 7,5 mg/mL BSA, and 0% OVA:100% BSA = 10 mg/mL BSA). After overnight incubation, at 4°C, on a rotating wheel, beads were washed three times in PBS, and finally resuspended in 250 µl MutuDC culture medium.

Assay

ESCRT-III-deficient or control shRNA-transduced cells were plated at 0.1 x 10⁶ cells/well in round-bottom 96-well plates and incubated for 5h with soluble or bead-coated (bead:cell ratio 200:1) endotoxin-free OVA (#321001, Hyglos), or with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide, as a control of

cDCs' ability to activate T cells. Then, cDCs were washed twice with PBS, fixed with 0.008% glutaraldehyde (#16200, Euromedex) for 3min at room temperature, washed twice with 0.4M glycine (#15527013, Invitrogen), once with B3Z medium and finally B3Z hybridoma cells were added (0.1×10^6 cells/well). After 16h of activation, cells were washed, and CPRG (#000000010884308001, Roche) β -galactosidase substrate was added for 4h, at 37°C before optical density measurement (590 nm) with a Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 plate reader (#8381-30-1005). For experiments with beads, optical density was measured after incubation for 4h at 37°C, followed by 15h at room temperature.

Alternatively, cDCs' ability to cross-present antigens *via* MHC-I or present antigens *via* MHC-II was evaluated using OT-I and OT-II T cells, respectively. OT-I and OT-II T cells were purified from spleen and lymph nodes using naïve CD8⁺ T cells (#130-096-543, Miltenyi) or naïve CD4⁺ T cells (#130-104-453, Miltenyi) isolation kits. Purity was routinely above 95%. MutuDC were plated at 0.1×10^5 cells/well in round-bottom well plate and incubated for 5h with the aforementioned antigens. Cells were then washed twice with PBS, twice with media, left unfixed, and 1.0×10^5 cells/well OT-I or 0.6×10^5 cells/well OT-II T cells were added per well. After 16h of activation, T cells were stained for CD25 and CD69 to monitor T cell activation. Samples were acquired on a FACS Verse (BD Biosciences) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

***In vivo* cross-priming assay**

Protocol was adapted from (Pace *et al.*, 2012). Briefly, mice were intravenously injected with 4×10^6 purified OT-I CD8⁺ T cells labeled with 5 μ M CellTrace Violet (#C34557, ThermoFisher). The next day, Chmp4b-deficient or control MutuDC were left unloaded or loaded with 3 mg/mL endotoxin-free OVA or 3 mg/mL grade VII OVA for 1h, at 37°C. cDCs were then extensively washed in PBS before injection (0.5×10^6 cells/footpad) in the footpad. 24h after cDC injection, inguinal and popliteal lymph nodes were harvested, mechanically disrupted and stained for CD25 and CD69 to monitor T cell activation. Samples were acquired on a MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi) or FACS Verse (BD Biosciences) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

Immunofluorescence galectin-3 assay and microscopy

0.2 x 10⁶ Chmp4b-deficient or control MutuDC were plated on 0,01% poly-L-lysine (#P8920, Sigma-Aldrich)-coated 12 mm coverslips (#631-0666; VWR) and left to adhere overnight at 37°C. The next day (= day 3 post-transduction), 1 mg/mL OVA-AF647 was added on cells for 45 min. Alternatively, MutuDCs were incubated with 2 mg/mL β -lactamase for 3h. As control, cells were also cultured without antigen. As positive control of damage, MutuDC were incubated for 45 min with 1 mM LLOME (L7393-500MG, Sigma-Aldrich). After incubation in presence or absence of antigen, cells were washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (#15710; Electron Microscopy Science), for 10 min, at room temperature. After quenching with 10 mM glycine (10min, room temperature), cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15min, at room temperature. Unspecific binding was blocked by incubation in PBS 5% BSA 0,1% Triton X-100 for 1h, at room temperature. Cells were then stained overnight, at 4°C, with anti-galectin-3 antibody (1 μ g/mL, #12-5301-82 or #14-5301-82, eBioscience) in PBS 5% BSA 0,1% Triton X-100. After three washes in PBS 5% BSA, cells were incubated with appropriate secondary antibodies for 30 min at RT, before washes and staining with DAPI. Coverslips were mounted with 7 μ l Fluoromount G (0100-01; SouthernBiotech) on slides (KNITTEL Starfrost) and dried overnight protected from light before microscope acquisition.

Splenic DC Isolation

Splenic DC isolation was performed as follows: after injection with CO₂-independant media supplemented with 0,1 mg/mL DNase I (11284932001, Sigma-Aldrich) and 0,3 mg/mL Liberase (05401020001, Roche), spleens were first incubated for 15 min, before mechanical dissociation with a scalpel and further digested for 15 additional minutes. Following mashing of the residual splenic pieces on a 40 μ m strainer, cell suspension was then subjected to splenic DC isolation with the Pan Dendritic Cell Isolation Kit (#130-100-875, Miltenyi). Purities over 80% of CD11c⁺ MHC-II^{hi} cDCs were routinely obtained (the 20% non-cDC population contains about 10% CD11c^{int} MHC-II^{int} pDC).

Splenic DC treatments and microscopy staining

0,1 x 10⁶ purified splenic DCs were plated on multiwell chambered coverslips (#C244779, Thermofisher) previously coated with poly-L-lysine (#P8920, Sigma-Aldrich) and left to adhere for 30 min, before addition of 3 mg/mL EF OVA (#321001, Hyglos), 3 mg/mL grade VII

OVA (#A7641-250MG, Sigma-Aldrich) or 0.3 mM LLOME (L7393-500MG, Sigma-Aldrich) for respectively 4h (OVAs) or 30min (LLOME), at 37°C. After treatment, cells were immediately fixed with 2% paraformaldehyde (#15710; Electron Microscopy Science) for 20 min at room temperature. Following three PBS washes, non-specific antibody binding was prevented by 1h incubation with Fc block (BD Pharmingen, #553142) diluted at 10 µg/mL in PBS 5% BSA. After blocking, staining with anti-CD8-AF647 (#557682, BD Pharmingen) and anti-CD11b-AF488 (#557672, BD Pharmingen), both diluted at 1 µg/mL in PBS 5% BSA, was performed for 1h at room temperature. After three PBS washes, cells were permeabilized with PBS 0,1% Triton X-100 (5 min, room temperature), before 1h of blocking with PBS 5% BSA. Finally, intracellular staining was achieved with anti-galectin3-PE antibody (1 µg/mL, #12-5301-82, eBioscience), overnight at 4°C. The next day, cells were washed three times in PBS, stained with DAPI, mounted in PBS and observed at the microscope within the week.

Microscopy and image analysis

MutuDC confocal images were acquired with a laser scanning confocal (SP8; Leica), equipped with 63X Apo objective (numerical aperture: 1.4) and a 1-airy unit pinhole size was used. Z-stack images were acquired.

Splenic DCs confocal images were acquired with a laser scanning confocal (LSM780; Zeiss), equipped with 40X Apo objective (numerical aperture: 1.3) and a 1-airy unit pinhole size was used. Z-stack images were acquired.

For counting of galectin-3 *foci*, z-projections of the different stacks were performed, using max intensity criteria. Background signal was subtracted (“rolling=50”), and threshold applied (Huang threshold) before converting the image to mask. Each cell was defined by a ROI, on which the “analyze particle function” was applied to count the number of *foci*/cell (criteria used for MutuDC: size=35-700 and pixel circularity=0.30-1.00. Criteria used for splenic DCs: size=10-700 and pixel circularity=0.30-1.00. Thresholds used for splenic DC are joined in an Supplementary Table 1).

Treatment with necroptosis inhibitors

MutuDC were silenced with Chmp2a or Chmp4b-targeting shRNA as previously described. At day 2 post-transduction, MutuDC media was replaced with media containing 10 μ M GSK'872 (5303890001, Merck) in absence (for western blotting analysis) or presence (for β -lactamase assay) of puromycin. For immunoblotting kinetics, GSK'872-containing media was renewed every 24h.

Western Blotting

To analyze cell death pathways induced in ESCRT-III-silenced cells, total (live and dead) supernatant and adherent cells were collected and counted before cell pellet lysis in 2XSB buffer without DTT (4% SDS (#EU0660, Euromedex), 0,12 M Tris pH 6,8 (#10708976001, Sigma-Aldrich), glycerol 10% (#24388.295, VWR), dash of bromophenol blue (#B-5525, Sigma-Aldrich)) (1 million cells lysed per 100 μ l buffer). DTT (#P2325, ThermoFisher) was added extemporaneously at 100 mM final concentration. Samples were immediately boiled for 5 min at 95°C, quickly spun and frozen at -20°C until use. The following antibodies were used for immunoblotting detection: anti-caspase-3 (#9662: Cell Signaling Technologies), anti-caspase-8 (#9429, Cell Signaling Technologies), anti-caspase-1 (produced in house – Mathieu Bertrand's lab), anti-caspase-11 (#120-10454, Novus Biologicals), anti-cleaved Parp (#9544, Cell Signaling Technologies), anti-Gasdermin-D (Genentech), anti-IL-1 β (#GTX74034, Genetex), anti MLKL (#MABC604, Millipore (reducing conditions) or #SAB1302339, Sigma-Aldrich (non-reducing conditions)), anti-phosphoMLKL (#ab196436, Abcam), anti-RIPK3 (#R4277, Sigma-Aldrich), anti-RIPK1 (#610459, BD Biosciences).

Endocytic compartment proteomics

Mice. C57BL 6 (B6) mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions at The Walter and Eliza Hall Institute animal breeding facility according to institute guidelines. B6 mice were injected subcutaneously with 5x10⁶ B16 melanoma cells secreting murine Fms-like tyrosine kinase ligand (Flt3-L) (36) and killed after 9-10 days.

Cell Isolation. Total DCs were isolated from the spleens of B6 mice as described in Vremec and Segura (2013). In brief, splenic cells were digested with Dnase I (Boehringer-Manheim,

RÉSULTATS

Mannheim, Germany) and collagenase (Worthington Biochemicals, Freehold, NJ) and enriched for light-density cells by centrifugation in 1.077 g/cm³ Nycodenz (Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Cells were isolated after a depletion step using antibodies against CD3 (KT3-1.1), Thy-1 (T24/31.7), Ter 119, Ly6G (RB68C5) and CD45R (RA36B2), followed by incubation with anti-rat IgG-coupled magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway) following the manufacturer's protocol. CD8⁺ DC were isolated by positive selection using immuno-magnetic beads (MACS, Miltenyi Biotec) after staining with anti-CD8 (YTS 169.4) antibody. Remaining cells were depleted of CD205⁺CD24^{high} DC after staining with anti-CD205 (NLDC-145) and anti-CD24 (M1/69) antibodies and MACS beads depletion, and finally CD8⁻ DC were isolated by positive selection using MACS beads after staining with anti-CD11b (M1/70) antibody.

Subcellular fractionation. Cells were homogenized with a cell-cracker (HGM Laboratory Equipment) in homogenization buffer (PBS, 0.25 M sucrose, 10 mM Tris, 1mM EDTA supplemented with proteases inhibitors (Roche), pH 6.8). Post-nuclear supernatant was prepared by centrifugation (1000 g, 10 min) and loaded on top of a 10% Percoll (GE Healthcare) solution in homogenisation buffer. After ultra-centrifugation (50000 g, 45 min), 1 mL fractions were collected. The top 3 fractions (early endosomes) were pooled and concentrated by ultracentrifugation (130000 g, 1 h). The bottom 2 fractions were pooled and loaded on top of a 45% Percoll solution in homogenisation buffer. After ultra-centrifugation (50000 g, 45 min), the top 3 fractions (late endosomes) and the bottom 2 fractions (lysosomes) were pooled and concentrated by ultracentrifugation (130000 g, 1 h).

SDS-PAGE electrophoresis. Samples were run on a 4-12% SDS-PAGE gel (Invitrogen). After electrophoresis, gels were fixed with 40% methanol/7% acetic acid for 30 min, washed 3 times in deionised water and stained in Imperial Protein stain (Pearce).

Gel excision and digestion. For each sample, 50 gel bands were excised from the 1-D gel lane and subjected to automated in-gel reduction, alkylation and tryptic digestion using the MassPREP Station (Micromass). Briefly, gel sections were automatically reduced with 10 mM DTT (Merck) for 30 min, alkylated for 20 min with 25 mM iodoacetic acid (Fluka) and digested with 150 ng trypsin (Worthington) for 4.5 h at 37°C. Extracted peptide solutions (0.1% formic acid) were concentrated to approximately 10 µL by centrifugal lyophilisation using a SpeedVac AES 1010 (Savant).

Mass spectrometry. A 96-well plate containing extracted peptides was loaded into the microwell plate autosampler for injection and fractionation by nanoflow reverse-phase liquid chromatography on a 1200 series LC system (Agilent) using a nanoAcquity C18 150 x 0.15 mm i.d. column (Waters) developed with a linear 60-min gradient with a flow rate of 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ at 45 °C from 0-100 % solvent B in solvent A (as above). The nano HPLC was coupled on-line to an LTQ-Orbitrap mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (Thermo Fisher Scientific) for automated MS/MS. The Orbitrap was operated in positive ion mode for data-dependent acquisition. Survey MS scans were acquired with the resolution set to a value of 30000. Real time recalibration by corrections of mass shift was performed by the use of a background ion from ambient air in the C-trap (29). Up to five most intense ions per cycle were fragmented and analysed in the linear trap, with target ions already selected for MS/MS being dynamically excluded for 3 min.

Mass spectrometry data analysis. Peak lists were extracted using *extract-msn* as part of Bioworks 3.3.1 (Thermo Fisher Scientific). The parameters used to generate the peak lists for the Orbitrap were as follows: minimum mass 700; maximum mass 5000; grouping tolerance 0.01 Da; intermediate scans 1; minimum group count 1; 10 peaks minimum and total ion current of 100. Automatic charge state recognition was used because of the high resolution survey scan (30000). Peak lists for each LC-MS/MS run were merged into a single MGF file and searched against the IPI (38) mouse and bovine protein sequence database (April 2009) comprising 87598 sequence entries using the MASCOT v2.2.01 search algorithm (Matrix Science). The search parameters consisted of carboxymethylation of cysteine as a fixed modification (+58 Da), NH₂-terminal acetylation (+42 Da) and oxidation of methionine (+16 Da) as variable modifications. A peptide mass tolerance of ± 20 ppm, #13C defined as 1, fragment ion mass tolerance of ± 0.8 Da, and an allowance for up to two missed tryptic cleavages was used.

The program MSPro was used for parsing and summarizing the Mascot search results for all data files. Peptide spectral matches (PSMs) from the Mascot search results were deemed significant if the PSMs Ions score (IS) was \geq the Homology score (or Identity score if there was no Homology score). False-discovery rate calculations at the protein level were carried out as previously described (39).

Differential protein expression determination.

Comparison of the relative abundance of each molecule across the two samples was performed by calculating fold change based on the number of spectral counts of significant PSMs for each protein. Significant spectral count fold change ratios (RSc) were determined using a modified formula from a previous serial analysis of gene expression study by (Beissbarth *et al.*, 2004)

$$\text{RSc} = \log_2[(n_{\text{CD8}^+} + f) / (n_{\text{CD8}^-} + f)] + \log_2[(t_{\text{CD8}^-} - n_{\text{CD8}^-} + f) / (t_{\text{CD8}^+} - n_{\text{CD8}^+} + f)] \quad (\text{Eq. 1})$$

Where, n is the number of spectral counts of significant PSMs for a particular protein, t is the total number of spectral counts of significant PSMs for all proteins in a sample, and f a correction factor set to 1.25 (12).

Statistical analyses

Statistical tests were performed with the Graphpad Prism software. The nature of the test used is mentioned in figure legends, and exact p-values are shown on figures. In some illustrative panels (Figure RS.1.2A, and RS.1.2E), statistical significance was not assessed, and p-values thereby not displayed.

References

- Ackerman, A.L., Giardini, A., and Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607–617.
- Adell, M.A.Y., Vogel, G.F., Pakdel, M., Müller, M., Lindner, H., Hess, M.W., and Teis, D. (2014). Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J. Cell Biol.* 205, 33–49.
- Agmon, E., Solon, J., Bassereau, P., and Stockwell, B.R. (2018). Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Sci. Rep.* 8, 5155.
- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A.-M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., Corcelle-Termeau, E., Høgh, S., Farkas, T., Holm Jonassen, A., *et al.* (2015). Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy* 11, 1408–1424.
- Alloatti, A., Kotsias, F., Pauwels, A.-M., Carpier, J.-M., Jouve, M., Timmerman, E., Pace, L., Vargas, P., Maurin, M., Gehrman, U., *et al.* (2015). Toll-like Receptor 4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens. *Immunity* 43, 1087–1100.
- Alloatti, A., Kotsias, F., Hoffmann, E., and Amigorena, S. (2016). Evaluation of Cross-presentation in Bone Marrow-derived Dendritic Cells in vitro and Splenic Dendritic Cells ex vivo Using Antigen-coated Beads. *Bio-Protoc.* 6.
- Bache, K.G., Stuffers, S., Malerød, L., Slagsvold, T., Raiborg, C., Lechardeur, D., Wälchli, S., Lukacs, G.L., Brech, A., and Stenmark, H. (2006). The ESCRT-III subunit hVps24 is required for degradation but not silencing of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Biol. Cell* 17, 2513–2523.
- Beissbarth, T., Hyde, L., Smyth, G.K., Job, C., Boon, W.-M., Tan, S.-S., Scott, H.S., and Speed, T.P. (2004). Statistical modeling of sequencing errors in SAGE libraries. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20 *Suppl* 1, i31-39.
- Bevan, M.J. (1976a). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143, 1283–1288.
- Bevan, M.J. (1976b). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol. Baltim. Md* 117, 2233–2238.
- Blander, J.M. (2018). Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 717–753.
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B.H.-J., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., *et al.* (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* 31, 232–244.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434–6451.
- den Brok, M.H., Büll, C., Wassink, M., de Graaf, A.M., Wagenaars, J.A., Minderman, M., Thakur, M., Amigorena, S., Rijke, E.O., Schrier, C.C., *et al.* (2016). Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat. Commun.* 7, 13324.
- Campsteijn, C., Vietri, M., and Stenmark, H. (2016). Novel ESCRT functions in cell biology: spiraling out of control? *Curr. Opin. Cell Biol.* 41, 1–8.
- Carlton, J.G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., and Martin-Serrano, J. (2012). ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science* 336, 220–225.
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L.F., Amigorena, S., and Savina, A. (2011). Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 147, 1355–1368.
- Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., Colom, A., Humbert, F., Lenz, M., Scheuring, S., and Roux, A. (2015). Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell* 163, 866–879.
- Cruz, F.M., Colbert, J.D., Merino, E., Kriegsman, B.A., and Rock, K.L. (2017). The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 149–176.
- Dingjan, I., Verboogen, D.R., Paardekooper, L.M., Revelo, N.H., Sittig, S.P., Visser, L.J., Mollard, G.F. von, Henriët, S.S., Figdor, C.G., Ter Beest, M., *et al.* (2016). Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Sci. Rep.* 6, 22064.

RÉSULTATS

- Edwards, A.D., Chaussabel, D., Tomlinson, S., Schulz, O., Sher, A., and Reis e Sousa, C. (2003). Relationships among murine CD11c(high) dendritic cell subsets as revealed by baseline gene expression patterns. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 47–60.
- Frank, D., Vaux, D.L., Murphy, J.M., Vince, J.E., and Lindqvist, L.M. (2019). Activated MLKL attenuates autophagy following its translocation to intracellular membranes. *J. Cell Sci.* *132*.
- Fuertes Marraco, S.A., Grosjean, F., Duval, A., Rosa, M., Lavanchy, C., Ashok, D., Haller, S., Otten, L.A., Steiner, Q.-G., Descombes, P., *et al.* (2012). Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Front. Immunol.* *3*, 331.
- Fujita, H., Umezuki, Y., Imamura, K., Ishikawa, D., Uchimura, S., Nara, A., Yoshimori, T., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Ishidoh, K., *et al.* (2004). Mammalian class E Vps proteins, SBP1 and mVps2/CHMP2A, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4B. *J. Cell Sci.* *117*, 2997–3009.
- Garber, M., Yosef, N., Goren, A., Raychowdhury, R., Thielke, A., Guttman, M., Robinson, J., Minie, B., Chevrier, N., Itzhaki, Z., *et al.* (2012). A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol. Cell* *47*, 810–822.
- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Côté, M., Rich, R.L., *et al.* (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* *107*, 55–65.
- Gil-Torregrosa, B.C., Lennon-Duménil, A.M., Kessler, B., Guernonprez, P., Ploegh, H.L., Fruci, D., van Endert, P., and Amigorena, S. (2004). Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* *34*, 398–407.
- Gong, Y.-N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J.U., Yang, M., Fitzgerald, P., Linkermann, A., and Green, D.R. (2017). ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. *Cell* *169*, 286–300.e16.
- Grotzke, J.E., Kozik, P., Morel, J.-D., Impens, F., Pietrosemoli, N., Cresswell, P., Amigorena, S., and Demangel, C. (2017). Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E5910–E5919.
- Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* *180*, 389–402.
- Hildebrand, J.M., Tanzer, M.C., Lucet, I.S., Young, S.N., Spall, S.K., Sharma, P., Pierotti, C., Garnier, J.-M., Dobson, R.C.J., Webb, A.I., *et al.* (2014). Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 15072–15077.
- Hoffmann, E., Pauwels, A.-M., Alloatti, A., Kotsias, F., and Amigorena, S. (2016). Analysis of Phagosomal Antigen Degradation by Flow Organelloctometry. *Bio-Protoc.* *6*.
- Imai, T., Kato, Y., Kajiwara, C., Mizukami, S., Ishige, I., Ichiyangi, T., Hikida, M., Wang, J.-Y., and Udono, H. (2011). Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16363–16368.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* *343*, 1247136.
- Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* *100*, 1734–1741.
- Karttunen, J., Sanderson, S., and Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6020–6024.
- Koopmann, J.O., Albring, J., Hüter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neeffjes, J., Hämmerling, G.J., and Momburg, F. (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* *13*, 117–127.
- Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* *267*, 243–246.
- Lin, M.L., Zhan, Y., Proietto, A.I., Prato, S., Wu, L., Heath, W.R., Villadangos, J.A., and Lew, A.M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3029–3034.

RÉSULTATS

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Luber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O’Keeffe, M., *et al.* (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* 32, 279–289.
- Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., *et al.* (2013). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* 32, 2336–2347.
- Mamińska, A., Bartosik, A., Banach-Orłowska, M., Pilecka, I., Jastrzębski, K., Zdżalik-Bielecka, D., Castanon, I., Poulain, M., Neyen, C., Wolińska-Nizioł, L., *et al.* (2016). ESCRT proteins restrict constitutive NF- κ B signaling by trafficking cytokine receptors. *Sci. Signal.* 9, ra8.
- Mandal, P., Berger, S.B., Pillay, S., Moriwaki, K., Huang, C., Guo, H., Lich, J.D., Finger, J., Kasparcova, V., Votta, B., *et al.* (2014). RIP3 induces apoptosis independent of proapoptotic kinase activity. *Mol. Cell* 56, 481–495.
- Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepper, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., *et al.* (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283–1298.
- Murshid, A., Gong, J., and Calderwood, S.K. (2010). Heat shock protein 90 mediates efficient antigen cross presentation through the scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 2903–2917.
- Olmos, Y., Hodgson, L., Mantell, J., Verkade, P., and Carlton, J.G. (2015). ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* 522, 236–239.
- Pace, L., Tempez, A., Arnold-Schrauf, C., Lemaitre, F., Bouso, P., Fetler, L., Sparwasser, T., and Amigorena, S. (2012). Regulatory T cells increase the avidity of primary CD8+ T cell responses and promote memory. *Science* 338, 532–536.
- Ploegh, H.L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435–438.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 5327–5330.
- Radulovic, M., Schink, K.O., Wenzel, E.M., Nähse, V., Bongiovanni, A., Lafont, F., and Stenmark, H. (2018). ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *EMBO J.* 37.
- Repnik, U., Borg Distefano, M., Speth, M.T., Ng, M.Y.W., Progida, C., Hoflack, B., Gruenberg, J., and Griffiths, G. (2017). L-leucyl-L-leucine methyl ester does not release cysteine cathepsins to the cytosol but inactivates them in transiently permeabilized lysosomes. *J. Cell Sci.* 130, 3124–3140.
- Römisch, K. (2017). A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD. *Trends Biochem. Sci.* 42, 171–179.
- Rühl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J.C., and Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* 362, 956–960.
- Saka, H.A., and Valdivia, R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 411–437.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 97–109.
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L.F., and Amigorena, S. (2009). The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* 30, 544–555.
- Scheffer, L.L., Sreetama, S.C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K.J., Defour, A., and Jaiswal, J.K. (2014). Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat. Commun.* 5, 5646.
- Schnorrer, P., Behrens, G.M.N., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., *et al.* (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10729–10734.

RÉSULTATS

- Schöneberg, J., Lee, I.-H., Iwasa, J.H., and Hurley, J.H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 5–17.
- Segura, E., Albiston, A.L., Wicks, I.P., Chai, S.Y., and Villadangos, J.A. (2009). Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20377–20381.
- Segura, E., Kapp, E., Gupta, N., Wong, J., Lim, J., Ji, H., Heath, W.R., Simpson, R., and Villadangos, J.A. (2010). Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis. *Mol. Immunol.* *47*, 1765–1773.
- Shen, Q.-T., Schuh, A.L., Zheng, Y., Quinney, K., Wang, L., Hanna, M., Mitchell, J.C., Otegui, M.S., Ahlquist, P., Cui, Q., *et al.* (2014). Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly. *J. Cell Biol.* *206*, 763–777.
- Singh, R., and Cresswell, P. (2010). Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science* *328*, 1394–1398.
- Skowrya, M.L., Schlesinger, P.H., Naismith, T.V., and Hanson, P.I. (2018). Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science* *360*.
- Vietri, M., Schink, K.O., Campsteijn, C., Wegner, C.S., Schultz, S.W., Christ, L., Thoresen, S.B., Brech, A., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2015). Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* *522*, 231–235.
- Voorhees, R.M., Fernández, I.S., Scheres, S.H.W., and Hegde, R.S. (2014). Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell* *157*, 1632–1643.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 565–573.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., and Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* *93*, 4225–4236.
- Yang, Z., Wang, Y., Zhang, Y., He, X., Zhong, C.-Q., Ni, H., Chen, X., Liang, Y., Wu, J., Zhao, S., *et al.* (2018). RIP3 targets pyruvate dehydrogenase complex to increase aerobic respiration in TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.* *20*, 186–197.
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., Green, D.R., Oberst, A., and Albert, M.L. (2015). RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8⁺ T cells. *Science* *350*, 328–334.
- Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., and Wallach, D. (2017). MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity* *47*, 51-65.e7.
- Zehner, M., Chasan, A.I., Schuette, V., Embgenbroich, M., Quast, T., Kolanus, W., and Burgdorf, S. (2011). Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9933–9938.
- Zehner, M., Marschall, A.L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A.J., *et al.* (2015). The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells. *Immunity* *42*, 850–863.

COMMENTAIRES DES REVIEWERS APRÈS PREMIÈRE SOUMISSION À IMMUNITY

Color code: **ORANGE** = done, **BLUE**: left to do

Reviewer#1:

The authors present data demonstrating that knockdown of two ESCRT-III subunits CHMP4b and CHMP2a impacts both translocation of the enzyme beta-lactamase across the endosomal membrane and antigen cross-presentation. Loss of expression of the ESCRT-III subunit proteins in the Mutu DC cell line results in increased translocation of endocytosed/pinocytosed antigen into the cytosol. The translocation of antigens into the cytosol in turn results in increased antigen cross-presentation. They also demonstrate that the loss of ESCRT-III subunits impacts the membrane integrity of the endolysosomal compartment.

Major concerns

The major problem I have with the manuscript is that the approach to demonstrating that endosomal/phagosomal membrane rupture and repair underlies cross-presentation is to inhibit the repair process. This does in fact lead to enhanced cross-presentation as well as access to the cytosol of the enzyme beta-lactamase. However, any chemical or genetic manipulations that impact the integrity of endolysosomal organelles are likely to result in increased access to the cytosol of endocytosed proteins. For example, 'osmotic shock' was used many years ago used to introduce antigens into the cytosol of non-APCs to allow antigen presentation of OVA. Given that ESCRT-III plays a role in repairing endosomal membranes, the findings presented in the manuscript are not necessarily surprising and we are left with the question, is this 'real' cross-presentation, or does knocking it down simply generate an expected result based on a known perturbation?

It would seem necessary to strengthen the argument that the authors are looking at the real phenomenon. Could the authors demonstrate that the endosomal compartments of cross-presenting cells are more prone to membrane rupture and subsequent repair than non-cross-

presenting cells? BMDCs can cross-present, and in fact there are far more papers using BMDCs than the Mutu cell line for cross-presentation studies. Are they more or less likely than Mutu cells to suffer membrane rupture, and does that correlate with the ability to cross-present?

We agree with reviewer #1 and thank him/her for this relevant suggestion. As BMDCs cross-present partly *via* the vacuolar pathway, we thought they were maybe not the best system to test for endolysosomal damages. Hence, to address this, we compared the occurrence of intracellular damage (monitored by appearance of galectin-3 *foci*) in purified cross-presenting cDC1 and non-cross-presenting cDC2 subsets. As added in Figure R.1.1B, we observed strikingly higher frequency of damages in intracellular compartments of cDC1, as compared to cDC2, at steady-state or following various treatments (with endotoxin-free or endotoxin-contaminated OVA or with LLOME, a drug triggering lysosomal permeability), which indicates greater endolysosomal permeability and mirrors the exporting and cross-presenting capacity of this cDC subset. This damage pattern remarkably correlates with the observed enrichment for ESCRT-III subunits in cDC1 intracellular compartments and suggests a dire need for repair in this subset. These results show a direct correlation between antigen cross-presentation capacity and occurrence of damages in endolysosomal compartments, and thus further support the notion that antigen leakage into the cytosol increases cross-presentation.

B cells can also cross-present, as can HEK293T cells. Is there an inverse correlation between ESCRT-3 recruitment to phagosomes and cross-presentation? Does over-expression of ESCRT-III impair cross-presentation by increasing the repair rate of endosomal or phagosomal membranes?

We are currently developing a rescue assay to address this point. We aim to overexpress human version of Chmp4b in MutuDCs, that would then be silenced for mouse Chmp4b. Human Chmp4b is resistant to murine Chmp4b silencing and only differs by one amino acid, compared to the mouse sequence. The amino acid at this position displays similar physico-chemical properties in mouse (valine) and human (isoleucine). Moreover, human Chmp4b is efficiently recruited to mouse phagosomes following LLOME treatment, as shown in Figure R.1.4B. We think that a simple overexpression assay may not be sufficient to decrease steady-state export as the latter is very low and may not allow detection of any negative modulation due to insufficient dynamic range. On the contrary, a “rescue” experiment would permit it and may be

enough to address the possible correlation between increased Chmp4b expression and decreased export.

Are there any observed differences in galectin-3 recruitment to endosomes of cDC1 and cDC2 in the mass spec. analysis?

In the mass spectrometry analysis, we found that galectin-3 is enriched in cDC1 early compartments and lysosomes (scores obtained: lysosomes : 2,958, late endosomes : -0.334 and early endosomes : 0.609. As in Segura *et al.*, (2010), we considered that a score < - 0.4 indicated an enrichment in cDC2, while a score > 0.4 indicated enrichment in cDC1.)

Could the authors compare kinetics of disappearance of phagosomal/lysosomal galectin-3 in cDC1 versus cDC2, post induction of short pulse of lysosomal damage, perhaps demonstrating a difference in membrane repair kinetics.

We thank reviewer #1 for this interesting suggestion. In the previously described galectin-3 assay conducted in cDC1 and cDC2, we observed increased galectin-3 damage in cDC1, even at steady state. We believe that this may both reflect higher damage in cDC1 (reflected by increased ESCRT-III recruitment to intracellular compartments) and also decreased ability to face and repair them (galectin-3 labels big damages, unrepaired by ESCRT-III (Skowyra *et al.*, 2018).

As *foci* occurrence differs at 30 min between cDC1 and cDC2 in all conditions we tested, we feel that this parameter would bias the interpretation of the proposed experiment.

The increased recruitment of ESCRT-III to cDC-1 endosomes/lysosomes is presented as a read-out for membrane repair. However, the authors must be aware that the ESCRT complex plays a vital role in receptor/cargo sorting. Therefore, differences in the ESCRT-III recruitment between cell types could also be attributed to differences in cargo sorting.

We thank the reviewer for this remark. We reasoned that if the differences we observed were due to cargo sorting, they should also apply to other components of the ESCRT machinery. Indeed, ESCRT-II is absolutely required for ubiquitinated cargo sorting, but dispensable for endomembrane repair. We checked for ESCRT-II subunits in our proteomic dataset. Only Vps25 is detected, enriched in early cDC1 compartments and in cDC2 late compartments, but does not display a clear recruitment segregation, as many ESCRT-III subunits do. We also

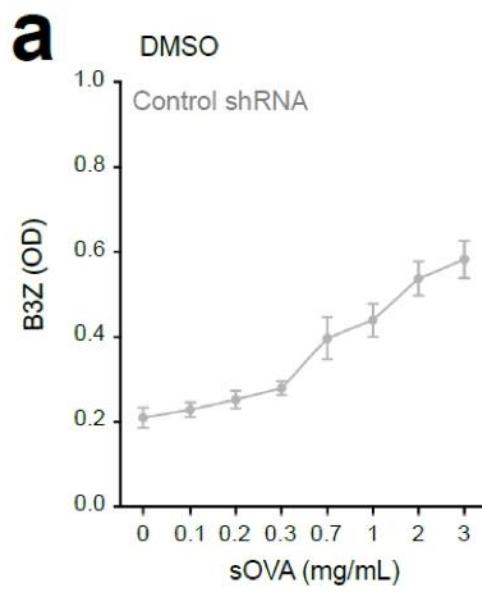


Figure Rev.1.1 : Cross-presentation of endotoxin-contaminated OVA by control MutuDC. n=3

checked for deubiquitinases (AMSH/STAMBP and UBPY/Usp8), so far uniquely described as playing a role in cargo sorting, but they were not detected in our proteomic dataset. Hence, we believe that the ESCRT-III recruitment we observed in cDC1 occurs largely in the context of membrane repair. We have now included these important elements in the discussion.

Additional concerns:

1) Mutu cells are used a model system for cDC1 cells. However, in the data presented in Figure R.1.2C, control Mutu cells do not translocate antigens efficiently and they fail to cross-present endocytosed antigen (Figure R.1.5B, C). One could infer from these findings that the cell line may not in fact represent an optimal antigen cross-presenting cell.

MutuDC actually transfer antigens as efficiently as cDC1 (as seen on Figure R.1.1A and Figure R.1.2C-D). Similar to cDC1, they efficiently cross-present endotoxin-contaminated antigens, as shown in Figure Rev.1.1. We thus believe that they represent a relevant model for cDC1 biology studies.

2) The authors should provide convincing data demonstrating that cleavage of CCF4 is taking place in the cytosol. It could be argued that ESCRT-III knockout cells accumulate more CCF4 dye in the endosomal compartment, resulting in an increased V450 signal.

This is an interesting point. Importantly, all incubations after CCF4 loading are performed in presence of probenecid, an anion transporter inhibitor. This prevents active transport of CCF4 into endocytic compartments, and guarantees that in absence of membrane damage, all CCF4 is retained in the cytosol. If CCF4 gains access to endocytic compartments passively upon loss of membrane integrity, it is possible that cleavage would occur in endosomes. However, this would still be caused by loss of membrane integrity, in agreement with our working hypothesis. We have now included these elements in the discussion.

3) It is surprising that only a fraction of the Mutu DCs translocate antigen (Figure R.1.2C, Figure R.1.3A, D, E). Can authors comment on or provide an explanation for this?

We thank the reviewer for this concern. Importantly, it has been described that cDC1 represent a heterogenous population, and that only a fraction of these cells efficiently export and cross-

present antigens (Lin *et al.*, 2008). Therefore, the partial translocation in MutuDC further supports their behavior resembles that of cDC1.

4) The authors should test the specificity of the shRNA effects by transducing the cells with an shRNA-resistant wild-type gene, and characterizing the translocation and cross-presentation phenotype.

This concern would also be addressed by the “rescue” experiment proposed in an earlier section.

Reviewer #2:

Amigorena and colleagues study the role of ESCRT-II complexes that have recently been reported to repair endolysosomal membranes in antigen export from endosomes in dendritic cells. The subject belongs to the remaining open issues in cross-presentation and is of significant interest since the long-time favored hypothesis of a role for Sec61 in antigen export is difficult to maintain in the light of recent evidence. Globally the authors demonstrate convincingly that absence of two different ESCRT-III subunits enhances export/leakage of soluble ovalbumin in a dendritic cell line, associated with enhanced cross-presentation. They also undertake a significant and conclusive effort to show that this is not linked to cDC activation by ESCRT knockdown, or effects on antigen uptake. However, I don't think that experimental system used is sufficiently suitable for demonstrating that the ESCRT-III machinery plays a role in physiologic cross-presentation, for reasons set out below.

Comments in detail:

* The principal experimental approach used is knockdown of the Chmp2a and Chmp4b ESCRT-III subunits. As the authors acknowledge, knocking down these proteins essentially kills cells after a few days, which forces them to use cells on day 3 after lentiviral transduction when 70% of cells are still viable (in itself a sub-optimal situation). Thus, functional experiments study cells with ultimately lethal membrane damage that leak proteins massively from endosomes, next to other consequences. I don't think that the fact that the cells cross-present more efficiently in a short time window before cell death can necessarily be extrapolated to a

healthy cDC. The paper lacks critical positive evidence for a function of ESCRT-III in the context of cross-presentation, which should, among others, reflect the fact that ESCRT-III presumably reseals membranes after very transient damage. I envisage several approaches to this.

We thank reviewer #2 for opening the discussion. Importantly, it has been shown that, following antigen encounter (especially in an infectious context), dendritic cells undergo a rapid turnover (Kamath *et al.*, 2002). Even if it is purely speculative, it is possible that, after pathogen detection, the decrease in ESCRT-III cellular levels (see heatmap depicted hereafter) results simultaneously in increased exporting and cross-presenting ability and impaired cell viability. We are now discussing this point in the manuscript, and have also addressed these issues experimentally.

For one the authors should over-express ESCRT-III subunits (hopefully compatible with normal viability) and check whether this compromises cross-presentation.

We plan to perform a rescue experiment (as developed in a previous section) to monitor possible decreased antigen export to the cytosol, potentially associated with improved viability.

To further address reviewer #2's point, we also used pharmacological inhibitors of necroptosis. Indeed, Green and colleagues have demonstrated in a very elegant study that low-grade necroptosis is induced at steady state and forms MLKL pores, responsible for damages, in biological membranes. In ESCRT-III-competent cells, these lesions are excised from membranes by ESCRT-III, and viability is therefore sustained. However, in ESCRT-III-deficient cells, these pores may accumulate and trigger cell death. We thus inhibited necroptosis using the GSK'872 inhibitor, that targets RIPK3 – the kinase phosphorylating and activating MLKL. We observed no robust effect on viability (slightly increased in one experiment, slightly decreased in the other one – possibly due to apoptosis induction by RIPK3 inhibitors described in Mandal *et al.*, Mol. Cell., 2014), while export was consistently and dramatically reduced in ESCRT-III deficient cells.

To get more definitive answers, we plan to silence RIPK3 and MLKL in ESCRT-III deficient cells. However, a full viability rescue might be difficult to achieve, given the multiple cell death pathways induced (Fig. R.1.7A and RS.1.8A). We attempted to inhibit apoptosis and pyroptosis

with z-Vad, but this drug seems to be insufficient to counterbalance pyroptotic signals in this context without causing toxicity.

Performing kinetic microscopy studies of fluorescent ESCRT-III recruitment to endosome or phagosome (see below), for example after uptake combined with a short-term pulse with LLOME, would also be helpful. The authors could also be further inspired by the paper by Dingjan et al who may have identified ROS as a physiologic trigger for membrane leakage in cross-presentation. As NOX activity is transient, a somewhat delayed but equally transient recruitment of ESCRT-III could be expected. Cross-presentation after LLOME incubation or pulse should also be studied.

We welcome the reviewer's suggestion. We have indeed assessed the dynamics of ESCRT-III recruitment using PhagoFACS (Figure 5.1.4B) and found Chmp4b to be recruited to phagosomes as early as 45 min after antigen stimulation.

We also considered performing cross-presentation assays with LLOME. However, this drug shows toxicity over 1h and makes the former experiment difficult to realize.

* Soluble OVA is useful but probably not the most relevant antigen for cross-presentation assays. The authors should also check cross-presentation of phagocytosed and receptor-targeted antigens. If accompanied by microscopy monitoring of Chmp2/4 recruitment to vesicles, experiments with other antigen forms might also reveal physiologic triggers for ESCRT-III activation.

We thank the reviewer for this suggestion. We performed the suggested cross-presentation assay with OVA-coated beads and found that presentation of phagocytosed antigen was also greatly increased in ESCRT-III knockdown cells. These new results have now been added to the manuscript in Fig. RS.1.7A.

We believe the physiological triggers of ESCRT-III activation in this context to be the occurrence of endolysosomal damages, the question then being what is the physiological trigger for such damages. On that aspect, our new results comparing galectin-3 *foci* formation in cDC1 and cDC2 suggest that cDC1 undergo endolysosomal damage at basal state. Further, the differences we observe between endotoxin-contaminated and endotoxin-free OVA suggest that the context in which antigen is encountered, more than its nature, can modulate the occurrence

of endolysosomal damages. Our results also point towards the involvement of the necroptotic machinery in inducing endosomal permeability.

* Given that off-target effects are always difficult to entirely rule out, a control experiment in which cDCs are reconstituted with the target of the knockdown using a plasmid lacking the shRNA target sequence is a standard control and should be added.

As developed in an earlier section, we plan to do it.

* The paper lacks an experiment showing by microscopy that Chmp2/4 knockdown cells actually fail to recruit ESCRT-III to endosomes, for example upon LLOME exposure.

We agree with the reviewer, this would be a very interesting experiment. We tried to detect Chmp2b by microscopy in Chmp4b-deficient cells, but due to the lack of suitable antibodies, we could not obtain a conclusive answer.

* Positive evidence for actual endosome repair by ESCRT-III would also be a valuable addition to the paper. For example, the authors could show whether control but not ESCRT-III deficient cDCs, treated with a short-term incubation with LLOME, recover endolysosome function (e.g. using Magic Red as indicator of protease activity, as done by Skowyra et al).

We agree with the reviewer: this experiment would indeed provide interesting evidence in favor of actual endosome repair, in addition to the galectin-3 experiment presented in Figure R.1.4C-4D.

* The statement on page 5/6 that cDC1 early endosomes express more ESCRT-III subunits than cDC2 should be modified since Fig. R.1.1C shows that one of the subunits (Chmp2a) targeted by the authors thus with major importance in the paper is actually expressed better in cDC2.

We apologize for the confusion. Chmp2a is indeed more abundant in early endosome of cDC2. But the trend is reversed in late endosomes and lysosomes, confirming that overall, ESCRT-III subunits are more recruited in endocytic compartments from cDC1 and cDC2.

* Another key point is the nature of the endocytic vesicle which ESCRT-III is recruited to. Not only the literature data (Skowyra *et al.*) but also data in this paper suggest that it is a late endosome/lysosome. The authors state that phagosome maturation is required for Chmp4b

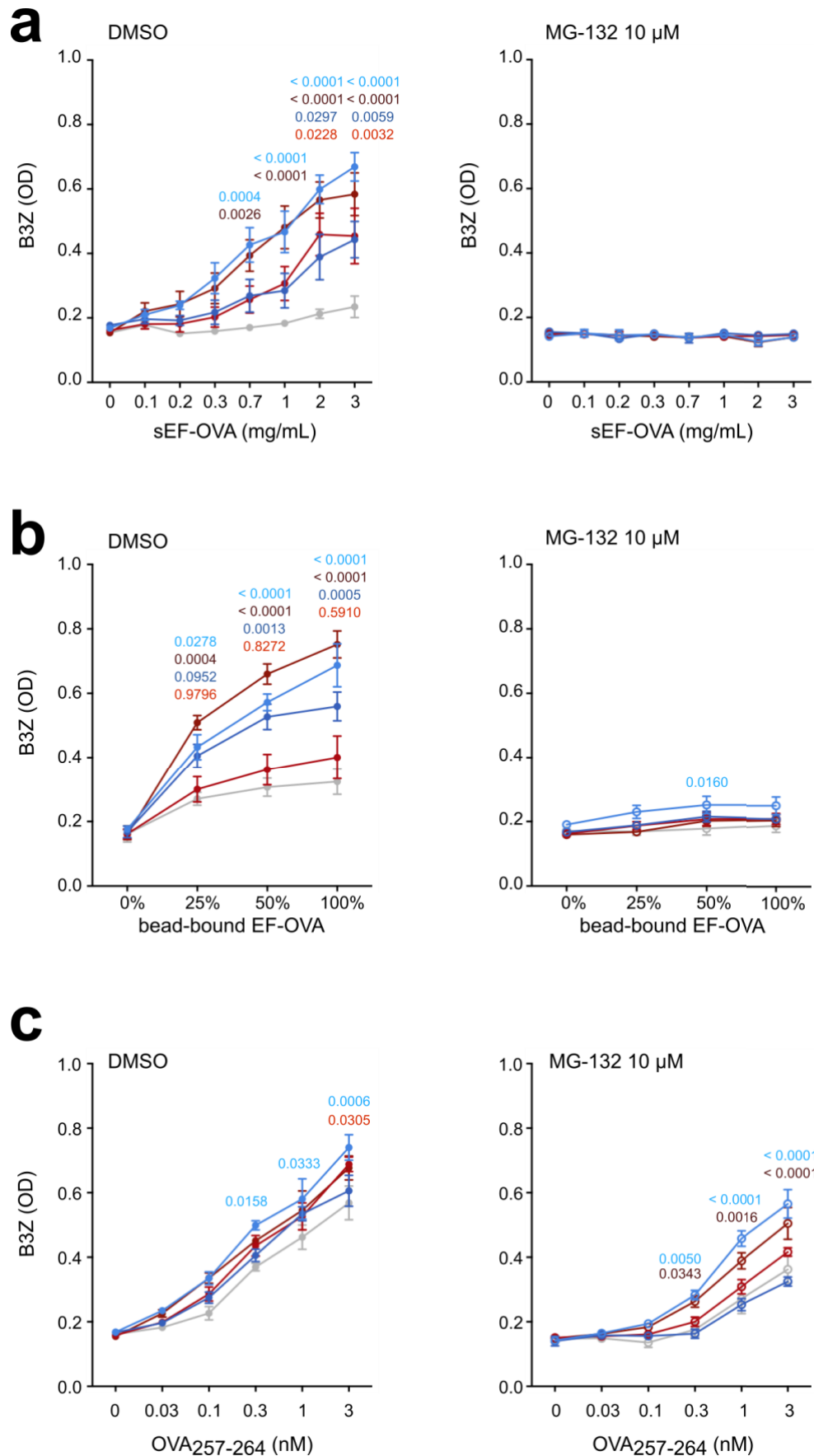


Figure Rev.1.2.: Cross-presentation of soluble of bead-coated endotoxin-free OVA in presence or absence of MG-132

The protocol used is described in the materials and methods section. 2way-ANOVA, mean and SEM, n = 3. Only exact p-values < 0.05 are shown, for clarity reasons.

recruitment to phagosomes in LLOME-treated cells, a logical finding given that LLOME requires activation by cathepsin C in lysosomes. This finding is somewhat unexpected since most authors including the Amigorena group (e.g. Alloatti *et al.*, Immunity 2015) assume that early endosomes are key for cross-presentation. This should be discussed and might also prompt further scrutiny as to the precise nature of the vesicles.

We agree with this statement. It is important to note that although phagosome maturation is also to some extent required for Chmp4b recruitment, the level of LAMP-1 recruitment we detect suggests the phagosomes to be at early stages of maturation, and hence retain low degradative capacity. Consistently, our proteomic dataset shows galectin-3 to be enriched in cDC1 both in early endosomes and lysosomes (see above section). We currently do not have any experimental set-up allowing to monitor simultaneously antigen export and markers for endolysosomal compartments. However, it will be very interesting to examine more precisely the nature of the compartment from which antigen leakage occurs in future studies. We have now included this notion in the discussion.

* The findings in this context also raise the question what cross-presentation pathway is involved in the ESCRT-III deficient cells. According to Skowyra, failure to repair endolysosomal membranes by the ESCRT machinery activates another pathway, lysophagy, a form of autophagy eliminating leaky vesicles. In microscopy this is associated with appearance of galectin punctae, which are also observed in this paper for ESCRT-III knockdown cells. If lysophagy is promoted in Chmp4b-deficient cross-presenting cells, it is conceivable that antigens are degraded in lysosomes, i.e. by lysosomal proteases. The authors should therefore demonstrate that cross-presentation in Chmp4b-deficient cells remains proteasome and TAP-dependent.

We performed cross-presentation assays in presence or absence of MG-132 and the results are shown in Figure Rev.1.2. They suggest the sole use of the cytosolic pathway (in agreement with the fact that cDC1, from which MutuDC are derived, only use this pathway at steady state (Segura *et al.*, 2009), even if we can't totally rule out some unspecific effect of MG-132 on the lysosome. We have included this figure for the sole attention of the reviewers, but would be happy to include it in the manuscript if they feel it would be useful.

* The authors might want to provide a description of the Mutu cell line, comparing it to cDC1 insofar this can be done.

We thank the reviewer for this suggestion. We have now included a short paragraph in the text comparing MutuDC to cDC1, referring to the original paper describing the cell line (Fuertes-Marraco *et al.*, 2012).

* Many figure panels lack statistical evaluation: R.1.2e, R.1.3b, R.1.3d, R.1.3e, R.1.4b, R.1.4d, R.1.4e, R.1.6e/f/g, RS.1.2a, RS.1.2b, RS.1.2c, RS.1.2d, RS.1.3a/c/d, RS.1.4d/e, RS.1.6b. If this is because the data shown lack statistically significant difference, this should be said.

We apologize for the confusion. Statistics have now been added. Unless otherwise specified, exact p-values are now reported throughout the whole manuscript. The meaning of lacking p-value was clarified in the figure legends.

Reviewer #3:

In a manuscript entitled “Endocytic membrane repair by ESCRT-III controls antigen export to the cytosol during antigen cross-presentation”, Gros et al provide evidence for a model where the translocation of antigens from endocytic organelles to the cytoplasm for crosspresentation involves membrane ruptures (rather than an active transport through a transporter system).

The authors provide solid evidence with numerous controls that the ESCRT-III complex negatively regulates crosspresentation, supporting the concept that membrane leakage is involved in the transfer of antigens from endocytic organelles to the cytoplasm. This is a very important concept worthy of publication. What this study does not provide, however, is the mechanism by which leakage is induced to allow crosspresentation. The manuscript is very well written.

We thank reviewer 3 for stating our results unravel an important concept. We believe the new results we generated and included in this paper on the role of the necroptotic machinery in inducing endolysosomal damages provide the beginning of an answer to the mechanism.

The data on increased leakage and crosspresentation in cells silenced for ESCRT-III complex subunits are convincing. What is, somehow, missing is how the ESCRT-III complex is

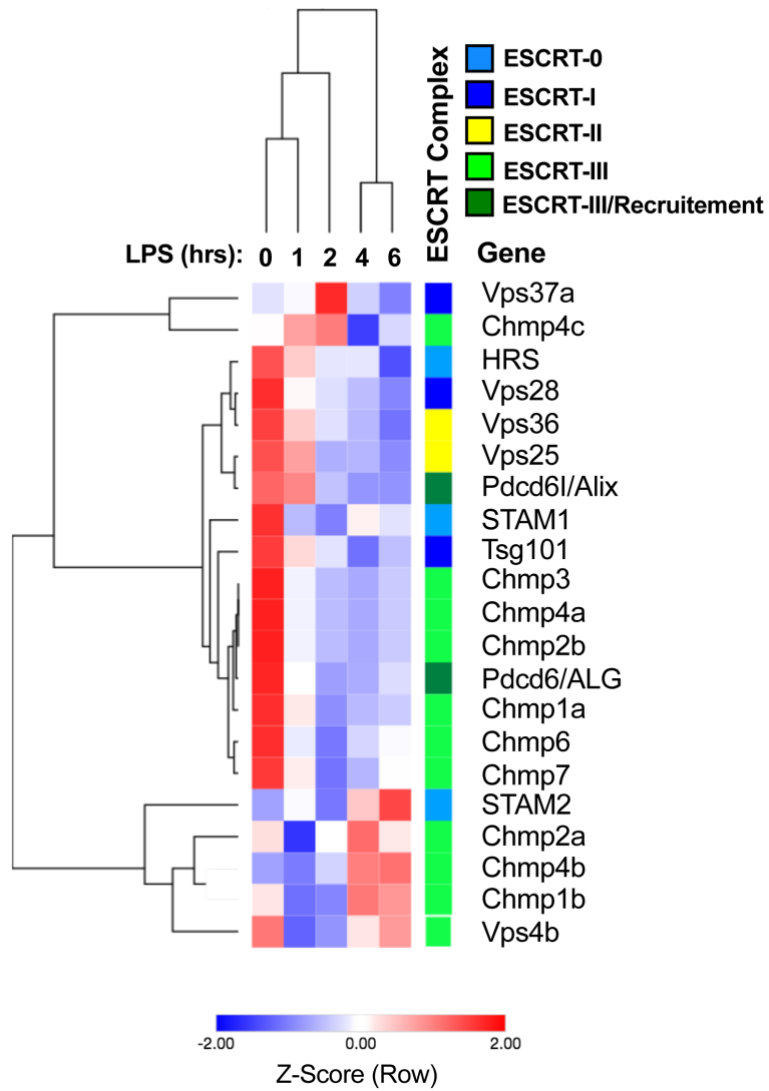


Figure Rev.1.3.: Heatmap based on transcriptomic RNAseq data (in BMDCs) from Garber *et al.*, 2012.

modulated in WT cells in conditions known to increase the level of crosspresentation in APCs (e.g. INF-g treatment, heat stress). For example, is the recruitment of ESCRT-III subunits to endosomes/phagosomes or its expression regulated in a time course that would explain the stimulation of crosspresentation by a short heat stress. In other words, how is the interplay between endocytic/phagocytic organelles and the ESCRT-III complex is modulated in WT cells to allow or restrict crosspresentation.

We thank reviewer #3 for raising this important point. Based on an available dataset (Garber *et al.*, 2012), we constructed a heatmap (Figure Rev.1.3) reflecting the modulation of ESCRT-III levels after LPS-treatment in BMDCs (LPS is known to increase antigen export to the cytosol and cross-presentation at early timepoints. Gil-Torregrosa *et al.*, 2004). The results clearly show that LPS treatment decrease the transcriptomic levels of the vast majority of ESCRT-III subunits, thereby correlating with possible increased cytosolic export and cross-presentation.

Minor issues

In Figure R.1.1A, although a clear tendency is observed, the results do not appear to be significantly different. Perhaps the number of experiments should be increased to clearly conclude if the difference is significant.

We repeated the experiment, and plan to perform it a second time to get significant results.

In Figure R.1.1C, using MS to quantify and compare protein levels requires that multiple biological replicates be measured (error bars would then provide an idea of the significance). This being said, I wonder why Western blotting was not used here to confirm some of the findings?

Although we agree western blot would have been the most adequate way to validate some of our findings, we were not able to obtain reliable Chmp4b and Chmp2a antibodies. Hence, we used RT-qPCR to assess silencing efficiency in all experiments performed and were not able to confirm the proteomics results by western blot.

On page 6, the sentence “To further investigate the features of ESCRT-III silenced cells, we tested...”, investigate the “features” is not very clear.

We modified the sentence and hope it is clearer.

ARTICLE II : SMALL MOLECULE ENHANCERS OF ENDOSOME-TO-CYTOSOL IMPORT AUGMENT ANTI- TUMOUR IMMUNITY

Patrycja Kozik^{1,2,6*}, Marine Gros¹, Daniel N. Itzhak³, Leonel Joannas¹, Joao G. Magalhaes¹,
Andrés Alloatti¹, Del Nery Elaine⁴, Georg H.H. Borner^{3,5}, Sebastian Amigorena^{1,5*}

¹ INSERM U932, PSL Research University, Institut Curie, 75005 Paris, France

² Current address: MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 0QH, UK

³ Max Planck Institute of Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany

⁴ Institut Curie, PSL Research University, Department of Translational Research -
Biophenics High-Content Screening Laboratory, Cell and Tissue Imaging Facility
(PICT-IBiSA), F-75005, Paris, France

⁵ These authors are co-senior authors

⁶ Lead contact

* Joint corresponding authors

(article en révision dans Cell Reports)

Résumé

Contexte : Contrairement aux travaux présentés précédemment dans ce manuscrit de thèse, l'étude exposée ici ne vise pas à caractériser le déroulement de l'export cytosolique des antigènes, mais à tirer profit du caractère limitant de cette étape cellulaire en vue d'augmenter l'efficacité de la présentation croisée et des réponses anti-tumorales qui en résultent. Alors que l'immense majorité des traitements immunothérapeutiques mis sur le marché repose sur la levée des « freins moléculaires » (« checkpoints ») pesant sur les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et limitant leur fonction, ce projet expérimental propose le développement d'une stratégie annexe et complémentaire qui vise à augmenter la présentation croisée d'antigènes à ces mêmes lymphocytes et à favoriser leur activation.

Méthodes : Afin d'identifier des modulateurs pharmacologiques positifs de l'export cytosolique des antigènes, un crible de plus de 700 drogues approuvées par la Food and Drug Administration a été réalisé dans une lignée de cDC1 : les MutuDC. La validation des composés identifiés au cours du crible a ensuite été effectuée *in vitro* grâce à des tests fonctionnels de présentation croisée et *in vivo* au travers d'expériences de croissance tumorale.

Résultats : La réalisation du crible mentionné précédemment a permis l'identification d'un composé particulièrement prometteur, appelé prazosine (famille des quinazolinamines), et normalement utilisé comme antihypertenseur. Dans les cellules dendritiques, cette drogue provoque une perméabilisation spécifique du compartiment endolysosomal, à l'origine d'une fuite accrue des antigènes dans le cytosol. Cette augmentation de l'export cytosolique des antigènes s'accompagne également d'un accroissement majeur de l'efficacité de la présentation croisée *in vitro*. Enfin, l'administration de la prazosine, utilisée en combinaison avec des anticorps inhibiteurs de « checkpoints », confère aux souris un degré élevé de protection vis-à-vis de la croissance tumorale.

Conclusion : Cette étude démontre que l'export cytosolique des antigènes constitue une étape limitante de la présentation croisée. Sa modulation, par l'intermédiaire de drogues pharmacologiques comme la prazosine, pourrait potentialiser l'efficacité des traitements immunothérapeutiques actuels basés sur l'utilisation d'anticorps inhibiteurs de checkpoints (anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab), -PDL1 (avelumab) ou -CTLA-4 (ipilimumab)).

RÉSULTATS

Contribution personnelle : J'ai réalisé une partie des expériences de validation *in vitro* de la prazosine, présentées en Figure R.2.6. (panels 6A, 6C et 6E).

Abstract

Efficient cross-presentation of antigens by dendritic cells (DCs) is critical for initiation of anti-tumour immune responses. Yet, several steps of antigen intracellular traffic during cross presentation are still incompletely understood. In particular, the molecular mechanisms and the relative importance of antigen import from endocytic compartments into the cytosol is still a matter of debate. Here, we asked whether antigen import into the cytosol is rate-limiting for antigen cross presentation and anti-tumour immunity. By screening 700 FDA-approved drugs, we identified 37 import enhancers. We focused on prazosin and tamoxifen, and generated proteomic organellar maps of drug-treated DCs, covering the subcellular localisations of over 2000 proteins. By combining organellar mapping, quantitative proteomics, microscopy, and bioinformatics, we conclude that import enhancers undergo lysosomal trapping leading to membrane permeation and antigen release into the cytosol. Enhancing antigen import facilitates cross-presentation of both soluble and cell-associated antigens. Systemic administration of prazosin led to reduced growth of MC38 tumours and to a synergistic effect with checkpoint immunotherapy in a melanoma model. Thus, inefficient antigen import into the cytosol limits antigen cross presentation, restraining the potency of anti-tumour immune responses and efficacy of checkpoint blockers.

Introduction

Accumulation of mutations in cancer is a key factor during disease progression, yet, it can also render cancer cells vulnerable to cytotoxic T cells (CTLs). T cell-mediated anti-tumour immune responses are primarily initiated by type 1 conventional dendritic cells (cDC1s) (Böttcher and Reis e Sousa, 2018). While these immune responses can in principle prevent or restrict tumour growth, they are usually not nearly as potent as responses against pathogens. In recent years, checkpoint inhibitors emerged as a promising tool to enhance anti-tumour immunity and were effective in providing long lasting remissions. Nevertheless, their efficacy is largely dependent on pre-existing immunity and the benefits are only seen in a fraction of patients (Crittenden *et al.*, 2018). Therefore, a better understanding of the mechanisms and rate-limiting steps involved in priming of naive tumour-specific T cells will be critical for improving immunotherapeutic strategies.

Efficient priming relies on the delivery of three signals to naive T cells: signal 1 - relevant antigen (e.g. a mutated peptide) presented in the context of MHC class I; signal 2 - co-stimulatory molecules expressed by antigen presenting cells (APCs); and signal 3 - cytokines, which ultimately determine whether the response will lead to immunity or tolerance. Many approaches have been explored to deliver appropriate signals 2 and 3, including stimulating DCs maturation with a variety of TLR ligands (e.g. poly I:C or CpG) or growth factors (e.g. FLT3L) (Brunner *et al.*, 2000; Hammerich *et al.*, 2019; Salmon *et al.*, 2016; Sánchez-Paulete *et al.*, 2018). However, increasing the efficiency of presentation of tumour antigens on MHC class I has proven more challenging.

Tumour antigens are presented by APCs via a process termed cross-presentation. Cross-presentation involves endocytic uptake of exogenous proteins followed by generation of short peptides that can be loaded onto MHC class I. Two models have been proposed to describe where peptide generation takes place (reviewed in (Gros and Amigorena, 2019)). In the vacuolar model, peptides are generated by endolysosomal proteases (primarily cathepsins) and directly loaded onto MHC class I (Shen *et al.*, 2004). In the cytosolic model, antigens are imported into the cytosol, processed by the proteasome, and delivered into the lumen of MHC class I-containing compartments via the TAP transporter (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003; Kovacovics-Bankowski and Rock, 1995). Considering differences in cleavage-

specificities among the different proteases, the cytosolic model provides an attractive explanation of how APCs would generate peptides similar to those presented by target cells, where the majority of epitopes is also generated by proteasomes. Both TAP- and immunoproteasome-deficient mice are defective in cross-presentation (Palmowski *et al.*, 2006; Rock and Shen, 2005), but whether these effects are indeed due to specific inhibition of cross-presentation, and whether the cytosolic pathway is dominant *in vivo* still requires verification. Similarly, mechanistic details of endosome-to-cytosol transport have remained elusive.

Irrespective of the precise mechanism, the importance of cross-presentation in initiation of anti-tumour responses has now been demonstrated in a variety of mouse models. cDC1s appear to be most efficient cross-presenters *in vivo* and *Batf3*^{-/-} mice that lack cDC1s, do not mount efficient T cell responses (Hildner *et al.*, 2008). In mice with a *Wdfy4* deletion (Theisen *et al.*, 2018) or a DC-specific knockout of *Sec22b* (Alloatti *et al.*, 2017), cDC1s are present but deficient in the ability to cross-present. Again, both models are unable to prime naive T cells against tumour-associated antigens and fail to control tumour growth. Similar to cDC1-deficient mice (Sancho *et al.*, 2008), *Sec22b* knockouts are also resistant to treatment with checkpoint inhibitors. These data argue for an important role of cross-presentation in anti-tumour immunity. Indeed, delivering tumour antigens to cross-presenting cells (e.g. via antibody-antigen conjugates), has been effective in promoting CTL responses (Bonifaz *et al.*, 2002; Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). In the clinic, vaccination with long peptides comprising neoepitopes has also been successfully used to boost generation of tumour-specific T cells (Ott *et al.*, 2017). These approaches of boosting antigen presentation are, however, costly to implement as they require prior identification of cancer neoantigens (e.g. through next generation sequencing of tumour samples).

Here, we present a strategy for enhancing efficiency of T cell priming, by facilitating antigen presentation by DCs. This study was based on the hypothesis that import of internalised antigens into the cytosol might be limiting for the efficiency of cross-presentation. With this in mind, we set up an assay to screen a library of over 700 FDA-approved compounds to identify enhancers of antigen import. We demonstrated that these molecules indeed facilitated cross-presentation of both soluble and cell-associated antigens. To evaluate the biological activity of two import enhancers, prazosin and tamoxifen, we generated comprehensive proteomics-based

RÉSULTATS

organellar maps from treated and untreated cells. We established that our most potent compound, prazosin, has a highly specific effect on endolysosomal membrane permeability. This encouraged us to pursue *in vivo* studies, where we demonstrated that systemic administration of prazosin leads to better control of tumour growth and synergises with checkpoint-based anti-tumour immunotherapy.

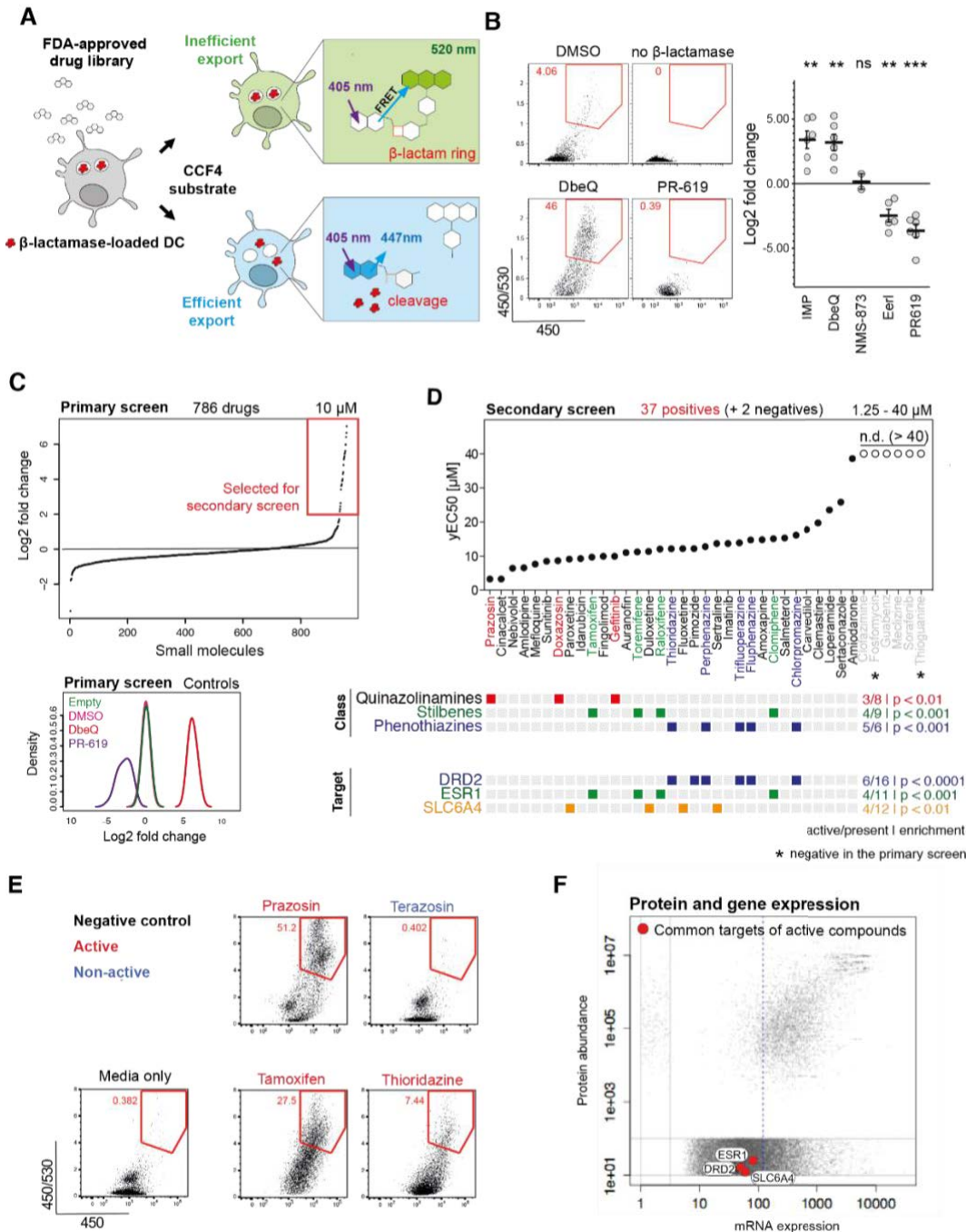


Figure R.2.1. Small molecule screen to identify enhancers of antigen import into the cytosol.

(A) Schematic representation of the β -lactamase assay used to monitor the efficiency of antigen import into the cytosol. MutuDCs were fed with β -lactamase for 3h followed by 2h incubation with small molecules (at 37°C). CCF4 loading was performed at RT for 1h, and followed by 16h incubation at RT to increase the sensitivity of the assay (Zlokarnik *et al.*, 1998). Change in CCF4 fluorescence was monitored by flow cytometry.

(B) Differential effects of ERAD inhibitors on antigen import into the cytosol. Representative flow cytometry data for selected ERAD inhibitors and quantification of the fold change in β -import. Within each condition, dots represent data from independent experiments, and lines represent means \pm SE.

(C) Results from the FDA library screen: fold change in the efficiency of antigen import into the cytosol for the control wells (bottom panel) and for the 786 tested drugs (top panel). The screen was performed once and 37 compounds were selected for the secondary screen (highlighted with the red box).

(D) Results from the secondary screen of 37 compounds. Each drug was tested at five concentrations in two independent experiments. yEC50 (concentration required for 50% of maximal activity) values were calculated as described in Figure RS.2.2. Information about chemical classes and candidate targets was obtained from DrugBank database. The classes and targets enriched in the group of active vs non-active compounds are represented with coloured squares. The enrichment of targets for hits (compared to the entire library) was calculated using Fisher's test.

(E) Examples of the flow cytometry profiles in the antigen import assay for selected active and non-active compounds.

(F) Analysis of gene and protein expression in CD8⁺ cDC1s. mRNA expression data for CD8⁺ splenic DCs was downloaded from the Immgen.org database and whole cell proteomic abundance data were generated by mass spectrometry from MutuDCs. 7427 proteins were detected and full absolute copy number proteome data of MutuDCs are available via the web resource (<http://dc-biology.mrc-lmb.cam.ac.uk>). The blue line indicates the threshold for expression. The points between the grey vertical lines represent proteins for which corresponding microarray probes were not identified in the Immgen dataset. The points between the grey horizontal lines represent genes for which the corresponding proteins were not detected.

See also Figure RS.2.1, RS.2.2.

Results

Selected ERAD inhibitors enhance antigen import

ER-associated protein degradation (ERAD) machinery has been proposed to play a key role in import of antigens from endosomes and phagosomes into the cytosol (Giodini and Cresswell, 2008; Imai *et al.*, 2005; Zehner *et al.*, 2015). Recently, however, we demonstrated that mycolactone, a potent inhibitor of Sec61 (a candidate ERAD translocon), does not inhibit antigen import. Here, we initially employed a pharmacological approach to evaluate the contribution of other ERAD components to antigen import. We selected a range of ERAD inhibitors and tested them using a β -lactamase-based antigen import assay (Figure R.2.1A) (modified from (Cebrian *et al.*, 2011)). To prevent tested compounds from affecting antigen uptake, we pulsed MutuDCs with β -lactamase for 3 hours, and subsequently treated them with the different inhibitors for 2 hours. To detect β -lactamase translocation into the cytosol, we loaded the cells with a cytosolic β -lactamase substrate, CCF4. When β -lactamase enters the cytosol, it cleaves the β -lactam ring in the CCF4 and disrupts FRET between its two subunits causing a shift in fluorescence from blue to green (Figure R.2.1A). We monitored this change in fluorescence by flow cytometry. As a model system, we used the cell line MutuDC, which phenotypically corresponds to splenic cDC1s (Fuertes Marraco *et al.*, 2012) (see also Figure R.2.1F). The two compounds that target the ubiquitin pathway, PR-619 and Eeyarestatin I, inhibited antigen import (consistent with previous data (Grotzke *et al.*, 2017; Zehner *et al.*, 2015)). Unexpectedly, a p97 inhibitor, DbeQ, and a β -importin inhibitor, importazole, enhanced antigen import (Figure R.2.1B). This effect was not recapitulated with a more potent p97 inhibitor, NMS-873, suggesting it might be due to off-target activity. Hence, while these data highlight the role of the ubiquitin system in antigen import, they did not provide evidence supporting the role of other ERAD components. The dramatic enhancement of antigen import observed with two of the compounds suggests that the process is relatively inefficient, and that it may be rate-limiting for cross-presentation.

β -lactamase-based screen for enhancers of antigen import

Enhancement of antigen import by DbeQ and importazole established a proof of concept that this process can be pharmacologically manipulated, and prompted us to develop a

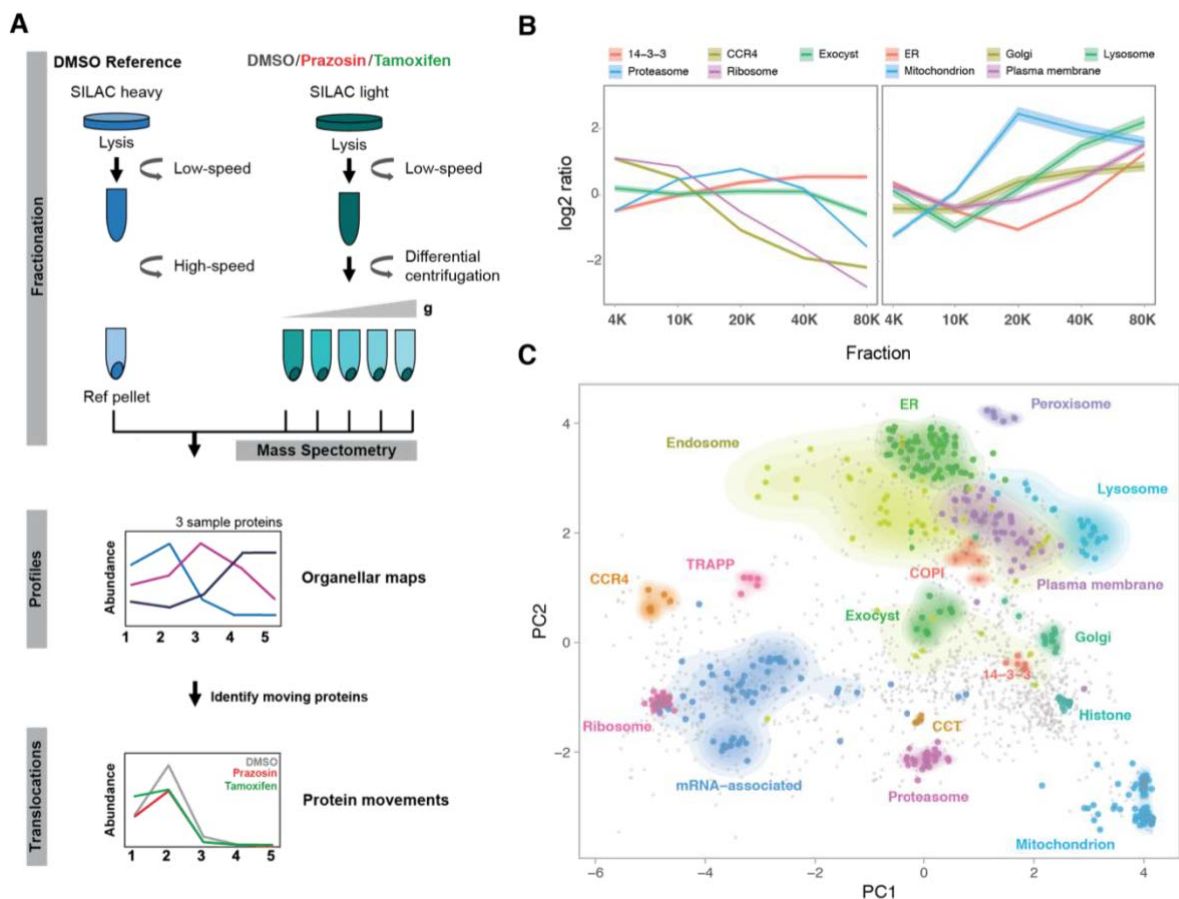


Figure R.2.2. Organellar mapping in dendritic cells.

(A) Schematic representation of the fractionation profiling approach for making organellar maps. Metabolically labelled (SILAC heavy (untreated) and light (untreated or drug treated)) MutuDCs are lysed mechanically. Post-nuclear supernatant from light labelled cells is subjected to a series of differential centrifugation steps, to separate organelles partially. In parallel, post-nuclear supernatant from heavy labelled cells is pelleted at high speed to obtain a reference fraction, which is spiked into each of the light fractions. Quantitative mass spectrometry allows the accurate determination of abundance distribution profiles across the light subfractions for individual proteins. Proteins associated with the same organelle have similar profiles, and different organelles have distinct profiles. Principal Component Analysis is used to visualize organellar clusters.

(B) Examples of profiles of selected organelles and protein complexes from vehicle treated MutuDCs.

(C) Organellar maps of MutuDCs visualized by Principal Component Analysis. The first two principal components account for >90% of the variability in the data. Marker proteins of various organelles and known protein complexes are shown in colour.

See also Figure RS.2.3.

screen for small molecule enhancers to investigate the molecular mechanisms of antigen import into the cytosol. We performed the screen in MutuDCs using the β -lactamase-based antigen import assay, and treated the cells with the 786 small molecules from a library of FDA-approved drugs. DbeQ and PR-619 were used as controls on each plate to track data quality (Figure R.2.1C, lower panel). We selected for validation 37 drugs that increased antigen import at least two-fold in the primary screen. Two non-active compounds were also included as additional negative controls. In the secondary screen, each compound was tested in two biological replicates at five different concentrations to determine the EC50s (Figure R.2.1D and Figure RS.2.2). 34 out of the 37 compounds were active also in the secondary screen (92% validation rate, 4.3% hit rate). Among the validated import enhancers, we identified three classes of chemically related compounds: quinazolinamines (prazosin, doxazosin, and gefitinib), stilbenes (clomiphene, raloxifene, tamoxifen and toremifene), and phenothiazines (chlorpromazine, fluphenazine, perphenazine, thioridazine, trifluoperazine) (Figures R.2.1D and R.2.1E).

To understand the mechanism of antigen import enhancement, we first searched for common targets among the active compounds. Using the DrugBank database (Law *et al.*, 2014), we identified a total of 766 previously described targets for the compounds present in the FDA library. Three of these targets were significantly enriched among active versus non-active compounds: estrogen receptor (ESR1), dopaminergic receptor (DRD2), and serotonin transporter (SLC6A4) (Figure R.2.1D lower panel). However, none of these three proteins is actually expressed in CD8⁺ cDC1s according to Immgen.org mRNA expression data; they are also not present among the 7,427 proteins we detected in MutuDC by proteomics (Figure R.2.1F). Considering that out of 11 estrogen receptor modulators present in the library, antigen enhancement was only observed for inhibitors from the stilbene family, the enrichment appeared to be linked to the structure of these compounds, rather than to the inhibition of known targets. Interestingly, both DbeQ and importazole belong to the same chemical family as the most potent enhancer identified in the screen, prazosin (quinazolinamines). Hence, 50% of the ten quinazolinamine derivatives tested in this study facilitated import of internalised antigens, despite being marketed as inhibitors of different targets.

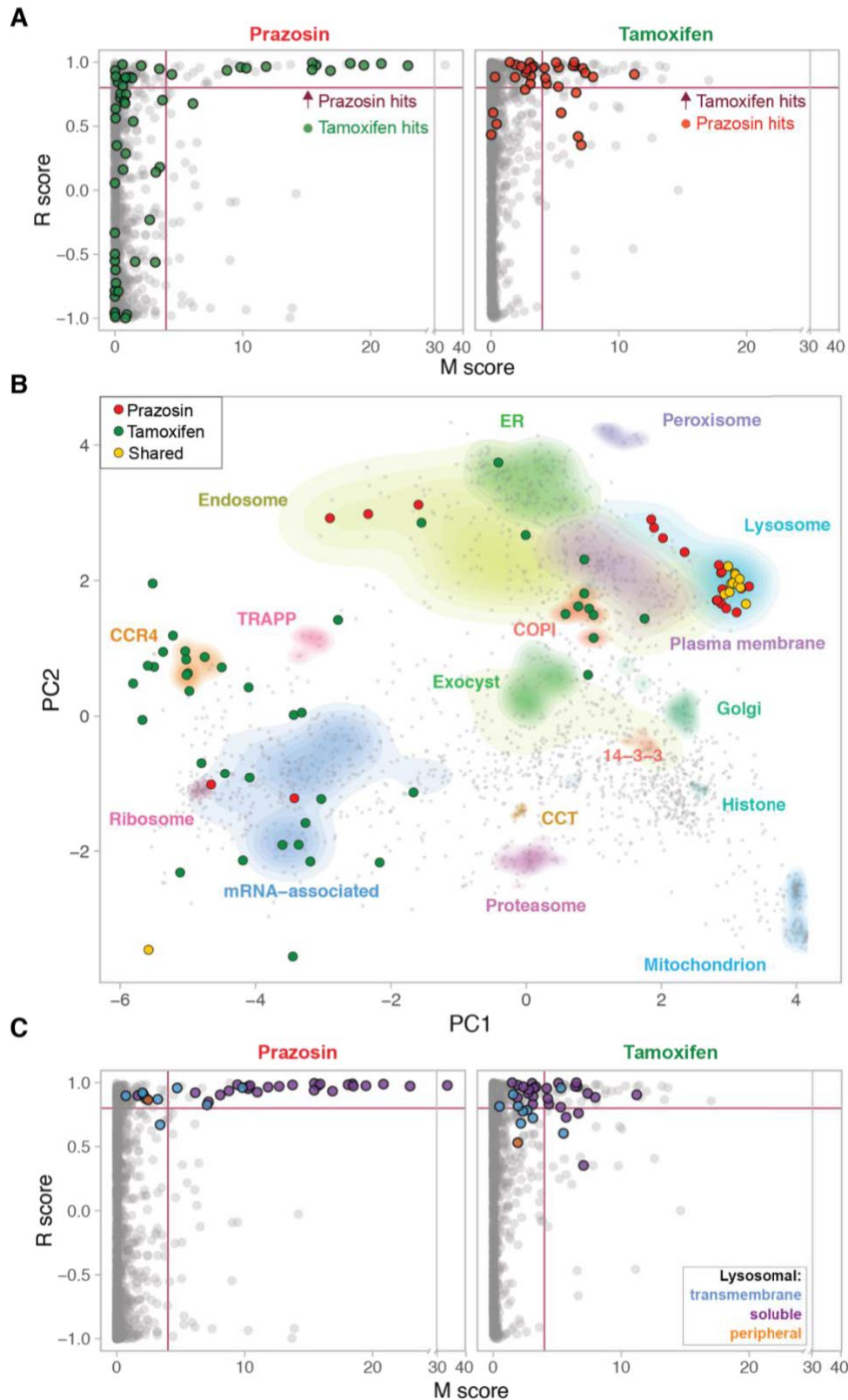


Figure R.2.3. Dynamic organellar mapping to identify the subcellular changes in protein distribution upon drug treatment.

MutuDCs were treated with either prazosin, tamoxifen or DMSO (control) for 4 h, in biological duplicate and samples were processed as described in Figure R.2.2A. Statistical comparison of organellar maps made with different treatments was performed to identify proteins with profile shifts/altered subcellular localisation.

(A) Drug-induced shifts in protein subcellular localization detected using a ‘MR’ plot analysis. For each protein, the movement (M score) and the reproducibility of the movement (R score) between maps was determined. Purple lines indicate cut-offs for significance. In prazosin plot the hits from tamoxifen treatment are shown for comparison (and vice-versa).

(B) Shifting proteins from tamoxifen and prazosin-treated samples represented on the organellar map of MutuDCs.

(C) MR plot highlighting all detected lysosomal proteins (soluble, transmembrane and peripheral (located on the cytosolic side of the membrane)).

Organelle maps to determine biological activity of small molecules in DCs

A variety of “hidden phenotypes” and promiscuous effects have been observed for numerous clinically approved drugs (MacDonald *et al.*, 2006). These additional phenotypes can often be beneficial for novel therapeutic indications, yet there are few approaches to detect the cellular effects of a compound in an unbiased manner. To characterise the mechanism of antigen import enhancement, we developed a generic strategy to evaluate the biological activity of pharmacological compounds through comparative spatial proteomics (Figure R.2.3A). The approach is based on our previously developed method for generating organelle maps, to pinpoint the subcellular localisations of thousands of proteins in a single experiment (Itzhak *et al.*, 2017; 2018). Many if not most cell biological processes are accompanied by protein subcellular localisation changes (Lundberg and Borner, 2019). The comparison of organelle maps made under different physiological conditions allows the capture of drug induced protein translocations (Itzhak *et al.*, 2016), and thus provides a universal and scalable tool for inferences about cellular responses and drug targets.

To generate organelle maps, we separated post-nuclear supernatants from MutuDCs into five pellets obtained by differential centrifugation (Figure R.2.2A). Each pellet was mixed 1:1 with a SILAC heavy “reference” membrane fraction and the samples were analysed by MS. To generate abundance profiles, we calculated heavy-to-light ratio for each protein in each fraction. Using organelle markers we previously established for HeLa cells (Itzhak *et al.*, 2016), we confirmed clustering of proteins from different organelles (e.g. lysosome, peroxisome, and mitochondria) and protein complexes (e.g. proteasome, CCR4-NOT complex) (Figure R.2.2B, R.2.2C). These maps cover over 2000 proteins expressed in DCs can be mined for protein subcellular localisation, absolute abundance (copy numbers and cellular concentrations), as well as nearest neighbours (i.e. potential interaction partners) via a web resource (<http://dc-biology.mrc-lmb.cam.ac.uk>, see also Figure RS.2.3).

To investigate the effects of import enhancers on organelle dynamics, we prepared organelle maps from MutuDCs treated with prazosin, tamoxifen, or vehicle (control), for 4 h in biological duplicates (six maps in total). To detect significant protein translocations, maps of control and drug-treated cells were compared using MR (Movement and Reproducibility) plot analysis (Figure R.2.3A). Tamoxifen treatment led to spatial rearrangements of 56 proteins in

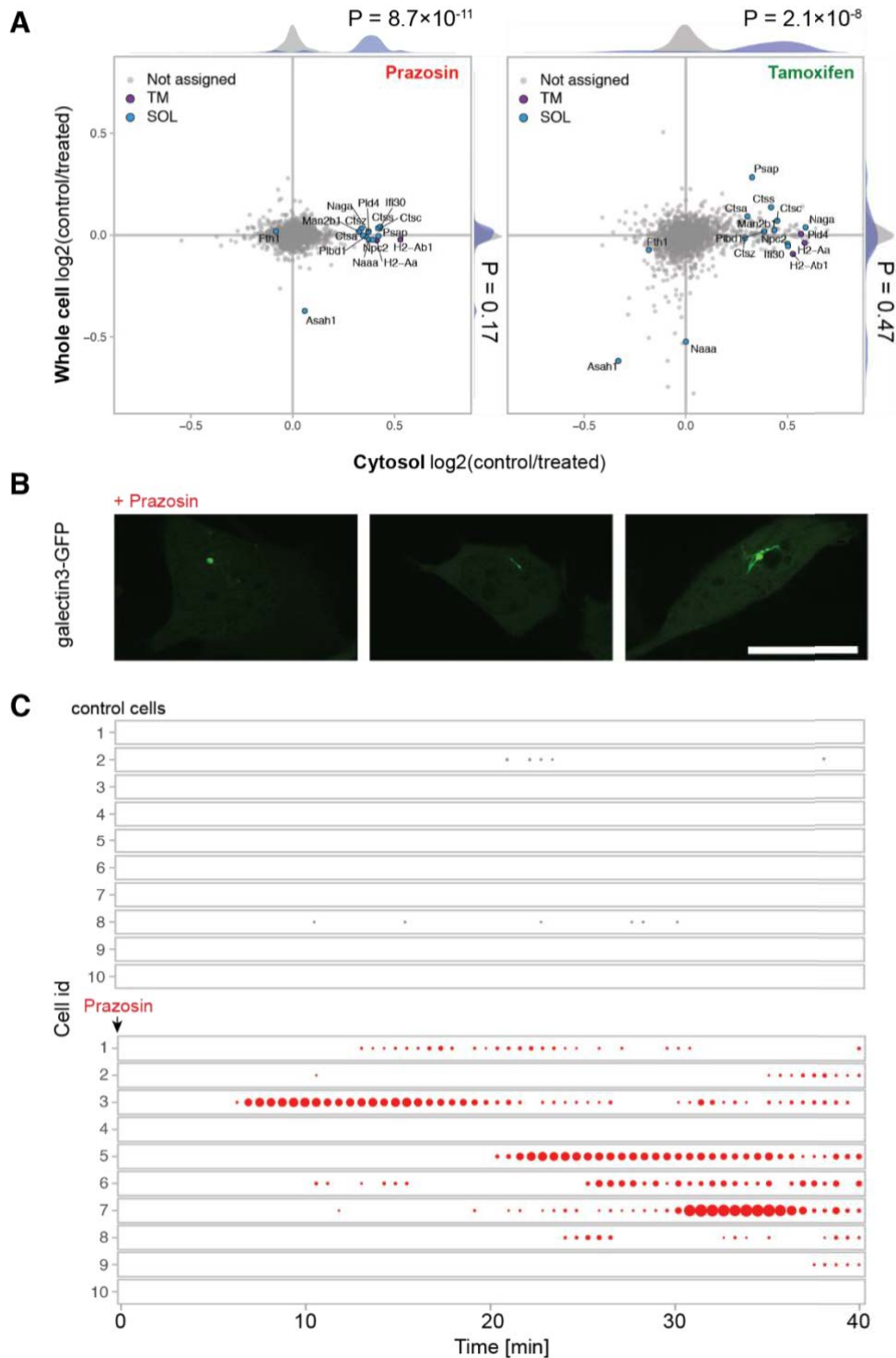


Figure R.2.4. Prazosin and tamoxifen lead to lysosomal leakage.

(A) Analysis of whole cell proteome and cytosol fractions from MutuDCs treated with prazosin, tamoxifen, or DMSO (control) for 4 h. The relative abundance of proteins from prazosin or tamoxifen vs vehicle-treated cells in whole cell vs cytosol proteomes. The histograms show distributions of all (grey) vs lysosomal (blue) proteins. P values were calculated using the Kolmogorov–Smirnov test. $n=2$ for whole cell lysates (SILAC quantification), $n=4$ for cytosol fractions (label-free quantification).

(B, C) MutuDCs stably expressing Galectin3-YFP were treated with prazosin and imaged continuously for 40 min. (B) Examples of Galectin3-YFP-positive structures observed in prazosin-treated cells. (C) Quantification of Galectin3-YFP recruitment in control and prazosin-treated cells. Circle sizes correspond to the area of Galectin3-YFP spot(s) in each cell at each time point. Representative data from ten cells imaged in one of two independent experiments.

See Figure RS.2.4 and Supplemental Movie RS.2.4.

MutuDCs, whereas prazosin was more specific, and affected only 33 proteins. The majority of prazosin hits (27/33) mapped to the lysosomal compartment (Figure R.2.3B). These hits comprised 23 out of 24 detected soluble lysosomal enzymes (e.g. cathepsins) as well as three transmembrane proteins (Figure RS.2.3). Out 13 proteins shifting with both drug treatments, 12 also mapped to lysosome (and for the remaining lysosomal prazosin hits, the M scores in the tamoxifen sample were just below the threshold). Other proteins that shifted upon tamoxifen treatment included components of COPI vesicles, stress granules (e.g. Caprin1, G3bp1), or CCR4-NOT complex (Figure R.2.3B). Thus, while tamoxifen has pleiotropic effects and prazosin is highly specific, there is a common effect of both compounds on lysosomal proteins.

We went on to analyse the overall behaviour of lysosomal proteins detected in MutuDCs in more detail (Figure R.2.3C). While the majority of soluble lysosomal proteins had high M scores (shift to the right of the MR plot), lysosomal transmembrane proteins show little or no translocation (Figure R.2.3D). This difference in behaviour of soluble and transmembrane proteins suggests that lysosomal contents are either secreted into the extracellular space or leaked into the cytosol.

Prazosin and tamoxifen induce lysosome permeability

To determine whether lysosomal contents in prazosin and tamoxifen treated cells are secreted or leaked, we performed quantitative proteomic analyses of whole cell extracts and cytosolic fractions. We observed significantly elevated levels of lysosomal enzymes in the cytosol of prazosin and tamoxifen-treated MutuDCs relative to control cells (Figure R.2.4A). Since the levels of these proteins were not changed in whole cell proteome (Figure R.2.4A), we concluded that both prazosin and tamoxifen facilitate lysosomal leakage. Similar to what we observed using organellar maps, the prazosin effect is mostly restricted to lysosomal proteins, whereas tamoxifen affects a larger and more diverse set of proteins.

To rule out that the observed lysosomal leakage was caused by increased compartment fragility and enhanced rupture during cell fractionation, we tested permeability of endolysosomal compartments *in vivo*. To this end, we used galectin-3-YFP probe and video microscopy. Galectin-3 is a cytosolic protein that associates with the carbohydrates on the luminal side of the endolysosomal compartments when membranes are damaged (Thurston *et*

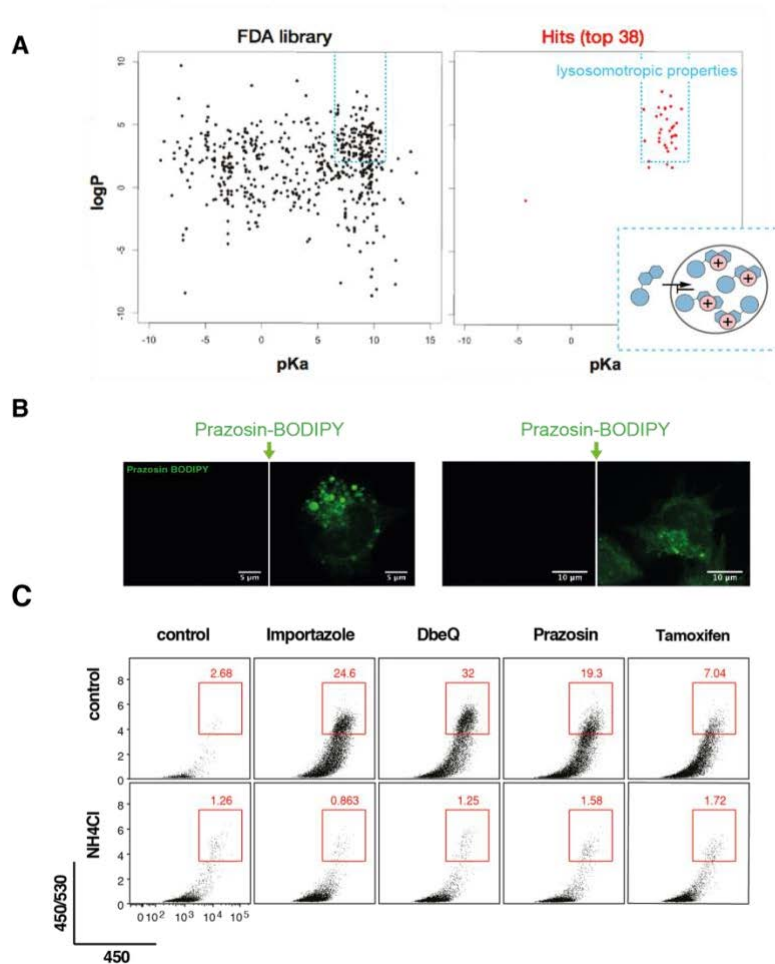


Figure R.2.5. Antigen import enhancement is a consequence of lysosomal trapping.

(A) Physicochemical properties (according to DrugBank data) of all the compounds present in the FDA library and of those active in the antigen import assay ($yEC_{50} < 40 \mu\text{M}$, see Figure R.2.2D). All but one of the hits have physicochemical properties similar to those of lysosmotropic compounds (blue box). In the inset, schematic representation of the mechanism of lysosomal trapping. Membrane permeable small molecules diffuse freely across the membrane of acidic compartments. Protonation of weakly basic residues decreases membrane permeability and leads to accumulation of protonated compounds in the endo-lysosomal lumen.

(C) MutuDCs cells were imaged immediately before and after addition of $5 \mu\text{M}$ prazosin-BODIPY. Data representative from three independent experiments.

(D) Antigen import assay (Figure R.2.2A) was performed in the presence of prazosin, importazole, tamoxifen and DbeQ with or without NH_4Cl . Representative plots are shown (prazosin, $n = 3$; tamoxifen and DbeQ, $n = 2$) See Figure RS.2.5.

al., 2012). In control cells, galectin-3 signal is diffuse and galectin-3-positive structures are rarely observed (Supplemental Movie RS.2.4). Following addition of prazosin, however, there are frequent bursts of galectin-3-YFP recruitment to vesicular and tubular compartments in MutuDCs (Figure R.2.4B, R.2.4C, and Supplemental Movie RS.2.4). The morphology of these compartments is reminiscent to the endolysosomal structures previously observed in prazosin-treated cells (Zhang *et al.*, 2012). The accessibility of the lysosomal lumen to a cytosolic probe demonstrates that membranes become permeable to proteins. In summary, we conclude that both prazosin and tamoxifen target lysosomes, causing membrane destabilisation and leakage of lysosomal contents, including internalised antigens, into the cytosol.

Lysosomotropic properties of quinazolinamines mediate import enhancement

Considering the highly specific effect of prazosin on lysosome permeability, we hypothesised that the effect on antigen import might be mediated through lysosomal trapping of the drugs. Lysosomal trapping occurs when a compound readily crosses membranes at neutral pH, but becomes protonated and membrane impermeable at acidic pH (Figure R.2.5A, inset). This phenomenon has been observed for several classes of amine group-containing, amphiphilic compounds (Nadanaciva *et al.*, 2011). Interestingly, all but one (auranofin) validated hits have physicochemical properties of lysosomotropic compounds, i.e. pKa between 6.5 and 11 and logP value greater than two (Figure R.2.5A). We used BODIPY-conjugated prazosin to determine whether prazosin undergoes lysosomal trapping (Figure RS.2.5). Indeed, within seconds following addition, prazosin-BODIPY rapidly accumulated in vacuolar compartments in MutuDCs (Figure R.2.5B). To test whether lysosomal trapping is required for antigen import enhancement, we performed the β -lactamase import assay in the presence of NH₄Cl to neutralise the lysosomal pH. For all four compounds tested (prazosin, tamoxifen, DbeQ, and importazole), the enhancement of β -lactamase import was completely abolished in the presence of NH₄Cl (Figure R.2.5C). Therefore, the four drugs require low endocytic pH to enhance antigen import.

Antigen export enhancers augment cross-presentation and cross-priming

To determine if enhanced antigen import results in increased antigen cross-presentation to CD8⁺ T cells, we fed DCs with soluble OVA (sOVA) before treatment with the drugs and

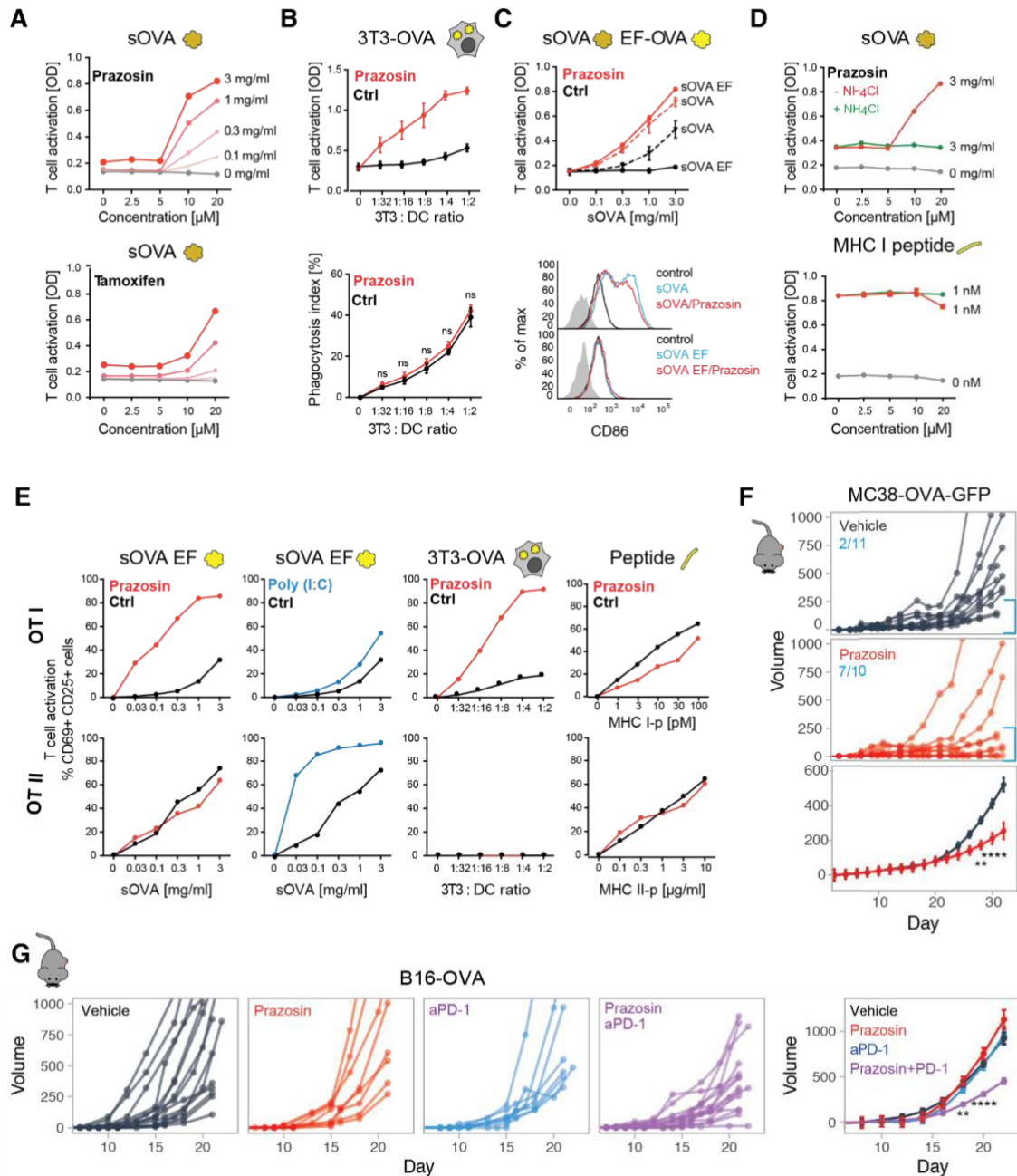


Figure R.2.6. Prazosin enhances cross-presentation and cross-priming.

(A) Antigen cross-presentation assay with B3Z hybridoma in the presence of increasing concentrations of prazosin or tamoxifen. The cells were pulsed with sOVA for 45 min, followed by 3.5 h incubation in the presence of the indicated compounds.

(B) The effect of prazosin on cross-presentation of cell-derived antigens. 3T3 cells expressing cytosolic OVA were used as antigen source and co-cultured with MutuDCs for 5h in the presence or absence of prazosin. Mean from three independent experiments +/- SE.

(C) MutuDCs were incubated with sOVA or sOVA EF for 45 min followed by 3.5 h incubation with prazosin. B3Z assay was used to monitor cross-presentation efficiency (representative plot from three independent experiments, error bars indicate SEM from technical duplicates). For the analysis of DC activation (histograms), MutuDCs were incubated with sOVA/EF sOVA in the presence and in the absence of prazosin for 5 h, washed, further incubated for 16 h at 37°C, and stained with anti-CD86 (gated for live cells only). Technical replicates +/- SE. Data representative of three experiments.

(D) Antigen cross-presentation assay with B3Z hybridoma in the presence of increasing concentrations of prazosin with or without 10 mM NH₄Cl was performed as in (A).

(E) The effect of prazosin on antigen presentation to OT-I and OT-II cells. MutuDC were incubated with sOVA EF, OVA-expressing 3T3s or MHC class I or II peptides in the presence or absence of prazosin or Poly(I:C). Data representative of three independent experiments.

(F) Tumour growth mice injected s.c. with the MC38-OVA tumour cell line and systemically (IP) treated with prazosin or vector control. Prazosin of vehicle were injected from the day when tumours became detectable, 3 x week with 0.5 mg prazosin. Lower panel represents best-fit curves for control and prazosin-treated groups (mean +/- SE). Mice pooled from two independent experiments. Means and SE were calculated using loess regression, the statistical significance was calculated using ANOVA with FDR Benjamini-Hochberg correction. ** p < 0.01 ****, p < 0.0001

(G) Tumour growth curves for mice injected s.c. with the B16-OVA tumour cell line and treated with prazosin and anti-PD-1 Ab alone or in combination. The treatments were started on the days were tumours became detectable and were performed three times per week (0.5 mg prazosin and 150 μg anti-PD-1). The numbers indicate number of mice with tumours smaller than 500 mm³ at the end of the experiment. The last panel represents best-fit curves for all groups (mean +/- SE). Mice were pooled from three independent experiments. Means and SE were calculated using loess regression, the statistical significance was calculated using ANOVA with FDR Benjamini-Hochberg correction. ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

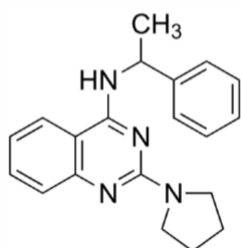
incubation with OVA-specific B3Z T cell hybridoma. Both prazosin and tamoxifen treatment led to a dramatic, concentration-dependent enhancement of B3Z activation (Figure R.2.6A). We observed a similar enhancement of cross-presentation of cell associated antigens (Figure R.2.6B, upper panel); in these experiments we co-cultured 3T3s (H2-K^d) expressing cytosolic OVA with MutuDCs for 5h and fixed the co-cultures before addition of the B3Z hybridomas. As demonstrated using a membrane labelling dye (PKH-26⁺), prazosin did not increase uptake of cell-associated material (Figure R.2.6B, lower panel). Importantly, we were also able to enhance cross-presentation of endotoxin-free sOVA (Figure R.2.6C, upper panel), which is normally not cross-presented efficiently due to the absence of TLR ligands (Alloatti *et al.*, 2016; Burgdorf *et al.*, 2008). This enhancement was not due to prazosin-mediated DC activation as we did not observe up regulation of activation markers in prazosin-treated DCs (Figure R.2.6C, lower panel). Finally, in accordance with the proposed mechanism of antigen export enhancement, we did not observe an increase in cross-presentation efficiency in the presence of NH₄Cl (Figure R.2.6D). Importantly, prazosin did not enhance T cell proliferation when DCs were pulsed with the short peptide SIINFEKL, indicating that it does not affect the general ability of DCs to prime T cells (Figure R.2.6D). Together, these data indicate that facilitating antigen import into the cytosol overcomes the requirement for DC activation during cross-presentation, and suggest that antigen import might be a key regulatory step that determines which antigens are destined for cross-presentation.

To determine if antigen presentation to CD4⁺ T cells was also enhanced by prazosin, we compared the efficiency of priming of OT-I and OT-II T cells by DCs fed with soluble endotoxin-free OVA, cell-associated OVA, or the appropriate peptides that bind directly to MHC molecules. As shown in Figure R.2.5E, presentation of soluble and cell-associated antigens to CD4⁺ OT-II cells was not affected by prazosin. This was in clear contrast with Poly(I:C), which strongly enhanced sOVA presentation to CD4⁺ but not to CD8⁺ T cells. Again, prazosin did not enhance T cell priming when DCs were treated with the short peptides directly, which would not require import into the cytosol for presentation. In summary, prazosin enhances antigen cross-presentation selectively and independently of DC maturation.

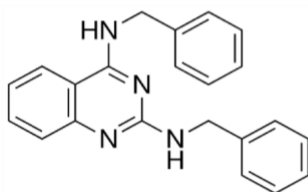
Finally, we investigated whether prazosin could be used to enhance antigen cross-presentation and anti-tumour immunity *in vivo*. In mice bearing MC38-GFP-OVA tumours, we

A ERAD inhibitors

Importazole



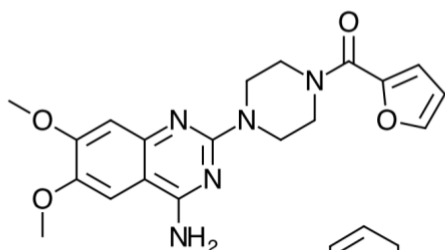
DbeQ



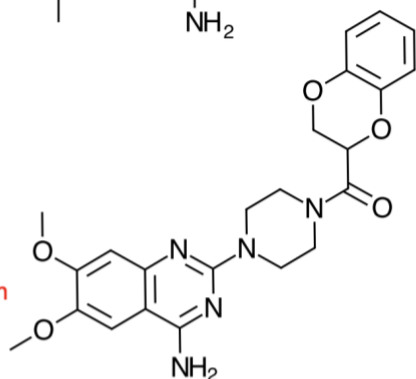
B FDA library

Active compounds

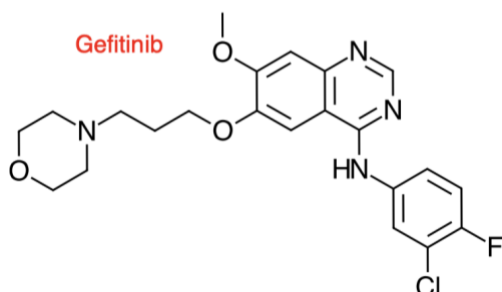
Prazosin



Doxazosin

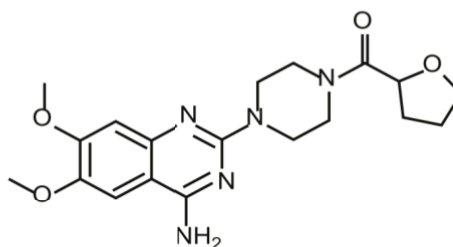


Gefitinib



Non-active compounds

Terazosin



Lapatinib

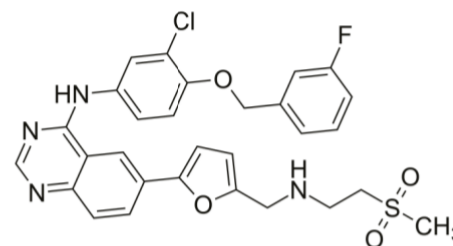


Figure RS.2.1. Chemical structures of the ERAD inhibitors and of selected active and non-active quinazolinamine tested in this study.

Related to Figure R.2.1.

RÉSULTATS

observed reduced tumour growth following systemic treatment with prazosin (Figure R.2.6F). In the more aggressive tumour model B16-OVA, prazosin alone was insufficient to control tumour growth and neither was a checkpoint inhibitor, anti-PD-1. However, combination of prazosin and anti-PD-1 led to a synergistic effect and a significant delay in tumour growth (Figure R.2.6G). We conclude that a combination of checkpoint blockade and increased antigen cross-presentation can overcome resistance of certain tumours to immunotherapy.

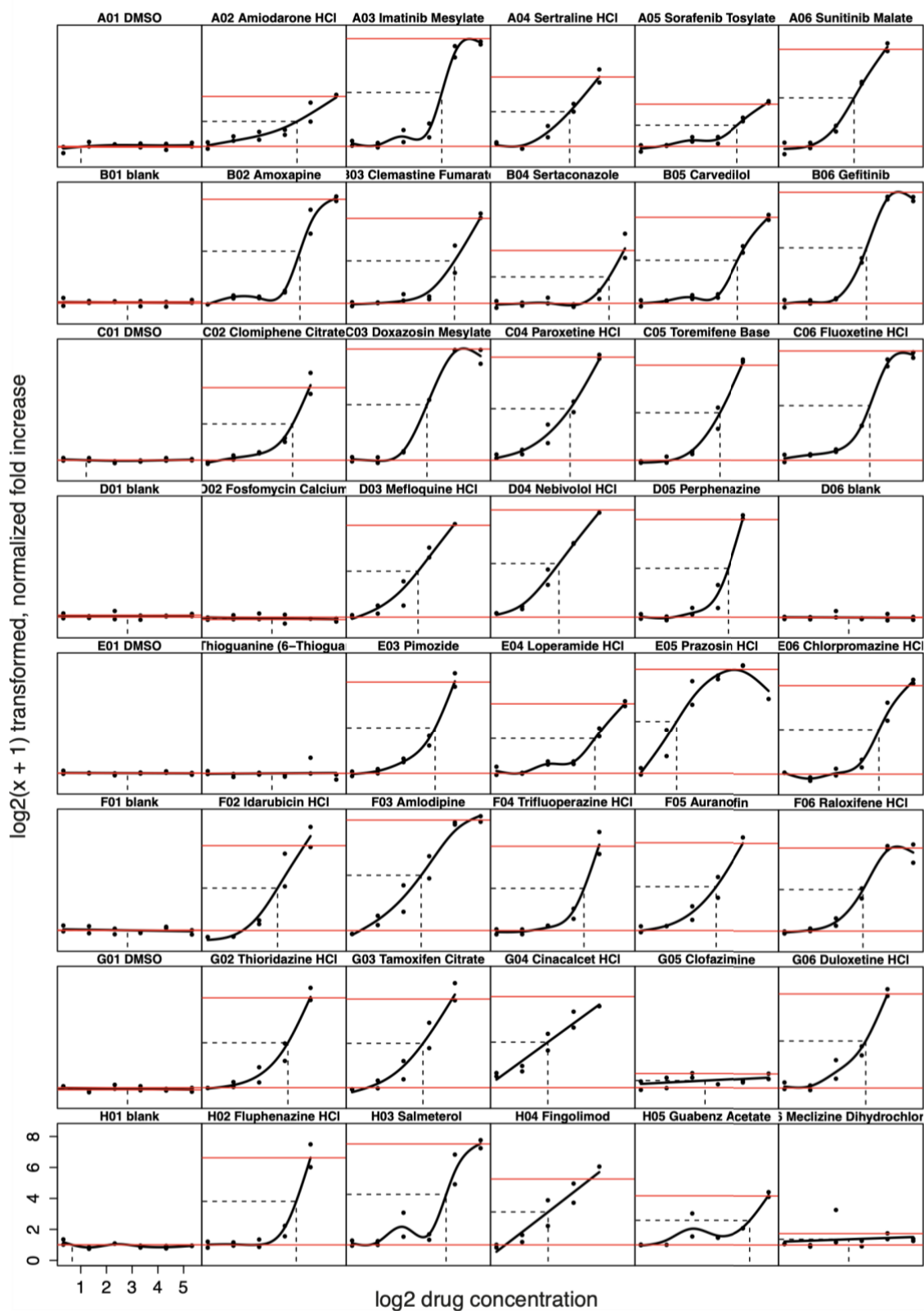


Figure RS.2.2. Summary of the EC₅₀ plots from the secondary screen.

Related to Figure R.2.1.

39 compounds were analysed using the β -lactamase assay: 37 top ranked compounds from the primary screen and two compounds with no phenotype were included (fosfomycin calcium and thioguanine). No treatment (blank) and vehicle (DMSO) controls were included on each plate. The screen was performed with five doses for each of the drugs (1.25 - 40 μ M). Wells with fewer than 500 cells were excluded from analysis. The proportion of the cells with efficient β -lactamase translocation was determined and these raw phenotype measurements were normalised by dividing each value by the mean of the "DMSO" control wells from the corresponding plate. drFitSpline function from the grofit R package was used to estimate the yEC₅₀ (50% of the max effect) values. The fold-increase and concentration values were log₂(x+1) transformed for spline fitting. The concentration values were log₂ transformed. The red lines indicated max and min import efficiency, the horizontal dotted line indicates the yEC₅₀ value and the vertical line the corresponding compound concentration.

Discussion

In this study, we developed a strategy to harness the natural capacity of DCs to cross-present antigens by modulating a specific step involved in antigen processing: import into the cytosol. To enhance antigen import, we used small molecules identified through a pharmacological screen. We demonstrated that import is a rate-limiting step for cross-presentation, in particular for antigens free of pathogen-derived signals. This observation reinforces the hypothesis that import into the cytosol is a regulated step (Zehner *et al.*, 2015), and implies that endogenous signals that drive import and cross-presentation in the absence of infection await identification.

Boosting antigen import and cross-presentation synergises with anti-PD-1-mediated immunotherapy in a tumour model unresponsive to the antibody alone, suggesting that cytosolic antigen cross-presentation plays a critical role in anti-tumour immune responses. Thus, enhancing antigen cross-presentation with small molecules provides a new strategy for combination therapies with checkpoint blockers. The major advantage of this approach, in comparison to tumour antigen-containing vaccines is that enhancing the natural capacity of DCs to route internalised antigens for cross-presentation does not require prior identification of specific epitopes.

Here we report over 30 FDA-approved small molecule enhancers of antigen import and we characterise in detail the effects of two molecules (prazosin and tamoxifen) in more detail. Using a combination of proteomics, microscopy, and bioinformatics, we concluded that import enhancement occurs as a consequence of lysosomal trapping of the drugs, enhancing lysosomal permeability. A number of mechanisms have been described by which lysosomotropic compounds destabilise membranes. For instance, sunitinib and mefloquine, present among our top hits, have the ability to directly fluidise lysosomal membranes (Zhitomirsky *et al.*, 2018). Other enhancers of antigen import, such as chlorpromazine, perphenazine, or fluphenazine have been proposed to displace lysosomal lipid hydrolyses from the inner leaflet of the lysosome and to destabilise membranes through changes in their lipid composition (Kornhuber *et al.*, 2010). While the lysosomotropism of phenothiazines has been extensively studied, lysosomotropic properties of quinazolinamine-derived compounds — the most potent chemical group in the antigen import assay — has not been widely reported. Interestingly, the drug library

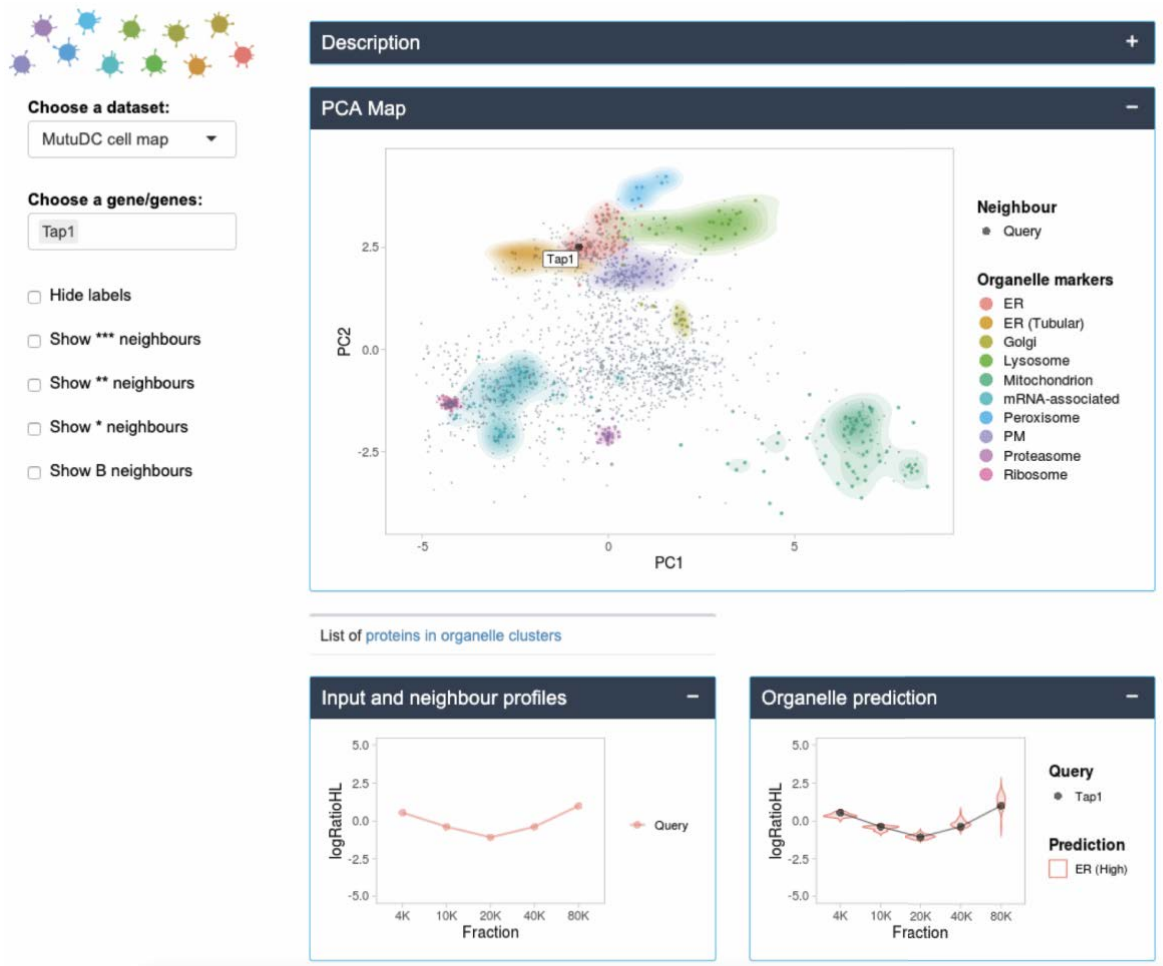


Figure RS.2.3. Sample output from the dc-biology.mrc-lmb.cam.ac.uk web tool for a selected gene, *Tap1*.

Related to Figure R.2.2.

The maps cover over 2000 proteins expressed in MutuDCs; for each protein included in the map we identified a set of nearest neighbours and predicted the localisation. Neighbours include potential interacting partners or proteins localised to the same subcellular structure. The output of the web resource includes: representation of the query on the PCA map, profiles of the query and nearest neighbours, prediction of the subcellular localisation, absolute abundance (copy numbers and cellular concentrations), as well as a list of the nearest neighbours. In a separate section of the webtool, we provide absolute abundance for over 7000 proteins detected in MutuDCs.

used here includes several other lysosomotropic compounds or compounds previously shown to permeabilize lysosomes that were not active in the β -lactamase assay (e.g. norfloxacin and ciprofloxacin which destabilise lysosomes in cancer cells). Further work will be required to determine what confers selectivity of the compounds, but differences in pH, membrane composition, and proteolytic content of endolysosomal compartments are likely to influence the extent and consequences of lysosomal trapping.

Many of the clinically approved drugs demonstrate unexpected activities that have either a harmful or a beneficial effect for the patient (Pushpakom *et al.*, 2019). These hidden effects can also be exploited for new therapeutic indications in drug repositioning approaches. Yet, predicting or identifying effects of small molecules on target cells remains challenging. Here, we took advantage of the fact that localisation and/or trafficking patterns of proteins are integral to most aspects of cellular functions. We demonstrated that comparative organellar mapping provides an effective and generic strategy for unbiased identification of biological effects of small molecules. This approach can be used to characterise changes in subcellular localisation of thousands of proteins simultaneously (without the need for antibodies or protein tagging) and to characterise on- and off-target effects in any cell type of choice (including primary cells). To our knowledge, this is also a first report of organellar mapping in cDC1s (or dendritic cells altogether), and it provides a useful resource of information on subcellular localisation and abundance of poorly characterised proteins that are not expressed in common cell lines (organellar map and full proteome composition are available at <http://dc-biology.mrc-lmb.cam.ac.uk>).

In summary, through a combination of small molecule screening and proteomics-based molecular mapping, we established a new approach for enhancing presentation of antigens sampled by DCs in the absence of strong immunogenic signals. Enhancing cross-presentation with small molecules may in the future provide therapeutic regimes for patients that do not respond to currently available treatment options.

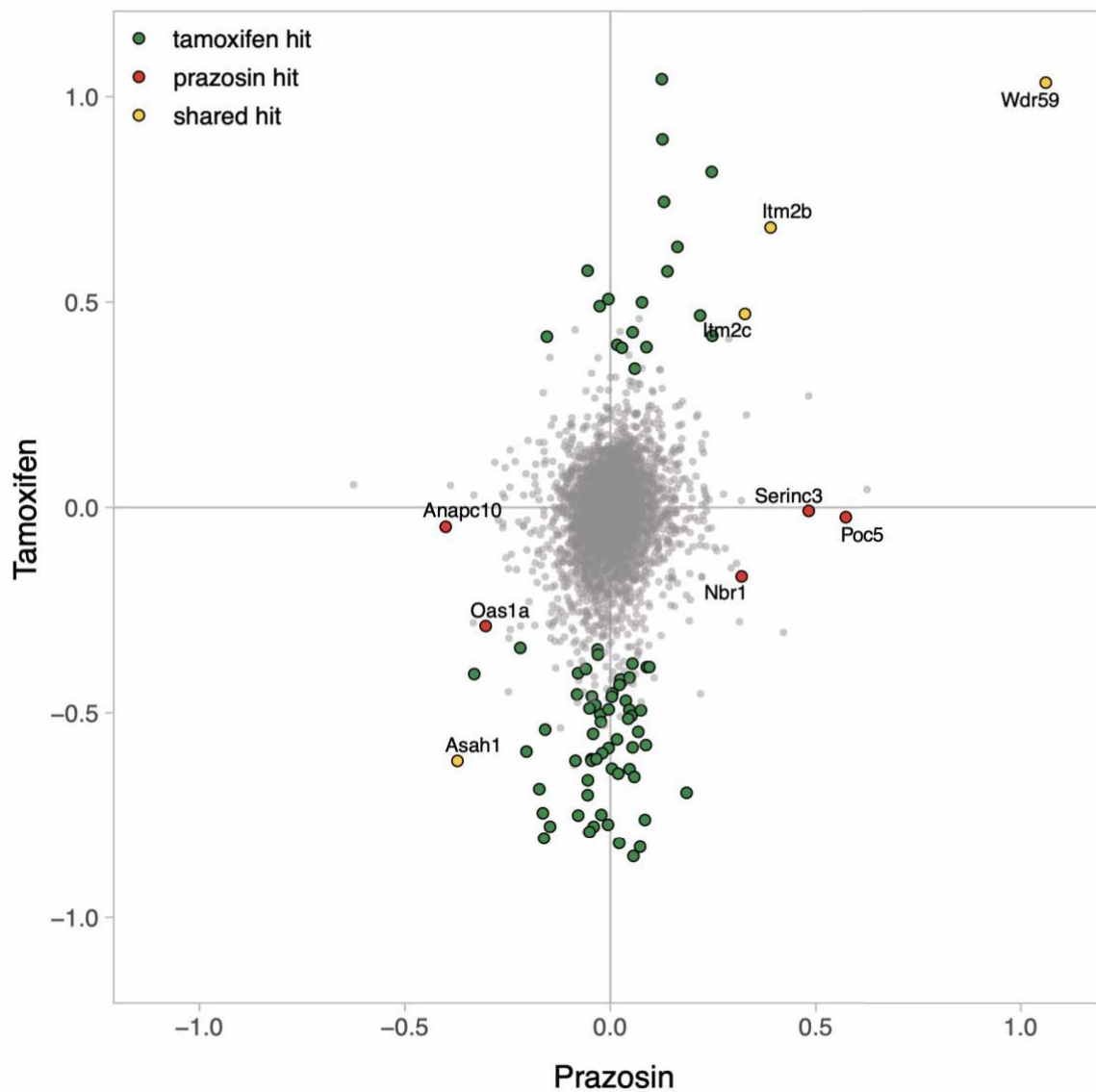


Figure RS.2.4. Whole cell protein expression levels in MutuDCs.

Related to Figure R.2.3.

Protein expression levels in MutuDCs from prazosin or tamoxifen treated (4h) cells relative to untreated controls (log₂ scale). Quantification was achieved by metabolic labelling (SILAC; averages of two replicates are shown). 5848 proteins were quantified across all four experiments. Proteins that changed significantly in abundance are highlighted in colour.

Methods

Compounds and antibodies

For flow cytometry, the following antibodies were used: anti-CD86-PE (clone GL1, BD Pharmingen #553692), anti-CD69-PE (clone H1.2F3, BD Pharmingen #553237), anti-CD25-PerCPy5.5 (clone PC61, BD Pharmingen #551071), anti-CD4-APC (clone RM4-5, BD Pharmingen #553051), anti-CD8 α -Pacific Blue (clone 53-6.7, BD Pharmingen #558106), anti-V α 2-PeCy7 (clone B20.1, BD Pharmingen #560624), anti-CD8 α -PeCy7 (clone 53-6.7, BD Pharmingen #552877), anti-V α 2-eFluor®450 (clone B20.1, eBiosciences #48-5812-82), anti-CD69-eFluor®450 (clone H1.2F3, eBiosciences #48-0691-82), anti-CD25-FITC (clone 7D4, BD Pharmingen #553072), anti-CD8a-PerCP-Cy5.5 (clone 53-6.7, eBioscience, #45-0081-82), anti-TCR $\nu\beta$ 5.1-PE (clone MR9-4, BD Pharmingen #553190), anti-CD4-PE-Cy7 (clone RM4-5, BD Pharmingen #552775), anti-CD19-eFluor®450 (clone 1D3, eBioscience, #48-0193), anti-CD3-eFluor®450 (clone 17A2, eBioscience, #48-0032-80), anti-CD11c-FITC (clone HL3, BD Pharmingen #553801), anti-CD11b-PerCPCyanine5.5 (clone M1/70, eBioscience #45-0112-80), anti-F4/80-FITC (clone BM8, eBioscience #11-4801-81), anti-NKp46-PE (clone 29A1.4, eBioscience #12-3351-80), anti-MHC I (H-2Kb)-FITC (clone AF6-88.5.5.3, eBioscience #11-5958-80), anti-MHC II (Iab)- eFluor®450 (clone AF120.1, eBioscience #48-5320-80).

The following small molecules were used: DbeQ (#SML0031), PR-619 (#SML0430), prazosin (#P7791, all three from Sigma), importazole (XXX), tamoxifen (#T9262), prazosin-BODIPY (ThermoFisher Scientific, #B7433), SCREEN-WELL® FDA approved drug library V2 (Enzo, #BML-2843-0100). Where not specified otherwise, prazosin and tamoxifen were used at 10 μ M concentration.

Cell lines and cell culture

MutuDC (obtained from Hans-Acha Orbea) cells (Fuertes Marraco *et al.*, 2012) were grown in IMDM, supplemented with 8% FCS (Biowest-Biosera), 10 mM HEPES, 2 mM Glutamax, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 50 μ M β -mercaptoethanol (all from Life Technologies).

Figure S5

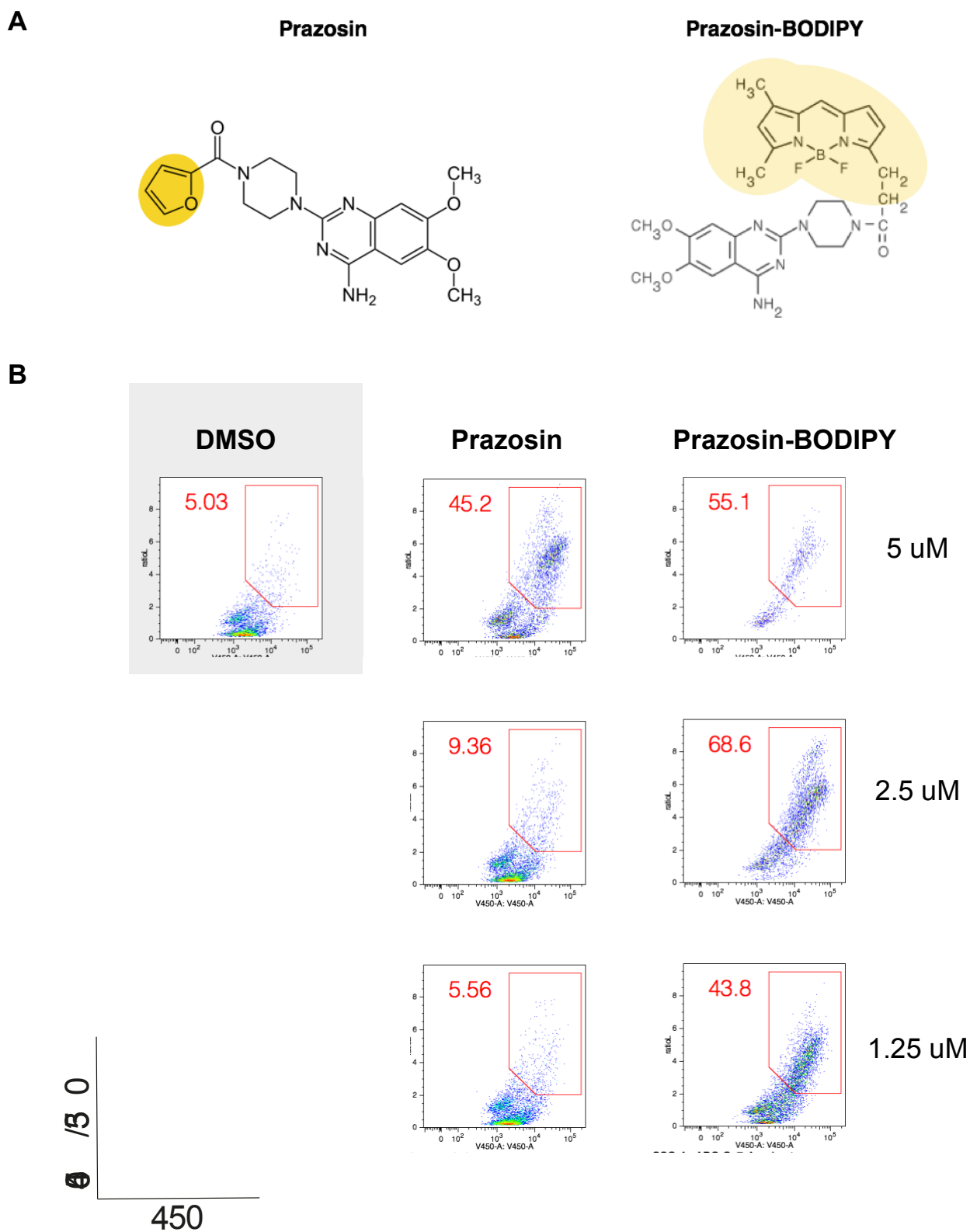


Figure RS.2.5. Prazosin modified with BODIPY is active in the antigen import assay.

Related to Figure R.2.5.

A. Comparison of the chemical structures of prazosin and prazosin-BODIPY.

B. Activity of prazosin-BODIPY in the β -lactamase assay.

RÉSULTATS

NIH/3T3 expressing a non-secretable form of OVA were obtained from Matthew Albert (Yatim *et al.*, 2015), and cultured in DMEM (Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Biowest), 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES and 50 μ M β -mercaptoethanol (all from Life Technologies). Necroptosis was induced by treatment with a specific drug ligand (AP20187, BB homodimerizer, Clontech).

B16-OVA cells (Falo *et al.*, 1995) were cultured in RPMI, supplemented with 10% FCS (Biowest-Biosera), 2 mM Glutamax, 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (all from Life Technologies) and selected with G418 2 mg/ml (Life Technnologies) and hygromycin B 60 μ g/ml (Gibco).

MC38-OVA (Gilfillan *et al.*, 2008) cells were grown in DMEM, supplemented with 10% FCS (Biowest-Biosera), 2 mM Glutamax, 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (all from Life Technologies).

All cell lines testes as mycoplasma-negative by PCR.

Animals

C57BL/6J mice and C57BL/6J recombination activating gene 1 (Rag1)-deficient OT-I and OT-II TCR ($V\alpha 2$, $V\beta 5.1$) transgenic mice were obtained from Charles River Laboratories, Janvier and Centre de Distribution, Typage et Archive Animal (CDTA, Orleans, France). Mice were used between 8-12 weeks old. Wild-type C57BL/6J mice for tumour experiments were always obtained from the aforementioned sources.

All animal procedures were in accordance with the guidelines and regulations of the Institut Curie Veterinary Department and all mice used were less than six months old.

Antigen import assay and library screen

MutuDCs were seeded at 150,000 cells/well in U-bottom 96-well plates and incubated with 10 mg/ml β -lactamase (Sigma, #P0389) for 3 h at 37°C. The cells were then washed and incubated with small molecules at indicated concentrations for 2 h at 37°C. CCF4 loading was performed as described¹ for 45-60 min at RT. To increase the sensitivity of the assay, the plates were then incubated for 16 h at RT²¹ in CO₂ independent media supplemented with 8% FCS, and 2 mM Glutamax. Immediately before the flow cytometry analysis, the cells were stained

with Fixable Viability Dye eFluor® 780 (eBioscience) diluted 1:2500 in PBS. Proportion of the live cells with a high ratio of blue to green (V450/V530) fluorescence was used as a measure of the efficiency of antigen import into the cytosol.

Primary screen of the FDA library. Enzo FDA-approved drug library was screened in the course of three independent experiments. Each 96-well plate contained three media-only, DMSO only, 4 μ M DbeQ (enhancement control), and 10 μ M PR-619 (inhibition control) wells to control for data reproducibility between the plates. The screen was performed once and 37 top ranked compounds were selected for validation.

Validation screen. The secondary screen was performed at six concentrations (1.25 – 40 μ M) for each compound, in two biological repeats. Media-only and vehicle (DMSO) controls were included on each plate. Wells with less than 500 cells were excluded from analysis. The raw phenotype measurements (percent of cells with a high ratio of blue-to-green fluorescence) were normalised by dividing each value by the mean of media-only control wells from the corresponding plate. The EC50 values were estimated using a drFitSpline function from the grofit R package. ($\log_2(x+1)$ transformed values were used for spline fitting). Note that for some drugs the max effect might not have been reached at the maximum concentration tested, which might result in underestimation of the EC50 values).

Chemical class and target assignment

The information about chemical classes and candidate targets was downloaded from DrugBank database (Law *et al.*, 2014). The classes and targets enriched in the group of active vs non-active compounds are represented with the coloured squares. The enrichment of chemical classes and targets in active vs non-active compound groups was calculated using Fisher's test.

Proteomic analyses

Cell culture for SILAC labelling. For metabolic labelling, MutuDCs were grown in IMDM SILAC culture medium (Thermo, #88423), supplemented with 8% (V/V) dialysed fetal calf serum (PAA, #A11-107), 50 μ M β -mercaptoethanol (Gibco), Pencilin and Streptomycin (Sigma), 10 mM HEPES (pH 7.4), and either: 42 mg/L 13C6,15N4-L-Arginine HCl (Silantes, #201604302) and 73 mg/L 13C6,15N2-L-Lysine HCl (Silantes, #211604302) for SILAC heavy

culture medium; or 42 mg/L L-Arginine HCl and 73 mg/L L-Lysine HCl with standard isotopic constituents (Sigma, #A6969 and #L8662) for SILAC light culture medium. Cells were allowed at least seven doublings prior to experiments, to ensure complete labelling.

Drug treatment for proteomic experiments. Tamoxifen (Sigma, #T5648) or prazosin (Sigma #P7791) were resuspended in DMSO to make a 10 mM stock, and stored frozen at -20°C in single-use aliquots. For treatment of MutuDCs, drugs were added to the culture medium at a final concentration of 20 µM (whole cell proteomics) or 10 µM (dynamic organellar maps and cytosol analysis); control cells were treated with DMSO (vehicle) only. Cells were incubated at 37 °C for ~4 h, prior to harvesting.

Whole cell proteomics. MutuDCs were grown in SILAC light or SILAC heavy culture medium, in 15 cm dishes, to 70-90% confluency. SILAC heavy labelled cells were treated with tamoxifen or prazosin (20 µM); SILAC light labelled cells were treated with DMSO (vehicle) only. Cells were incubated for 3h 45 min at 37 °C, and harvested. Cell pellets were lysed in SDS buffer (2.5% (w/V) SDS, 50 mM Tris-HCl, pH=8.0), and incubated at 90°C for 10 min. To shear genomic DNA, lysates were passed through a QIAashredder (Qiagen). Lysates were then processed for analysis by mass spectrometry as described below. For the repeat experiment, the SILAC labelling of control and treated cells was swapped. Protein concentrations were estimated by BCA assay. Equal amounts of control and treated samples (ie SILAC light and heavy, or vice versa) were pooled, and acetone precipitated as described (Itzhak *et al.*, 2016). Samples were subjected to tryptic digest using the FASP method (Wiśniewski *et al.*, 2009). Peptides were fractionated into six fractions using strong cation exchange (Kulak *et al.*, 2014) (SCX), prior to mass spectrometric analysis.

Cytosol analysis. MutuDCs were cultured in SILAC light or SILAC heavy growth medium, in 10 cm dishes, to 70-90% confluency. SILAC light cells were treated with tamoxifen or prazosin (10 µM), or vehicle (DMSO); SILAC heavy labelled cells were left untreated, and served as internal reference. Treatments were performed in quadruplicate (two pairs of replicates prepared on two different days). Cells were harvested and resuspended in STE buffer (250 mM sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 25 mM Tris-HCl, pH = 7.5 at 4°C). Aliquots of SILAC heavy labelled cells were mixed with proportional aliquots of the tamoxifen-, prazosin- or DMSO-treated SILAC light cells. Cells were lysed mechanically in a Dounce homogenizer (tight

pestle, 40 strokes, on ice). Lysates were centrifuged at 2,000 x g for 10 min at 4°C, to pellet cell debris and nuclei. Post nuclear supernatants were centrifuged at 135,000 x g for 45 min at 4°C to pellet organelles and microsomes. Supernatants were the cytosolic fraction. Protein concentrations were estimated by BCA assay; aliquots were acetone precipitated and subjected to in-solution digest and stage-tip peptide cleanup as previously described (Itzhak *et al.*, 2016), prior to mass spectrometric analysis.

Dynamic organellar maps. Organellar maps were prepared essentially as described (Itzhak *et al.*, 2016), with minor modifications to the protocol. Briefly, MutuDCs were cultured in SILAC light or SILAC heavy growth medium, in 15 cm dishes, to 70-90% confluency. SILAC light cells were treated with tamoxifen or prazosin (10 µM), or vehicle (DMSO), for 4 h; SILAC heavy labelled cells were treated with vehicle (DMSO), and served as reference. Two dishes were used for each treatment (SILAC light cells), and four dishes to generate the SILAC heavy reference. Unlike in (Itzhak *et al.*, 2016), the same reference was used for treated and control maps. Cells were harvested (with the drugs or DMSO added to the PBS (-) cell detachment buffer), chilled on ice, lysed mechanically in STE buffer (250 mM sucrose, 0.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 25 mM Tris-HCl, pH = 7.5 at 4°C), with a Dounce homogenizer, and centrifuged at 1,000 x g for 10 min to pellet nuclei and cell debris. Post-nuclear supernatants of SILAC light labelled cells were then subjected to a series of differential centrifugation steps (4,000 x g for 10 min; 10,000 x g for 15 min; 20,000 x g for 20 min; 40,000 x g for 20 min; 80,000 x g for 30 min). Post nuclear supernatant from SILAC heavy cells was centrifuged once at 80,000 x g for 30 min to obtain the reference fraction. All pellets were resuspended in SDS buffer (2.5% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl, pH=8.0), and heated to 90 °C for 3 min. Protein concentrations were estimated by BCA assay. Equal amounts of SILAC heavy reference fraction were mixed with each SILAC light subfraction, acetone precipitated and subjected to in-solution digest and stage-tip peptide cleanup as described (Itzhak *et al.*, 2016), prior to mass spectrometric analysis.

Fractionations were prepared in duplicate, on two different days (six maps total – two controls, two from cells treated with tamoxifen, and two from cells treated with prazosin).

Mass spectrometry and data processing. Mass spectrometric analysis was performed as described (Itzhak *et al.*, 2016), using a Thermo EASY-nLC 1000 HPLC coupled to a Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Germany). HPLC

gradient lengths varied for the different experiments. For analysis of whole proteomes, each of the SCX peptide fractions was analysed with a 240 min gradient (24 h per sample in total). For the analysis of cytosol and fractions from the organellar maps, each sample was analysed with a single 150 min gradient. Raw files were processed with MaxQuant software Version 1.6 (Cox and Mann, 2008), using the murine reference proteome (Swiss-Prot canonical and isoform data) database downloaded from UniProt (www.uniprot.org).

Bioinformatic analysis of the proteomic data

Protein groups identified through MaxQuant analysis were filtered to remove reverse hits, proteins identified with modified peptides only, as well as common contaminants. Further processing depended on the individual experiment:

Copy number estimates of proteins expressed in MutuDC. To estimate absolute protein abundance in MutuDCs, the SILAC datasets used for full proteome analysis of drug-treated cells were used (see below). Each of the four dataset combined control cells and drug treated cells. From each dataset, the protein intensities from the control cells were selected, to obtain four replicate full proteomes. Intensities within each replicate were summed, and all replicates were linearly normalized to the same summed intensity. Next, only proteins detected in at least two replicates were retained (7427 in total). Copy number estimates were calculated using the Proteomic Ruler (Wiśniewski *et al.*, 2014), as implemented in Perseus software (V1.5, (Tyanova *et al.*, 2016), and described in Itzhak *et al.*, 2016. Protein intensities were scaled to molecular mass.

Drug-induced changes in whole cell proteomes. For analysis of drug-induced changes in whole cell proteomes, only proteins with at least three SILAC quantification events in each of the four experiments (2 x control vs tamoxifen, 2 x control vs prazosin) were retained (5848 proteins). SILAC ratios were linearly normalized to a column median of 1 in each experiment, logarithmised, and analysed with the ‘Significance A’ tool in Perseus software (Tyanova *et al.*, 2016). Proteins that changed significantly in both replicate experiments with one drug (FDR=0.05 within each replicate, Benjamini-Hochberg correction), with a consistent direction of change, were considered as hits for this drug. Proteins that changed significantly

across both replicates and both drug treatments, with a consistent direction of change in all four measurements, were considered as hits common to both drugs.

Drug-induced changes in cytosol. For analysis of drug-induced changes in cytosol, only proteins with at least three SILAC quantification events in each of the four replicates were retained (2129 proteins). SILAC ratios were linearly normalized to a column median of 1 in each experiment, and logarithmised. For each protein, the average ratio SILAC light/SILAC heavy from the four replicates was calculated for each condition, and average control (DMSO) ratios were then subtracted from average treatment (tamoxifen or prazosin) ratios. Thus, for every protein, the average change in cytosolic levels caused by either tamoxifen or prazosin relative to DMSO was obtained.

The log ratios from the whole cell proteome and cytosol analyses were plotted against each other for each treatment (including only proteins detected in both). To compare distribution of lysosomal proteins with distribution of all detected proteins the Kolmogorov–Smirnov test was performed.

Organelle maps. Generation of organelle maps and outlier testing followed the principles described in detail (Itzhak *et al.*, 2018; 2016), with some modifications to accommodate a comparison across three conditions. Only proteins with high quality SILAC ratios in all 30 subfractions, i.e. across all six maps, were retained (1857 proteins). (High quality SILAC ratios are those calculated from three or more quantification events. In addition, ratios calculated from only two quantification events are also included in the high quality set if the corresponding MaxQuant ratio variability is below 30%). Each map consisted of a set of five SILAC ratios for each protein, mirroring its distribution across the differential centrifugation fractions. SILAC ratios were inverted, and divided by the sum of all five ratios across the map. This yielded for each protein a ‘per map’ normalised profile (summing to 1). For the MutuDC control map shown in Figure R.2.2C/3B, all proteins passing the high quality filter in both replicates were included (2121 proteins). To visualize the map the `prcomp` function in R was used, with the following parameters: (`center = TRUE`, `scale. = TRUE`). Organelle marker proteins were initially chosen from our previously published set, and augmented as described (Itzhak *et al.*, 2016).

Subcellular localisation predictions in MutuDC. Organellar maps from the two control map replicates (0-1 normalised, Supplemental Data RS.2.2) were annotated with 559 markers for 12 organellar compartments, by cross-matching our previously derived set of human marker proteins (Itzhak *et al.*, 2016). Support vector machines (implemented in Perseus software, V1.6, (Tyanova *et al.*, 2016)) were trained to predict organellar association as described ((Itzhak *et al.*, 2016)), with an overall recall of 93% and a median F1 score of 0.88 across all compartments (Supplemental Data RS.2.2).

Drug induced protein movements. To identify proteins that moved significantly and robustly, our previously reported MR (movement and reproducibility (Itzhak *et al.*, 2016)) analysis was applied, with minor modifications. Unlike in our previous study, here only one reference fraction was used to generate the control and treatment maps. This reference came from cells treated with DMSO only. A different normalization was therefore required, to allow the outlier test to detect changes in membrane association as well as organellar localization shifts. SILAC ratios were first normalised within each fraction to a column median of 1. Next, for each protein, SILAC ratios were inverted, and weighted with fraction yields (determined by BCA assay (Itzhak *et al.*, 2016)). Within each map all data were then summed. This reflected overall amount of protein detected in each map (prep yield). The smallest prep yield was set to one, and correction factors for the other five maps were calculated relative to this value. All data within a map were then globally normalised through division by the prep yield correction factor. The result were six maps in which the sum of all data points is equal. Next, for each protein the ten data points from the two tamoxifen replicates and the ten corresponding data points from control replicates were divided by the sum of all of these ratios. The same was repeated for the ten data points from the two prazosin replicates, using the same ten control data points. This procedure results in an additional “within treatment” normalisation of the maps. Next, for each protein, the treatment profiles were subtracted from the corresponding control profiles, to yield ‘delta’ profiles. For every protein, four delta profiles, with five data points each (two sets from tamoxifen and two sets from prazosin treatment) were obtained. Delta profiles from treatment replicates were combined into one profile (ten data points) and analysed with the multivariate outlier test in Perseus software (Perseus 1.6, 101 iterations, quantile = $n*0.75$) (Itzhak *et al.*, 2016). Movement (M) scores were calculated as the negative \log_{10} of the FDR corrected p values (Benjamini-Hochberg method). For example, an M score of four identifies significantly

moving proteins with an FDR of 0.01%. The reproducibility (R) score was calculated as the Pearson correlation of the two five-data point delta profiles within treatment replicates. A significance cut-off corresponding to a p-value of 0.05 ($R=0.8$) was chosen. Since the R-score represents an additional filter, orthogonal to the M-score, further multiple hypothesis correction of the p-value was not required. Each protein with significant M (>4) and R (>0.8) scores was considered as shifting significantly. Thus, for every protein two sets of M and R scores were obtained, reflecting shifts caused by tamoxifen or prazosin treatment. Each treatment produced a partially overlapping list of shifting proteins.

Antigen presentation assays

T cell activation assay. DCs were incubated for 5 h with different concentrations of soluble grade VII OVA (Sigma Aldrich #A7641) or soluble endotoxin-free OVA (Hyglos #300036). Minimal peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ was used as a control for the capacity of DCs to activate T cells. Unless indicated otherwise, MutuDCs were incubated with soluble OVA for 45 min, followed by a 3.5 h incubation with small molecules. Next, DCs were washed three times with 0.1% (vol/vol) PBS/BSA, fixed with 0.008% (vol/vol) glutaraldehyde during 3 min at room temperature, washed twice with 0.2 M glycine and once with 0.1% (vol/vol) PBS/BSA, and finally B3Z hybridoma T cells were added (Sanderson and Shastri, 1994). After 16 h, T cell activation was measured detecting β -galactosidase activity by optical density at 590 nm using chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) as substrate for the reaction.

Activation assay. DCs were incubated with different concentrations of grade VII OVA (Sigma Aldrich #A7641), endotoxin-free OVA (Hyglos #300036), or control minimal peptides (OVA₂₅₇₋₂₆₄ and OVA₃₂₃₋₃₃₉). Where indicated, prazosin was added at 10 μ M or Poly(I:C) at 5 μ g/ml. After 5h, DCs were washed three times with PBS containing 0.1% (vol/vol) BSA and co-cultured with purified OT-I CD8⁺ or OT-II CD4⁺ T for 16h. For monitoring T cell activation, CD69 and CD25 staining on TCR⁺ CD8⁺ populations was measured by flow cytometry.

Cell-associated antigens. 1×10^5 MutuDC were seeded in round bottom 96-well plates with 3T3-OVA cells at various 3T3-OVA:MutuDC ratios (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). The co-cultures were incubated at 37°C in the presence of prazosin (10 μ M) or DMSO (1:1000). After

5h, the co-cultures were washed, fixed and co-incubated with B3Z hybridomas following protocol described in the section above or washed and co-cultured for 16h with purified 1×10^5 purified OT-I or OT-II T cells. After 16h, T cells were stained for CD69 and CD25 to monitor T cell activation.

Cell uptake assay

NIH/3T3 were stained with the PKH-26 membrane dye (Sigma Aldrich, #PKH26-GL) following the manufacturer's instructions. 1×10^5 MutuDC were plated in 96 round bottom-well plates together with PKH-26+ 3T3s at different 3T3:MutuDC ratios (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). The co-cultures were incubated in the presence of prazosin (10 μ M) or DMSO for 2h or 5h at 37°C, 5% CO₂, or left on ice for 5h. Cells were then stained with anti-CD11c-APC (clone HL3, BD Pharmingen #550261) and violet live/dead Dye (ThermoFisher #L34955) and fixed to prevent further uptake.

Percentage of PKH-26+ MutuDCs (CD11c+ cells) was determined. Phagocytic index was calculated by subtracting the percentage of PKH-26+ cells in CD11c+ gate obtained at 4°C from the percentage of this subset measured at 37°C after 2h or 5h of incubation.

DC activation

To assess DC activation, 1×10^5 MutuDC were seeded in round bottom 96-well plates and incubated for 5h with endotoxin-free OVA (Hyglos #300036) or grade VII OVA (Sigma Aldrich #A7641-250MG), in presence or absence of DMSO or prazosin (10 μ M). After 5h, cells were washed twice with medium, cultured for additional 15h, and finally stained for CD86.

Tumour growth experiments

MC38-GFP-OVA. WT mice were injected subcutaneously with 2×10^6 OVA-expressing MC38 cells in 100 μ l of cold-sterile 1x PBS. The experiment was then conducted as described previously. Tumour growth was measured three times a week and volume was calculated as $(\text{height} \times \text{width}^2)/2$ (where width is the shorter measurement). When tumour size reached 1000 mm³, the mice were euthanised.

RÉSULTATS

B16-OVA. WT mice were injected subcutaneously with 2.5×10^5 OVA-expressing B16 cells in 100 μ l of cold-sterile PBS. When tumours became visible, usually within a week, mice were randomly assigned to different treatment groups. Injections of prazosin (0.5 mg/mouse) and/or anti-PD1 antibody (200 μ g/mouse) were then performed three times per week, starting the day of tumour appearance. Vehicle (cold water and/or PBS) was injected into control mice. Tumour growth was measured three times a week and volume was calculated as above. When tumour size reached 1000 mm³, mice were euthanized. To control for toxic effects of prazosin, we performed a pilot experiment in which mice were treated for a period of one month with: 0.5 g prazosin in 1 ml, administered IP, 3x a week (total of 13 injections, total dose: 7.5 g prazosin per mouse); no adverse effects were observed.

The mean growth rate curves were estimated using loess function in R. The statistical significance analysis was performed in Prism using ANOVA with FDR Benjamini-Hochberg correction.

Acknowledgements

We would like to thank Hans Acha-Orbea for the MutuDCs, Matthew Albert for the NIH/3T3 cells expressing a non-secretable form of OVA, and Felix Randow for the Galectin-3-YFP construct. S.A. received funding from: Institut Curie; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Centre National de la Recherche Scientifique; la Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue, EL2014.LNCC/SA); Association de Recherche Contre le Cancer (ARC); the ERC (2013-AdG N° 340046 DCBIOX), INCA PLBIO13-057; ANR-11-LABX-0043 and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL; ANR-16-CE15001801 and ANR-16-CE18002003. P.K. was supported by EMBO (ALTF 467-2012), the Wellcome Trust (101578/Z/13/Z) and Medical Research Council (U105178805). A.A. was supported by EMBO (ALTF 883-2011). DNI was funded by the Louis-Jeantet Foundation, and the Max Planck Society for the Advancement of Science; GHHB was funded by the German Research Foundation (DFG/Gottfried Wilhelm Leibniz Prize), and the Max Planck Society for the Advancement of Science. DNI and GHHB also wish to thank Matthias Mann for his support.

Author contributions

P.K. performed, analysed, designed, and supervised experiments; M.G. performed and analysed part of the antigen presentation assays, set up and carried out experiments with cell-associated antigens. D.N.I. carried out the proteomic experiments, and assisted with data analysis. L.J. performed tumour experiments and assisted with all animal work. M.G., and A.A. assisted with tumour experiments. J.G.M. assisted in assay development and experimental design. D.N.E. assisted with design of the small molecule screening assays. G.H.H.B. designed the proteomics experiments, performed the data analysis, and supervised the proteomics work. P.K. and S.A. conceived and supervised the study; and P.K., G.H.H.B. and S.A. wrote the manuscript.

Declaration of Interest

The authors do not declare competing interests.

References

- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R., Cresswell, P., 2003. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12889–12894. doi:10.1073/pnas.1735556100
- Alloati, A., Kotsias, F., Magalhaes, J.G., Amigorena, S., 2016. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol Rev* 272, 97–108. doi:10.1111/imr.12432
- Alloati, A., Rookhuizen, D.C., Joannas, L., Carpiér, J.-M., Iborra, S., Magalhaes, J.G., Yatim, N., Kozik, P., Sancho, D., Albert, M.L., Amigorena, S., 2017. Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. *Journal of Experimental Medicine* 214, 2231–2241. doi:10.1084/jem.20170229
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., 2002. Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8+ T Cell Tolerance. *J Exp Med* 196, 1627–1638. doi:10.1084/jem.20021598
- Böttcher, J.P., Reis e Sousa, C., 2018. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer* 4, 784–792. doi:10.1016/j.trecan.2018.09.001
- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H.A., Krieg, A.M., Hartmann, G., Endres, S., 2000. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 165, 6278–6286. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6278
- Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R., Kurts, C., 2008. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* 9, 558–566. doi:10.1038/ni.1601
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C.Y., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L.H., Campbell, I.K., Maraskovsky, E., Braley, H., Davey, G.M., Mottram, P., van de Velde, N., Jensen, K., Lew, A.M., Wright, M.D., Heath, W.R., Shortman, K., Lahoud, M.H., 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264–3273. doi:10.1182/blood-2008-05-155176
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L.F., Amigorena, S., Savina, A., 2011. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 147, 1355–1368. doi:10.1016/j.cell.2011.11.021
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511
- Crittenden, M.R., Zebertavage, L., Kramer, G., Bambina, S., Friedman, D., Troesch, V., Blair, T., Baird, J.R., Alice, A., Gough, M.J., 2018. Tumor cure by radiation therapy and checkpoint inhibitors depends on pre-existing immunity. *Sci. Rep.* 8, 7012. doi:10.1038/s41598-018-25482-w
- Falo, L.D., Kovacsovic-Bankowski, M., Thompson, K., Rock, K.L., 1995. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat Med* 1, 649–653.
- Fuertes Marraco, S.A., Grosjean, F., Duval, A., Rosa, M., Lavanchy, C., Ashok, D., Haller, S., Otten, L.A., Steiner, Q.-G., Descombes, P., Lubert, C.A., Meissner, F., Mann, M., Szeles, L., Reith, W., Acha-Orbea, H., 2012. Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Front Immunol* 3, 331. doi:10.3389/fimmu.2012.00331
- Gilfillan, S., Chan, C.J., Cella, M., Haynes, N.M., Rapaport, A.S., Boles, K.S., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Colonna, M., 2008. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *Journal of Experimental Medicine* 205, 2965–2973. doi:10.1084/jem.20081752
- Giodini, A., Cresswell, P., 2008. Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *EMBO J* 27, 201–211. doi:10.1038/sj.emboj.7601941
- Gros, M., Amigorena, S., 2019. Regulation of Antigen Export to the Cytosol During Cross-Presentation. *Front Immunol* 10, 41. doi:10.3389/fimmu.2019.00041

RÉSULTATS

- Grotzke, J.E., Kozik, P., Morel, J.-D., Impens, F., Pietrosemoli, N., Cresswell, P., Amigorena, S., Demangel, C., 2017. Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E5910–E5919. doi:10.1073/pnas.1705242114
- Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., Amigorena, S., 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397–402. doi:10.1038/nature01911
- Hammerich, L., Marron, T.U., Upadhyay, R., Svensson-Arvelund, J., Dhainaut, M., Hussein, S., Zhan, Y., Ostrowski, D., Yellin, M., Marsh, H., Salazar, A.M., Rahman, A.H., Brown, B.D., Merad, M., Brody, J.D., 2019. Systemic clinical tumor regressions and potentiation of PD1 blockade with in situ vaccination. *Nat Med* 25, 814–824. doi:10.1038/s41591-019-0410-x
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., Schreiber, R.D., Murphy, T.L., Murphy, K.M., 2008. Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* 322, 1097–1100. doi:10.1126/science.1164206
- Imai, J., Hasegawa, H., Maruya, M., Koyasu, S., Yahara, I., 2005. Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *International Immunology* 17, 45–53. doi:10.1093/intimm/dxh184
- Itzhak, D.N., Davies, C., Tyanova, S., Mishra, A., Williamson, J., Antrobus, R., Cox, J., Weekes, M.P., Borner, G.H.H., 2017. A Mass Spectrometry-Based Approach for Mapping Protein Subcellular Localization Reveals the Spatial Proteome of Mouse Primary Neurons. *Cell Rep* 20, 2706–2718. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.063
- Itzhak, D.N., Schessner, J.P., Borner, G.H.H., 2018. Dynamic Organellar Maps for Spatial Proteomics. *Current Protocols in Cell Biology* 83, e81–29. doi:10.1002/cpcb.81
- Itzhak, D.N., Tyanova, S., Cox, J., Borner, G.H., 2016. Global, quantitative and dynamic mapping of protein subcellular localization. *eLife* 5, e16950. doi:10.7554/eLife.16950
- Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., Groemer, T.W., Gulbins, E., 2010. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell. Physiol. Biochem*. 26, 9–20. doi:10.1159/000315101
- Kovacsovic-Bankowski, M., Rock, K.L., 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243–246.
- Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., 2014. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Meth* 11, 319–324. doi:10.1038/nmeth.2834
- Law, V., Knox, C., Djoumbou, Y., Jewison, T., Guo, A.C., Liu, Y., Maciejewski, A., Arndt, D., Wilson, M., Neveu, V., Tang, A., Gabriel, G., Ly, C., Adamjee, S., Dame, Z.T., Han, B., Zhou, Y., Wishart, D.S., 2014. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res* 42, D1091–7. doi:10.1093/nar/gkt1068
- Lundberg, E., Borner, G.H.H., 2019. Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 1–18. doi:10.1038/s41580-018-0094-y
- MacDonald, M.L., Lamerdin, J., Owens, S., Keon, B.H., Bilter, G.K., Shang, Z., Huang, Z., Yu, H., Dias, J., Minami, T., Michnick, S.W., Westwick, J.K., 2006. Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nat Chem Biol* 2, 329–337. doi:10.1038/nchembio790
- Nadanaciva, S., Lu, S., Gebhard, D.F., Jessen, B.A., Pennie, W.D., Will, Y., 2011. A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds. *Toxicol In Vitro* 25, 715–723. doi:10.1016/j.tiv.2010.12.010
- Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., Zhang, W., Luoma, A., Giobbie-Hurder, A., Peter, L., Chen, C., Olive, O., Carter, T.A., Li, S., Lieb, D.J., Eisenhaure, T., Gjini, E., Stevens, J., Lane, W.J., Javeri, I., Nellaippan, K., Salazar, A.M., Daley, H., Seaman, M., Buchbinder, E.I., Yoon, C.H., Harden, M., Lennon, N., Gabriel, S., Rodig, S.J., Barouch, D.H., Aster, J.C., Getz, G., Wucherpfennig, K., Neuberg, D., Ritz, J., Lander, E.S., Fritsch, E.F., Hacohen, N., Wu, C.J., 2017. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 547, 217–221. doi:10.1038/nature22991
- Palmowski, M.J., Gileadi, U., Salio, M., Gallimore, A., Millrain, M., James, E., Addey, C., Scott, D., Dyson, J., Simpson, E., Cerundolo, V., 2006. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J Immunol* 177, 983–990.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P.A., Escott, K.J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., Pirmohamed, M., 2019. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 18, 41–58. doi:10.1038/nrd.2018.168

RÉSULTATS

- Rock, K.L., Shen, L., 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207, 166–183. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x
- Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., Chakarov, S., Rivera, C., Hogstad, B., Bosenberg, M., Hashimoto, D., Gnjatic, S., Bhardwaj, N., Palucka, A.K., Brown, B.D., Brody, J., Ginhoux, F., Merad, M., 2016. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* 44, 924–938. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.012
- Sancho, D., Mourão-Sá, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., Reis e Sousa, C., 2008. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 118, 2098–2110. doi:10.1172/JCI34584
- Sanderson, S., Shastri, N., 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *International Immunology* 6, 369–376.
- Sánchez-Paulete, A.R., Teijeira, Á., Quetglas, J.I., Rodríguez-Ruiz, M.E., Sánchez-Arráez, Á., Labiano, S., Etxeberria, I., Azpilikueta, A., Bolaños, E., Ballesteros-Briones, M.C., Casares, N., Quezada, S.A., Berraondo, P., Sancho, D., Smerdou, C., Melero, I., 2018. Intratumoral Immunotherapy with XCL1 and sFlt3L Encoded in Recombinant Semliki Forest Virus-Derived Vectors Fosters Dendritic Cell-Mediated T-cell Cross-Priming. *Cancer Res* 78, 6643–6654. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0933
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., Rock, K.L., 2004. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155–165. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.004
- Theisen, D.J., Davidson, J.T., Briseño, C.G., Gargaro, M., Lauron, E.J., Wang, Q., Desai, P., Durai, V., Bagadia, P., Brickner, J.R., Beatty, W.L., Virgin, H.W., Gillanders, W.E., Mosammaparast, N., Diamond, M.S., Sibley, L.D., Yokoyama, W., Schreiber, R.D., Murphy, T.L., Murphy, K.M., 2018. WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science* 362, 694–699. doi:10.1126/science.aat5030
- Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., Muhlinen, von, N., Foeglein, A., Randow, F., 2012. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414–418. doi:10.1038/nature10744
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Meth* 13, 731–740. doi:10.1038/nmeth.3901
- Wiśniewski, J.R., Hein, M.Y., Cox, J., Mann, M., 2014. A “proteomic ruler” for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 3497–3506. doi:10.1074/mcp.M113.037309
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M., 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Meth* 6, 359–362. doi:10.1038/nmeth.1322
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., Green, D.R., Oberst, A., Albert, M.L., 2015. RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8⁺ T cells. *Science* 350, 328–334. doi:10.1126/science.aad0395
- Zehner, M., Marschall, A.L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A.J., Dübel, S., Burgdorf, S., 2015. The Translocon Protein Sec61 Mediates Antigen Transport from Endosomes in the Cytosol for Cross-Presentation to CD8⁺ T Cells. *Immunity* 1–15. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.008
- Zhang, X., Wang, W., Bedigian, A.V., Coughlin, M.L., Mitchison, T.J., Eggert, U.S., 2012. Dopamine receptor D3 regulates endocytic sorting by a Prazosin-sensitive interaction with the coatomer COPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 12485–12490. doi:10.1073/pnas.1207821109
- Zhitomirsky, B., Yunaev, A., Kreiserman, R., Kaplan, A., Stark, M., Assaraf, Y.G., 2018. Lysosomotropic drugs activate TFEB via lysosomal membrane fluidization and consequent inhibition of mTORC1 activity. *Cell Death Dis* 9, 1–15. doi:10.1038/s41419-018-1227-0
- Zlokarnik, G., Negulescu, P.A., Knapp, T.E., Mere, L., Burren, N., Feng, L., Whitney, M., Roemer, K., Tsien, R.Y., 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 279, 84–88.

DISCUSSION

Si l'induction artificielle de perturbations endomembranaires par des peptides lytiques constitue une stratégie efficace dans la délivrance cytosolique d'anticorps ou de protéines bioactives (Akishiba *et al.*, 2017; El-Sayed *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015b), l'existence physiologique d'une telle voie a longtemps été débattue, et son rôle dans l'export cytosolique et la présentation croisée d'antigènes, controversé (Rodriguez *et al.*, 1999). L'absence de machinerie connue de réparation membranaire, et *à fortiori* endomembranaire, a en effet largement compliqué la démonstration expérimentale de la pertinence immunologique, notamment à l'état basal, de possibles événements de rupture des membranes intracellulaires. En 2014, l'identification du complexe ESCRT-III comme régulateur général de l'intégrité des membranes biologiques a ouvert la voie à l'appréciation du rôle de cette machinerie dans des processus supposément régulés par des cassures membranaires, comme la présentation croisée d'antigènes extracellulaires.

Ce travail de thèse a donc consisté en l'évaluation, puis en la caractérisation de l'implication d'ESCRT-III dans l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée. Souvent compliquée en raison des fonctions pléiotropes d'ESCRT-III à l'échelle cellulaire (discutées ultérieurement dans cette partie), cette étude a également revêtu un caractère assez « risqué » en début de thèse. En effet, l'hypothèse de départ était uniquement basée sur l'élégante publication de deux équipes de l'Institut Curie (Jimenez *et al.*, 2014) et ne reposait sur aucun criblage génétique ou protéomique. Par ailleurs, l'exploration de la fonction d'ESCRT-III dans les cellules dendritiques, jamais réalisée auparavant, a nécessité l'établissement et la longue mise au point de nouveaux modèles, souvent rendus difficiles par le caractère vital des sous-unités d'ESCRT-III.

Dans cette discussion, je souhaiterais donc revenir sur le défi technique et scientifique qu'a représenté l'étude d'ESCRT-III dans la population immunitaire « hyper-réactive » constituée par les cellules dendritiques. Ces deux aspects ont sans aucun doute compliqué et souvent limité le travail présenté ici, mais lui ont probablement aussi conféré, en tous cas je l'espère, une partie de sa nouveauté et de son originalité.

1. CRITIQUE ET CHOIX DES MODELES ET METHODES EMPLOYES

Les contraintes imposées par la quantité de cellules requise pour l'étude des voies de présentation antigénique, et notamment de la présentation croisée, ainsi que par le caractère vital d'ESCRT-III ont conditionné le choix de la majorité des approches et modèles utilisés dans cette étude. Après les avoir justifiés et discutés, je reviendrai en détail sur les tests fonctionnels employés *in vitro* et *in vivo*, et développerai leurs avantages et limitations.

1.1. Modèles cellulaires

La multiplicité des antigènes employés, la diversité de leur forme physique et des traitements appliqués aux cellules dendritiques rendues ou non déficientes pour différentes sous-unités d'ESCRT-III requièrent un grand nombre de cellules. Ce critère, difficile à satisfaire par l'utilisation unique de cellules dendritiques spléniques primaires (obtention de moins de 2.10⁶ cellules par souris), trouve une résolution grâce à l'emploi alternatif de cellules dendritiques primaires dérivées de moelle osseuse (BMDCs) ou d'une lignée de cDC1 immortalisées appelées MutuDC (Fuertes Marraco *et al.*, 2012). Dans la présente étude, les cDC1 et cDC2 spléniques ont été consacrées à la réalisation d'observations microscopiques destinées à asseoir la relevance physiologique de la voie « de rupture membranaire », tandis que les MutuDC ont servi dans toutes les expériences fonctionnelles pour les raisons développées ci-après.

Si l'immense majorité des études et des conclusions relatives au déroulement intracellulaire de la présentation croisée ont été réalisées dans des BMDCs, ces cellules, largement considérées comme modèle de choix dans le domaine, divergent par certains aspects du type cellulaire dont elles sont censées se rapprocher, au moins partiellement : les cDC1. En effet, au-delà de l'absence de correspondance physiologique entre les cDC1 et les BMDCs différenciées à partir de progéniteurs extraits de la moelle osseuse en présence de GM-CSF ou de FLT3L, ces dernières empruntent en partie la voie vacuolaire en vue de la présentation croisée d'ovalbumine soluble (Murshid *et al.*, 2010), tandis qu'à l'homéostasie, les cDC1 emploient exclusivement la voie cytosolique pour présenter les peptides dérivés de ce même antigène

(Segura *et al.*, 2009). Par ailleurs, au regard du rôle suggéré du récepteur au mannose dans le ciblage de l'ovalbumine vers des compartiments faiblement dégradatifs (Burgdorf *et al.*, 2007), l'expression exclusive de ce récepteur par les BMDCs (Segura *et al.*, 2009) pourrait également influencer les voies engagés en aval de l'internalisation de cet antigène.

Avec ces considérations à l'esprit, nous avons décidé d'employer un autre modèle de cellules dendritiques dérivées de cDC1 immortalisées, appelé MutuDC et déjà éprouvé par Patrycja Kozik, ancienne postdoctorante au sein de l'équipe et dont les travaux sur ces cellules, auxquels j'ai contribué, sont présentés dans ce manuscrit de thèse. Les MutuDC, mises au point par le laboratoire de Hans Acha-Orbea (Fuertes Marraco *et al.*, 2012), sont issues de tumeurs DC qui se développent dans les souris transgéniques exprimant le « large T antigen » du virus oncogène SV40, sous le contrôle du promoteur CD11c (Steiner *et al.*, 2008). À l'instar des cDC1 dont elles sont dérivées, les MutuDC expriment CD8 α , Clec9a, DEC-205, TLR3 ainsi que le facteur de transcription IRF8 et montrent de faibles niveaux d'expression de TLR7 et IRF4, caractéristiques des cDC2 (Fuertes Marraco *et al.*, 2012). De plus, ces cellules présentent une plus faible capacité dégradative que les BMDCs (comparer les PhagoFACS de cette étude et ceux de Alloatti *et al.*, (2015)), sans doute à rapprocher de leur efficacité en termes de présentation croisée. Malgré leur nature transformée et leur faible sensibilité au LPS, un ligand de TLR4 très utile dans l'étude de la présentation croisée (Alloatti *et al.*, 2015) auquel les BMDCs répondent remarquablement, les MutuDC montrent des profils de cellules activées à la suite d'un traitement par d'autres ligands TLR, comme le CpG (TLR9) ou le PolyI :C (TLR3), utilisés dans cette étude. En dépit de leur homogénéité, un paramètre souvent surestimé dans les cultures de BMDCs plus hétérogènes qu'il n'y paraît (Helft *et al.*, 2015), et de leur utilisation progressive par les chercheurs du monde entier (Schulz *et al.*, 2018), l'emploi des MutuDC se heurte à une certaine méfiance du domaine (voir les remarques des reviewers à ce propos dans le « point by point » de ce manuscrit), liée au caractère nouveau et en cours de validation de ce modèle.

Malgré ces quelques défauts, leurs caractéristiques fonctionnelles, proches des cDC1, ainsi que leur facilité de transduction, notamment en vue d'une stratégie de « silencing » lentivirale (voir point suivant) font des MutuDC un outil de choix, probablement amené à se généraliser, dans l'étude des acteurs moléculaires de la présentation croisée.

1.2. Approche perte de fonction et stratégie de « silencing »

La possible participation d'ESCRT-III à la régulation de l'export cytosolique des antigènes a guidé le choix de l'approche « perte de fonction », visant à « éteindre » l'expression de deux de ses sous-unités, Chmp4b et Chmp2a, cruciales pour la réalisation de toutes les fonctions cellulaires portées par ce complexe.

Dans un premier temps, l'approche CRISPR/Cas9 a été envisagée. Afin de la mettre en œuvre, des MutuDC exprimant de façon stable l'endonucléase Cas9 ont été transduites, grâce à des vecteurs lentiviraux, avec trois ARN « guides » contrôles ou spécifiques de Chmp4b. Dix jours après transduction, ces six types de MutuDC différents ont été testés pour leur capacité d'export cytosolique et de présentation croisée des antigènes. Les cellules dendritiques transduites avec des ARN guides spécifiques de Chmp4b présentent toutes une faculté légèrement augmentée à transloquer les antigènes dans le cytosol et à les présenter aux lymphocytes T CD8+, par rapport aux cellules transduites avec des ARN guides non-relevants. Les mêmes cellules, utilisées pour répéter l'expérience à jour 21 post-transduction, ne montrent cependant plus aucun effet sur l'un ou l'autre des paramètres mesurés (données non montrées). Cette observation a rapidement suggéré que l'édition efficace du génome induite par CRISPR/Cas9 et la perte d'expression résultante (KO) de Chmp4b constituent un élément contre-sélectionné dans les cellules cibles, probablement en raison du caractère vital de ce gène. En effet, les souris déficientes pour Chmp4b meurent toutes au jour embryonnaire 7,5 – 8,5 (Lee *et al.*, 2007). Ainsi, la plupart des MutuDC bel et bien KO pour Chmp4b disparaîtraient avant le délai choisi pour la réalisation des tests fonctionnels. Selon cette hypothèse, les cellules restantes évaluées à jour 10 post-transduction pour l'export cytosolique et la présentation croisée d'antigènes correspondraient à une population porteuse de mutations hypomorphes, voire silencieuses, de Chmp4b, à l'origine du faible mais néanmoins robuste effet observé. Dans ce contexte, la stratégie de silencing par CRISPR/Cas9 et les délais qu'elle impose apparaissent peu adaptés à la caractérisation de l'extinction d'un gène vital, comme Chmp4b. Nous avons donc procédé à une seconde approche, basée sur la transfection de siARN, largement employée dans les cellules de mammifères (Gong *et al.*, 2017; Jimenez *et al.*, 2014; Olmos *et al.*, 2015), en raison de ses délais de mise en place plus courts. La transposition aux MutuDC d'une technique de transfert par lipofection efficace dans les BMDCs (Pedersen *et al.*, 2009) n'a cependant jamais

conduit à la diminution attendue des niveaux d'ARNm codant pour Chmp4b dans les cellules transfectées.

La facilité d'infection des MutuDC par les lentivirus, associée à la nécessité de mise en place d'un silencing rapide et aigu, a finalement motivé la mise en œuvre d'une stratégie basée sur la transduction lentivirale de shARN murins. Afin de réduire autant que possible la possibilité d'effets « hors-cible », nous avons choisi de cibler deux membres d'ESCRT-III, Chmp4b et Chmp2a, et ce, grâce à deux shARN différents par cible. Ce système robuste, à l'origine de faibles variations d'une expérience à l'autre, entraîne un « knock-down » efficace des deux cibles sus-citées, estimé par RT-qPCR en l'absence d'anticorps fiables. Comme préalablement supposé, la perte d'expression de Chmp4b ou Chmp2a conduit à la mort progressive (en quelques jours) des cellules transduites, raison pour laquelle nous avons réalisé les tests fonctionnels décrits dans les parties suivantes à jour 3 post-transduction. Ce délai autorise une diminution efficace des niveaux d'ARNm de Chmp4b et Chmp2a, sans pour autant compromettre sérieusement la viabilité cellulaire (Figure R.1.2A et Figure RS.1.2A). Face à l'impossibilité d'établir des lignées cellulaires stablement déficientes pour ces deux protéines, les MutuDC ont été transduites et « silencées » à chaque nouvelle expérience. À cette occasion, différents contrôles, explicités dans la partie suivante, ont été réalisés de façon systématique afin de rendre compte de l'efficacité du silencing.

1.3. Contrôles de l'efficacité du silencing

Comme précédemment mentionné, l'efficacité de la stratégie de perte de fonction par shARN a été évaluée par RT-qPCR, à jour 3 post-transduction. À ce stade, la décroissance des niveaux d'ARN, débutée à 24h post-transduction pour les shRNA forts et à 48h post-transduction pour les shRNA faibles (Figure RS.1.2B), atteint un niveau minimal, probablement suffisant pour induire la diminution de l'expression de Chmp4b et Chmp2a, deux protéines aux demi-vies courtes (32h pour Chmp4b, 23h pour Chmp2a – données tirées de Schwanhäusser *et al.*, (2011) et évaluées dans des NIH/3T3). Afin de rendre compte des conséquences fonctionnelles de la perte de fonction de Chmp4b et Chmp2a, l'activation des cellules transduites, rapportée par Mamińska *et al.*, (2016) comme résultante du silencing d'ESCRT-III, a également été mesurée à jour 3 post-transduction, par l'intermédiaire d'un marquage de surface

pour CD86, CMH-II et CMH-I et par RT-qPCR, grâce à des amorces spécifiques des ADNc des transcrits codant pour TNF, IL-1 β et RelB (Mamińska *et al.*, 2016). La caractérisation complète de l'état inflammatoire des cellules dendritiques, consécutif au silencing de Chmp4b et Chmp2a, souffre sans aucun doute de l'absence de dosage cytokinique, réalisé dans les surnageants de culture par ELISA. La présence de ces molécules pro-inflammatoires est cependant fortement suggérée par l'augmentation de l'expression de CD86 dans les cellules contrôles, co-cultivées dès jour 1 post-transduction avec des cellules dendritiques déficientes pour ESCRT-III (Figure RS.1.5.).

1.4. Tests fonctionnels

L'aspect pluridisciplinaire de ce projet de recherche (immunologie, régulation du trafic intracellulaire, induction de voies de mort cellulaire) a nécessité l'optimisation de techniques existantes au sein du laboratoire ainsi que la mise au point de nouveaux protocoles adaptés au modèle choisi. Je reviendrai sur les avantages et inconvénients des principaux tests utilisés dans cette étude, avant d'explicitier la façon dont nous avons essayé de contrôler certains des biais inhérents à certains d'entre eux.

1.4.1. Rendre compte de la survenue de dommages endomembranaires : observation microscopique des foci galectine-3

Les dommages réparés par ESCRT-III correspondent à des atteintes de petite taille, inférieure à 100 nanomètres (Jimenez *et al.*, 2014) et donc complexes à suivre et à quantifier. Lorsqu'ESCRT-III échoue à compenser la survenue de ces événements de rupture endomembranaire, ces derniers évoluent vers des lésions de plus grande taille, éliminées par lysophagie et permissives à l'accumulation intraluminale de lectines cytosoliques, comme galectine-3 (Maejima *et al.*, 2013). La reconnaissance par galectine-3 des glycoconjugués présents au niveau de la face luminale des compartiments intracellulaires endommagés entraîne la formation de *foci*, visibles par microscopie (Aits *et al.*, 2015). Ainsi, galectine-3 peut être considérée comme un proxy de la survenue de perturbations endomembranaires détectées non seulement à l'état basal, mais également à la suite d'un traitement des cellules par le LLOME,

une drogue convertie en composé membranolytique par la cathepsine C présente dans le lysosome (Aits *et al.*, 2015). En dépit de sa relative facilité de mise en œuvre, ce test réalisé dans des cDC1 et cDC2 purifiées à partir de splénocytes totaux, comporte certains biais que nous avons tenté de contrôler. Notamment, les cDC1 expriment davantage galectine-3 que les cDC2 (Luber *et al.*, 2010 et Figure RS.1.1C). Afin d'exclure le possible caractère causal de ce facteur sur le phénotype différentiel obtenu, un test de corrélation entre intensité de fluorescence de galectine-3 et nombre de foci observés a été réalisé et n'a révélé aucun lien significatif entre ces deux paramètres (Figure RS.1.1D). La galectine-3 ne détient pas le monopole du marquage des compartiments lysés et l'utilisation d'autres lectines de la même famille comme outil de détection des dommages endomembranaire a été envisagée (Thurston *et al.*, 2012). Cependant, l'absence de détection en protéomique de galectine-8 dans les cellules dendritiques spléniques (Luber *et al.*, 2010) a limité le choix de la lectine choisie pour rendre compte de la perméabilisation des compartiments intracellulaires des cDC1 et cDC2. Un second biais réside possiblement dans l'expression supérieure de cathepsine C, responsable du clivage du LLOME, dans les cDC2, suggérée par les données de transcriptomique disponibles (immgen.org). En revanche, les résultats obtenus en protéomique démontrent une répartition équivalente de cette protéase dans les deux sous-populations de cellules dendritiques spléniques (Luber *et al.*, 2010). Il semble donc peu probable que cet élément influence les résultats obtenus (et développés ci-après). À ce jour, nous ne sommes pas en mesure d'élucider les raisons pour lesquelles les cDC2 meurent davantage en réponse au LLOME. Bien qu'initialement décrit comme exerçant une action pro-apoptotique (Thiele and Lipsky, 1990), le LLOME induit un type de mort cellulaire non compensé par l'utilisation simultanée d'un inhibiteur à large spectre de caspases, appelé z-VAD-FMK (données non montrées). Nous ne pensons cependant pas que ce facteur suffise à lui seul à expliquer le phénotype de survenue accrue de lésions dans les cDC1, puisque ce dernier est également reproduit dans des conditions expérimentales sans effet sur la viabilité des cDC2. Enfin, un traitement court avec le LLOME (30 minutes ici) permet de s'affranchir partiellement de la mise en œuvre de la machinerie autophagique, dont les manifestations précoces, comme l'ubiquitination des protéines lysosomales (Maejima *et al.*, 2013), n'interviennent que plus tardivement (Radulovic *et al.*, 2018).

1.4.2. Quantifier l'export cytosolique des antigènes : principe et limites du test β -lactamase

Comme évoqué en introduction de cette thèse, les premières preuves expérimentales du déroulement de l'étape d'export cytosolique des antigènes résultent de l'observation du blocage de la synthèse protéique, occasionné par le transport de la gélonine, une toxine inhibitrice de l'activité traductionnelle des ribosomes (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995). Par la suite, un second test, basé sur l'export du cytochrome c et l'induction apoptotique qui en découle, a été développé (Lin *et al.*, 2008). Bien que déterminantes dans la démonstration de l'existence de la voie cytosolique et de la supériorité des cDC1 à l'employer, ces deux approches expérimentales pèchent par leur toxicité et leur caractère peu quantitatif. Afin de pallier ces défauts, notre équipe a modifié et adapté (Cebrian *et al.*, 2011) une approche initialement développée pour mesurer la fuite de pathogènes dans le cytosol, consécutive à la rupture du compartiment microbien (Ray *et al.*, 2010). Brièvement, les cellules dendritiques – à l'époque, des BMDCs – sont d'abord chargées avec du CCF4, un substrat cytosolique composé de deux fluorochromes (hydroxycoumarine et fluorescéine) séparés par un site de clivage par une enzyme, la β -lactamase. En l'absence d'enzyme, grâce à un processus de FRET, le CCF4 produit une fluorescence verte, correspondant à l'émission de la fluorescéine après excitation à 450 nm. Le clivage du CCF4 par la β -lactamase entraîne l'interruption du signal FRET et l'émission d'une fluorescence bleue, à la suite de l'excitation à 450 nm. Après marquage avec le CCF4, les cellules sont incubées pendant différents temps, à 37°C, en présence de l'enzyme. Lorsque cette dernière est efficacement transportée dans le cytosol, elle y clive son substrat : le ratio entre les fluorescences bleue et verte est alors immédiatement quantifié par cytométrie en flux, et utilisé comme reflet de l'efficacité de l'export cytosolique de la β -lactamase (Vivar *et al.*, 2016). Contrairement aux BMDCs, les MutuDC perdent le CCF4 à 37°C et le test a alors été légèrement modifié par Patrycja Kozik : les MutuDC sont d'abord incubées avec la β -lactamase, puis chargées avec le CCF4. Une étape supplémentaire d'incubation sur la nuit, à température ambiante, a également été rajoutée afin d'accroître la sensibilité du test (Kozik *et al.*, en préparation – papier joint aux résultats de ce manuscrit). En dépit de son absence de toxicité, de sa facilité de mise en œuvre et de la quantification précise qu'il autorise, ce test intègre néanmoins un biais majeur aux résultats. En effet, la β -lactamase est produite dans des bactéries et donc contaminée par des endotoxines. En conséquence, le test β -lactamase apparaît

relativement inadapté lorsqu'il s'agit de déterminer l'influence précise des TLRs dans l'export. Il nous semble cependant qu'il n'en demeure pas moins un outil valide dans l'étude des autres aspects de ce processus intracellulaire, y compris ceux développés dans ces travaux de thèse.

1.4.3. Étudier les conséquences de l'export cytosolique des antigènes : tests fonctionnels de présentation croisée

Afin de rendre compte de la capacité des MutuDC déficientes pour ESCRT-III à engager les voies de présentation croisée, nous avons tiré parti des multiples outils expérimentaux développés autour de l'antigène modèle OVA. Un clone T spécifique du peptide immunodominant de l'OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄ ou SIINFEKL) s'est avéré particulièrement adapté à notre étude. En effet, contrairement à la situation observée chez les lymphocytes T primaires OT-I, l'activation de l'hybridome B3Z est indépendante de l'engagement des molécules de costimulation CD80/86 (signal 2) et repose exclusivement sur la reconnaissance de SIINFEKL présenté dans un contexte CMH-I (Karttunen and Shastri, 1991) (signal 1). Ce système permet donc de s'affranchir grandement de l'influence des molécules de costimulation, induites en l'absence de stimulation dans les cellules dendritiques déficientes pour ESCRT-III, et par conséquent de révéler les aspects intracellulaires régulés par cette machinerie. C'est également la raison pour laquelle cet hybridome a été employé dans les expériences d'induction de NF- κ B par le ligand CpG du TLR9 (Figure R.1.3).

1.5. (Absence de) Modèles *in vivo* et stratégie compensatoire

Afin d'étendre les conclusions obtenues *in vitro* à un contexte physiologique, plusieurs modèles de souris invalidées pour différents composants d'ESCRT-III, de façon constitutive ou conditionnelle, ont été envisagés et testés. En l'absence de souris Chmp4b_{flox/flox} et à titre préliminaire, la fréquence des cDC1 et cDC2, reflet de leur viabilité, a d'abord été évaluée dans des souris spécifiquement déplétées pour Chmp4c dans les cellules dendritiques (Chmp4c_{flox/flox} CD11c-Cre), disponibles dans l'équipe de Philippe Benaroch. Cependant, l'observation de fréquences similaires de cDC1 et cDC2 dans les souris CD11c-Cre⁺ et CD11c-Cre⁻ a assez tôt suggéré une contribution faible, voire nulle, de Chmp4c au maintien de la viabilité cellulaire

(données non montrées) et par extension, au processus de réparation membranaire. Cette conclusion n'est pas totalement surprenante : Chmp4c est principalement décrit en tant que « retardateur » de l'abscission cytokinétique (Carlton *et al.*, 2012). Or, cette fonction repose entièrement sur son recrutement préalable par Alix (Christ *et al.*, 2016), un adaptateur dont la perte d'expression n'influence pas la réparation des lésions endomembranaires (Skowyra *et al.*, 2018). L'absence de phénotype dans les cellules dendritiques KO pour Chmp4c est aussi probablement liée à un phénomène de redondance et de compensation, notamment par Chmp4b. En effet, la libération de virions dans les cellules déficientes pour Chmp4c est comparable à celle observée dans les cellules contrôle (Morita *et al.*, 2011). En revanche, la production virale est sévèrement affectée par la perte de Chmp4b, ce qui suggère une prépondérance du rôle de cette sous-unité dans les phénomènes de déformation membranaire (Morita *et al.*, 2011). De façon analogue, les BMDCs issues des souris Chmp2b KO, ne présentent qu'une capacité deux fois supérieure d'export par rapport aux BMDCs WT (données non montrées). Ce résultat souligne à nouveau l'importance d'ESCRT-III dans l'export cytosolique des antigènes, mais la faible différence constatée entre BMDCs WT et Chmp2b KO complique l'utilisation de ce modèle pour évaluation fonctionnelle *in vivo*. Ces observations confirment également le rôle accessoire de la sous-unité Chmp2b dans la réparation membranaire (Gong *et al.*, 2017b), comme dans le bourgeonnement viral (Morita *et al.*, 2011) et la reformation de l'enveloppe nucléaire (Olmos *et al.*, 2015). Ces deux modèles ont donc été abandonnés au profit de l'expérience présentée dans la partie Résultats de ce manuscrit. Si elle n'est pas idéale et demeure limitée dans ses conclusions, cette expérience basée sur le transfert adoptif de lymphocytes OT-I et de MutuDC chargées avec de l'OVA permet tout de même de confirmer la supériorité des cellules déficientes pour ESCRT-III à activer les lymphocytes T CD8+, au sein d'un organisme « entier ».

2. CRITIQUES ET PERSPECTIVES DES RESULTATS OBTENUS

2.1. La rupture endomembranaire comme mécanisme d'export cytosolique des antigènes

2.1.1. Rappel et discussion des résultats obtenus

Afin de rendre compte de la survenue éventuelle de phénomènes de rupture endomembranaire dans les cDC1 et cDC2, nous avons comparé le nombre de *foci* galectine-3 dans ces deux sous-populations de cellules dendritiques, à la suite de différents traitements. De façon frappante et dans toutes les conditions expérimentales explorées ici, l'abondance de ces marqueurs de perméabilité membranaire est supérieure dans les cDC1 et corrèle donc avec la capacité de présentation croisée de cette sous-population de cellules dendritiques. Au regard de la nature des dommages marqués par galectine-3 (voir section 1.4.1. de cette discussion), deux hypothèses complémentaires se posent alors. La supposition la plus intuitive consiste à penser que les cDC1 réparent de façon moins efficace les lésions endomembranaires. En accord avec ce postulat, les cDC2 expriment davantage Chmp2a (ESCRT-III), Chmp2b (ESCRT-III), Vps4a et Vps4b (complexe de dissociation d'ESCRT-III) (Luber *et al.*, 2010), ce qui pourrait leur conférer une capacité supérieure d'excision des dommages membranaires (N. B. : les autres composants d'ESCRT-I, -II et -III sont exprimés de façon équivalente par les cDC1 et cDC2). Alternativement, les compartiments intracellulaires des cDC1 pourraient être le siège d'atteintes plus importantes et/ou plus nombreuses, comme suggéré par le recrutement de nombreuses sous-unités d'ESCRT-III dans les endolysosomes de cette sous-population. La survenue accrue de lésions dans les cDC1 pourrait ainsi submerger la capacité basale de résolution par ESCRT-III et conduire au phénotype observé. Au-delà de l'induction différentielle de *foci* dans les cDC1 et cDC2, il est en outre fascinant de constater que la fréquence des perturbations marquées par galectine-3 reflète l'efficacité avec laquelle sont présentés les peptides dérivés de deux préparations d'OVA, contaminées ou non avec des endotoxines. Ces résultats révèlent collectivement une corrélation remarquable entre perméabilité endomembranaire et présentation croisée, renforcée par la nature des compartiments ciblés par galectine-3 dans les cDC1. En effet, à l'état basal, galectine-3 est enrichie dans les endosomes précoces des cDC1,

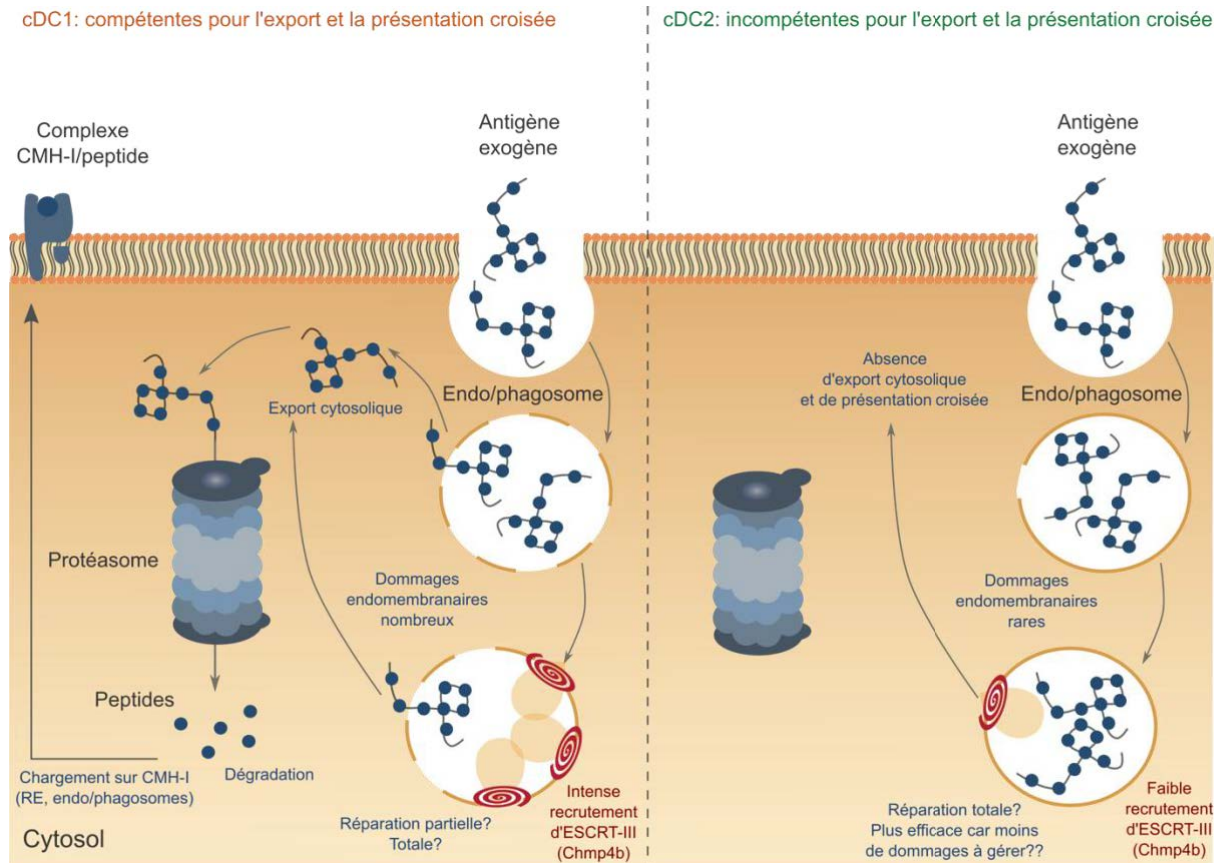


Figure D.2.1. : Modèle comparatif du rôle d'ESCRT-III dans les cDC1 et cDC2

Contrairement au modèle présenté en Figure D.2.4., cette figure s'appuie uniquement sur les éléments démontrés par nos résultats. Ainsi, nous observons dans les cDC1 des dommages plus nombreux qui suggèrent à la fois une survenue accrue de lésions endomembranaires dans cette population de cellules dendritiques (indiqué par le recrutement massif d'ESCRT-III dans les compartiments de ces cellules), et peut-être également une capacité inférieure de résolution des atteintes intracellulaires. Ces dommages provoquent le recrutement d'ESCRT-III à la membrane des endo/phagosomes et leur réparation (partielle ? totale ?), ce qui restreint l'export cytosolique des antigènes et de la présentation croisée.

par rapport à ceux des cDC2 (données de protéomique d'Elodie Segura), ce qui laisse supposer la présence de ruptures au niveau de ces compartiments à partir desquels s'opère probablement l'export cytosolique des antigènes (Howland and Wittrup, 2008).

En accord avec deux études précédemment publiées (Radulovic *et al.*, 2018; Skowrya *et al.*, 2018), nos résultats démontrent également qu'ESCRT-III est nécessaire à la réparation de ces dommages. En effet, l'absence de Chmp4b provoque l'accumulation de *foci* galectine-3, indicatifs de la présence de lésions non excisées par ESCRT-III. De façon étonnante, nous ne retrouvons pas ce phénotype dans les cellules déficientes pour Chmp2a (données non montrées). Dans ce cas précis, il est possible que le cou plus resserré des vésicules ébauchées (Morita *et al.*, 2011) limite l'accès de galectine-3 à la lumière endosomale et la détection des *foci*. Ce paramètre ne semble pas influencer la fuite de la β -lactamase (possiblement exportée sous forme partiellement dépliée et donc stériquement moins encombrante), puisque la perte d'expression de Chmp2a, comme celle de Chmp4b, augmente drastiquement le transport cytosolique de cet antigène, de façon intrinsèque et indépendante de l'induction de NF- κ B, consécutive au silencing d'ESCRT-III. Nos résultats concourent à l'élaboration d'un modèle (Figure D.2.1.) selon lequel l'export cytosolique des antigènes fait suite à l'apparition de dommages ciblant les compartiments endocytiques et excisés par ESCRT-III. Par ce biais, ESCRT-III préserve la viabilité cellulaire mais limite le transport des antigènes dans le cytosol et la présentation croisée dans les cellules dendritiques. Si notre étude participe à la réévaluation de l'hypothèse de « la rupture du compartiment », elle ne résout cependant pas complètement totalement la question de la nature des dommages à l'origine de la translocation cytosolique des antigènes, discutée dans la section suivante.

2.1.2. Origine des dommages endomembranaires

À la lumière de la littérature et des résultats évoqués à la fin de cette étude, nous dégageons deux principales théories afin de tenter d'expliquer les causes de la rupture du compartiment endolysosomal dans les cDC1.

2.1.2.1. L'hypothèse lipidique

À l'état basal, la survenue accrue de dommages intracellulaires dans les cDC1 pourrait suggérer une certaine fragilité de la membrane limitante des compartiments endolysosomaux dans cette population cellulaire. En accord avec cette hypothèse, les transcrits codants pour *Asah1* et *Asah2*, deux céramidases responsables de la synthèse de sphingosine, sont plus abondamment exprimés dans les cDC1 que dans les cDC2 (immgen.org). Si cet alcool gras est effectivement associé à la déstabilisation de membranes artificielles (Contreras *et al.*, 2006; Jiménez-Rojo *et al.*, 2014; Siskind *et al.*, 2002), son enrichissement concret dans les membranes des cDC1, ainsi que ses conséquences fonctionnelles éventuelles, demeurent purement spéculatifs en l'absence de lipidomique comparée entre les deux populations de cellules dendritiques. Cependant, plusieurs études semblent effectivement indiquer que l'abondance de certains lipides dans les membranes biologiques influence l'apparition de lésions et le recrutement d'ESCRT-III. Ainsi, la diminution du ratio entre phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine occasionne une perméabilité membranaire accrue dans les hépatocytes, à l'origine de pathologies hépatiques (Li *et al.*, 2006). De façon intéressante, chez *C. elegans*, la perte d'expression d'une flippase conduit à l'accumulation de phosphatidyléthanolamine au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. Ce phénomène s'accompagne du bourgeonnement de vésicules depuis la membrane plasmique suivi de leur libération, médiée par ESCRT-III, dans le milieu extracellulaire (Wehman *et al.*, 2011). Si ce phénotype d'excision de bourgeons membranaires rappelle celui observé lors de la réparation de dommages induits par un faisceau laser (Jimenez *et al.*, 2014), il n'est cependant pas certain qu'ESCRT-III forme des vésicules en réponse à des dommages. En effet, les voies de réparation membranaire ne semblent pas nécessiter l'intervention d'ESCRT-0 (Jimenez *et al.*, 2014; Radulovic *et al.*, 2018; Skowrya *et al.*, 2018), contrairement à celles aboutissant à la formation des vésicules sus-mentionnées. Ces modifications de composition lipidique sont également conditionnées par l'irruption d'un contexte inflammatoire et pourraient contribuer aux transformations fonctionnelles subies par les cellules dendritiques dans un tel environnement. À cet égard, il est intéressant de constater que l'activation des cellules dendritiques spléniques totales par le LPS conduit à une accumulation de céramide, le lipide dont dérive la sphingosine (Ocaña-Morgner *et al.*, 2017).

Si le rôle de ces lipides particuliers dans la fragilisation des membranes biologiques reste à éclaircir, il semble désormais indéniable que certaines modifications chimiques des lipides, favorisées notamment par la présence de LPS, induisent un certain degré de perméabilité endomembranaire. Ainsi, l'activation de NOX2, stimulée par la présence d'endotoxines (Bae *et al.*, 2009), entraîne la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène, responsables de la peroxydation de lipides endolysosomaux (Dingjan *et al.*, 2016). Ce phénomène, à l'origine d'évènements de rupture endomembranaire, pourrait non seulement expliquer la hausse de la fréquence d'apparition des *foci* galectine-3 en présence d'OVA contaminée par des endotoxines, mais également éclairer le phénotype différentiel observé dans les cDC1 et cDC2, notamment à l'état basal. En effet, l'expression sélective de Rac2 dans les cDC1 dirige l'assemblage de NOX2 à la membrane endolysosomale (Savina *et al.*, 2009). En conséquence, cette sous-population de cellules dendritiques présente des niveaux intraluminaux de ROS bien supérieurs à ceux observés dans les cDC2, qui expriment plus faiblement Rac2 (Savina *et al.*, 2009). L'abondance des ROS dans les compartiments endocytiques des cDC1 pourrait ainsi occasionner une certaine perméabilité endomembranaire, en accord avec nos observations microscopiques notamment réalisées à l'état basal.

Cette hypothèse lipidique évoquée dans la littérature ne manque pas d'intérêt, mais requiert des validations expérimentales supplémentaires. Par ailleurs, nos travaux suggèrent que les lésions endomembranaires qui conduisent à l'export cytosolique des antigènes pourraient résulter d'un autre phénomène, comme développé dans la partie qui suit.

2.1.2.2. L'hypothèse nécroptotique

À l'état basal, ESCRT-III excise sous forme de vésicules les portions de membrane plasmique endommagées par la présence d'oligomères de MLKL et contribue donc au maintien de la viabilité cellulaire (Gong *et al.*, 2017b). Nos résultats suggèrent que ces pores, produits par l'induction basale de la nécroptose, pourraient également se former au niveau de la membrane limitante des endolysosomes et entraîner sa rupture, à l'origine de la fuite cytosolique des antigènes contenus dans le compartiment lésé. De façon analogue aux évènements décrits pour la membrane plasmique, ESCRT-III restaurerait l'intégrité des compartiments intracellulaires tout en limitant la fuite incontrôlée de leur contenu. Cette conclusion repose sur plusieurs

DISCUSSION

observations. En effet, la perte d'expression de Chmp4b et Chmp2a conduit à l'accumulation d'oligomères de MLKL et ce, dès jour 3 post-transduction. Le traitement des cellules déficientes pour ESCRT-III par un inhibiteur de RIPK3, la kinase responsable de l'activation de MLKL, provoque quant à lui une diminution de la formation de ces oligomères, associée à une baisse drastique de l'efficacité de l'export cytosolique des antigènes. Nous n'observons en revanche pas d'effet de cet inhibiteur sur le transport de la β -lactamase dans les cellules contrôle, probablement en raison d'une gamme dynamique étroite (entre 1 et 3% de cellules compétentes pour l'export). Ces résultats appellent une confirmation expérimentale, ainsi que la réalisation de contrôles supplémentaires. Nous souhaiterions notamment vérifier que l'inhibiteur utilisé dans nos expériences, GSK'872, n'inhibe pas l'internalisation de la β -lactamase dans les cellules traitées.

Si ces résultats apparaissent, à raison, très préliminaires, ils s'avèrent toutefois soutenus par un certain nombre d'arguments soulevés par des études et observations parallèles. De fait, à la suite de sa phosphorylation par RIPK3, MLKL s'insère non seulement dans la membrane plasmique (Dondelinger *et al.*, 2014; Tanzer *et al.*, 2016), mais également dans les endomembranes (Frank *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2017), par l'intermédiaire de sa liaison à divers phosphoinositides. Au regard de la perméabilité endolysosomale observée au cours de l'induction nécroptotique et préalable à la rupture de la membrane plasmique (Vanden Berghe *et al.*, 2010), il est possible que ces pores perturbent l'intégrité des compartiments intracellulaires et conduisent à la déstabilisation de domaines endomembranaires. Le caractère précoce de la rupture endolysosomale pourrait supposer un assemblage initial de MLKL aux endomembranes, précédant son oligomérisation à la membrane plasmique. Il pourrait également indiquer, en cas de recrutement simultané de MLKL au niveau de toutes les membranes biologiques, que la quantité de pores nécessaires à la déstabilisation des compartiments intracellulaires est inférieure à celle nécessaire à la rupture de la membrane plasmique. Cette seconde hypothèse concorde avec nos observations : à jour 3 post-transduction, les MutuDC déficientes pour Chmp2a (en particulier) présentent une viabilité comparable à celle des cellules contrôle mais montrent déjà une capacité supérieure de présentation croisée, probablement liée à leur faculté accrue de transport des antigènes dans le cytosol.

DISCUSSION

Forts de ces observations, nous avons tenté de confirmer les résultats obtenus avec l'inhibiteur de RIPK3 (GSK'872) dans des MutuDC KO pour MLKL. Pour ce faire, nous avons employé la technique CRISPR/Cas9 et utilisé un ARN guide ciblant l'exon 2 de MLKL. Les MutuDC transduites avec cette construction montrent effectivement une déplétion à hauteur de 90% de MLKL, détectée par Western Blot par l'intermédiaire d'un anticorps reconnaissant la région « brace » de cette protéine (AA 126–178 - Hildebrand *et al.*, 2014). Ces cellules, également rendues déficientes pour Chmp4b ou Chmp2a, présentent en revanche une capacité d'export similaire à celle de leurs homologues silencées pour ESCRT-III mais compétentes pour MLKL. Ces résultats soulèvent deux hypothèses. La première consiste à penser que RIPK3 exerce sa fonction kinase sur une autre cible que MLKL. Si nous ne pouvons pas exclure formellement une telle supposition, la littérature désigne principalement MLKL comme cible de RIPK3, hormis dans un contexte particulier d'ischémie/reperfusion où RIPK3 induit la nécroptose des cardiomyocytes à la suite de la phosphorylation de CaMKII (Zhang *et al.*, 2016). S'il est évidemment possible que RIPK3 médie son effet sur l'export par l'intermédiaire de cibles encore inconnues à ce jour, nous pensons que notre stratégie de déplétion de MLKL pourrait affecter les résultats obtenus. En effet, comme précédemment mentionné, l'ARN guide utilisé cible l'exon 2 de MLKL. Or, l'exon 1 suffit à coder le domaine N-terminal (AA 1-125) de cette protéine (données disponibles sur la CCDS database de NCBI), nécessaire et suffisant à la formation des pores membranaires chez la souris (Hildebrand *et al.*, 2014). Dans notre système, les MutuDC « KO » pour MLKL pourraient donc continuer à produire une version tronquée, mais fonctionnelle de MLKL. Afin de tester cette hypothèse, nous souhaiterions dépléter MLKL (et RIPK3) grâce à l'approche shARN. En s'attaquant aux ARNm codant pour ces protéines, cette technique permettrait de détruire l'intégralité de la séquence protéique considérée, et donc de véritablement évaluer l'importance de MLKL dans l'export cytosolique des antigènes.

De façon intéressante, le complexe pyruvate déshydrogénase constitue une troisième cible décrite de RIPK3 au cours de la nécroptose (Yang *et al.*, 2018). La phosphorylation de ce complexe par RIPK3 repose sur la capacité de MLKL à former des pores dans la membrane mitochondriale, et conduit à la synthèse de ROS dans ce compartiment. Si la production de ces espèces chimiques et leur libération dans le cytoplasme pourraient théoriquement contribuer aux événements de rupture endomembranaire décrits dans la section précédente (Dingjan *et al.*,

2016), il semble cependant qu'elles soient indépendantes de l'activité kinase de RIPK3 dans les BMDCs (Moriwaki *et al.*, 2014). En effet, dans cette étude, l'utilisation d'un inhibiteur de la fonction kinase de RIPK3, GSK'843 (différent de celui utilisé dans nos expériences), n'influence aucunement la production de cytokines pro-inflammatoires, régulée par l'induction de ROS dépendante de RIPK3 (Moriwaki *et al.*, 2014). Or, l'augmentation de l'export cytosolique dans les cellules déficientes pour ESCRT-III semble reposer sur l'activité kinase de RIPK3, puisque son inhibition par GSK'872 compromet ce phénotype. Cependant, afin d'exclure définitivement un rôle des ROS mitochondriaux dans l'induction de la fuite cytosolique des antigènes, consécutive à la perte d'expression d'ESCRT-III, nous envisageons de neutraliser les ROS grâce à un composé aux propriétés antioxydantes, l'hydroxyanisole butylé ou BHA.

Par ailleurs et comme souligné en introduction (se référer à la partie 3.1.2.4.), GSK'872 peut, en plus de bloquer l'activité kinase de RIPK3, stabiliser cette protéine et conduire à l'activation des caspases. Cette dernière est également observée à la suite du silencing de Chmp4b et Chmp2a mais contribue probablement faiblement au phénotype d'export cytosolique observé. En effet, la réalisation du test β -lactamase dans des MutuDC contrôle ou déficientes pour ESCRT-III montre des résultats très similaires en présence de z-VAD-FMK, un inhibiteur à large spectre des caspases, ou en son absence (données non montrées). Il semble donc que l'induction nécroptotique soit responsable, potentiellement par l'intermédiaire de l'insertion d'oligomères de MLKL dans les endomembranes, du phénotype d'export accru observé dans les cellules déficientes pour Chmp4b ou Chmp2a. À cet égard et même si l'on ne peut affirmer avec certitude que ces deux observations sont causalement reliées, il est intéressant de constater que Hsp90, une protéine chaperonne requise pour la translocation cytosolique des antigènes (Imai *et al.*, 2011), régule également positivement la fonction de RIPK3 et MLKL (Jacobsen *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2014).

Enfin, l'hypothèse nécroptotique pourrait également éclairer le phénotype différentiel de lésions endomembranaires observé dans les cDC1 et cDC2. En effet, le « profil protéique » des cDC1 suggère l'induction d'une nécroptose basale supérieure à celle qui pourrait prendre place dans les cDC2. Ainsi, les cDC1 expriment bien plus fortement RIPK1 et RIPK3 que les cDC2 (Luber *et al.*, 2010). En outre, l'activation et la stabilité de ces protéines pourraient être favorisées par l'expression inférieure de caspase-8 dans les cDC1, par rapport aux cDC2 (Luber

En respect du droit d'auteur et de la propriété intellectuelle, ce contenu a été retiré de cette version

Figure D.2.2. : Conservation évolutive des sous-unités d'ESCRT chez les Eucaryotes

Tiré de Leung *et al.*, (2008)

et al., 2010). Ainsi, si nos résultats nous orientent vers une origine « nécroptotique » des dommages endomembranaires réparés par ESCRT-III, il est également possible que d'autres protéines membranolytiques facilitent l'export cytosolique des antigènes. En effet, la perforine Mpeg1 compte parmi les transcrits les plus différentiellement exprimés entre cDC1 et cDC2 (immgen.org). Par ailleurs, certaines conditions physiopathologiques, comme la compaction des vaisseaux sanguins et lymphatiques au sein des tumeurs solides (Stylianopoulos *et al.*, 2012), pourraient favoriser la survenue d'évènements de rupture endomembranaires et le recrutement d'ESCRT-III, à l'instar des phénomènes observés au niveau de l'enveloppe nucléaire (Denais *et al.*, 2016; Raab *et al.*, 2016). De plus, au-delà de sa propriété d'excision des dommages endomembranaires, ESCRT-III pourrait réguler la translocation des antigènes et leur présentation croisée par l'intermédiaire d'autres fonctions.

2.1.3. Régulation de l'export cytosolique des antigènes par ESCRT-III : implication de la fonction de réparation membranaire et au-delà

Si la formation des endosomes multi-vésiculés a longtemps été considérée comme la fonction primaire d'ESCRT-III, elle pourrait s'inscrire dans un spectre plus large d'activités de déformation membranaire, dont la réparation des membranes biologiques constituerait le fer de lance ancestral.

2.1.3.1. Remodelage membranaire par ESCRT-III : aspects évolutifs

En 2008, une fascinante étude phylogénétique a comparé la conservation des différents complexes ESCRT parmi les 5 grands phyla eucaryotes (Leung *et al.*, 2008) : les opisthokonta (métazoaires et champignons), les amoebozoa (protozoaires simples), les archaeplastida (eucaryotes capables de photosynthèse), les chromalveolata (phylum divers qui comprend notamment les apicomplexa *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*) et les excavata (unicellulaires souvent flagellés comme *Giardia intestinalis* ou *Trypanosoma cruzi*). Tandis qu'ESCRT-0 est spécifique aux opisthokonta et qu'ESCRT-I et II sont absents chez de nombreux apicomplexa, le complexe ESCRT-III et les protéines qui lui sont associées montrent une conservation remarquable dans tous les phyla eucaryotes (Leung *et al.*, 2008) (Figure D.2.2.).

Au sein du complexe ESCRT-III, le degré de conservation des sous-unités qui le constituent varie : Chmp2, Vps4 et Chmp7 sont retrouvées chez des espèces disséminées dans les cinq grands phyla eucaryotes (Leung *et al.*, 2008). Si cette conclusion n'est probablement guère surprenante en ce qui concerne Chmp2 et Vps4, nécessaires à toutes les fonctions biologiques portées par ESCRT-III, il en est autrement pour Chmp7. En effet, cette protéine joue un rôle purement accessoire (car probablement redondant) dans le bourgeonnement viral (Morita *et al.*, 2011) et son rôle dans la formation des endosomes multi-vésiculés est peu documentée. En revanche, Chmp7 est absolument nécessaire à la reformation et à la réparation de l'enveloppe nucléaire, à la suite de la mitose (Olmos *et al.*, 2016) ou lors de la migration cellulaire (Denais *et al.*, 2016). Autrefois sous-estimée, la dissémination de Chmp7 observée dans les différents clades de l'arbre phylogénétique suggère une participation possible de cette sous-unité au complexe ESCRT ancestral présent chez le dernier ancêtre commun aux eucaryotes. Ainsi, les fonctions de réparation membranaire portées par ESCRT-III, et notamment celles opérées au niveau de l'enveloppe nucléaire, pourraient revêtir un caractère plus ancestral qu'initialement considéré. Selon cette hypothèse, les autres manifestations des fonctions d'ESCRT-III – formation des endosomes multi-vésiculés, fermeture du phagophore, régulation de la présentation croisée... - correspondraient essentiellement à une diversification et à une cooptation de la fonction ancestrale de réparation.

2.1.3.2. Implication possible de l'autophagie canonique et non-canonique dans le phénotype observé d'export cytosolique des antigènes et de présentation croisée

Au regard de la démonstration récente de l'implication d'ESCRT-III dans la fermeture du phagophore au cours de l'induction dite « canonique » de l'autophagie (Takahashi *et al.*, 2018), il convient de s'interroger sur les conséquences éventuelles de cette dernière sur le phénotype observé d'export cytosolique des antigènes et de présentation croisée. À ce jour, les modalités selon lesquelles l'autophagie canonique régule la présentation croisée d'antigènes demeurent obscures et le cadre de réflexion mal défini. Plusieurs hypothèses sont évoquées : la diminution sélective de la présentation croisée d'antigènes solubles par les cellules dendritiques spléniques déficientes pour Atg7 a d'abord suggéré que l'induction des voies autophagiques pourrait contribuer à la création d'un compartiment faiblement dégradatif au sein duquel les antigènes

solubles seraient préservés (Mintern *et al.*, 2015). Cette interprétation éclaire ainsi également la raison pour laquelle, dans cette étude, la présentation croisée d'antigènes cellulaires, acquis par phagocytose et dont les épitopes sont probablement moins rapidement dégradés, se déroule indépendamment du caractère fonctionnel ou non de la voie autophagique (Mintern *et al.*, 2015). Dans ce cadre de réflexion et au regard du rôle d'Atg7 dans l'élongation de l'autophagosome, nous pourrions envisager que la déplétion d'ESCRT-III perturbe la formation de ce compartiment protecteur et réduise la présentation croisée d'antigènes solubles. Or, nous observons non seulement le phénotype inverse, mais ce dernier est également conservé dans le cas d'antigènes particuliers, pour lesquels la présentation croisée est *à priori* indépendante de l'autophagie (Mintern *et al.*, 2015). Ainsi, dans notre système, si l'autophagie contribue effectivement au phénotype observé, il est peu probable qu'elle le fasse par l'intermédiaire de la formation d'un compartiment de stockage faiblement dégradatif. Une seconde illustration possible, mais spéculative, d'ESCRT-III dans le processus autophagique résiderait dans sa capacité à réparer les lésions induites par les pores MLKL. En effet, ces dernières se forment également à la surface des autophagosomes/autophagolysosomes et inhibent le flux autophagique, à la suite de l'induction nécroptotique (Frank *et al.*, 2019). ESCRT-III pourrait ainsi, par l'intermédiaire du retrait des lésions causées par les oligomères MLKL, garantir la fonction dégradative des compartiments autophagiques, mais également des compartiments endocytiques. Je profite de ce moment de la discussion pour souligner que le devenir des pores MLKL suite à l'excision des dommages qu'ils provoquent est inconnu. Les observations microscopiques de Gong *et al.*, (2017b) semblent indiquer une localisation de MLKL à la base du bourgeon excisé. Il est donc possible que la libération de la vésicule endommagée provoque la dissociation des oligomères et leur recyclage dans le cytoplasme. Cependant, en l'absence d'expériences permettant de détecter formellement MLKL dans les ectosomes libérés, nous ne pouvons raisonnablement pas exclure la possibilité selon laquelle les oligomères MLKL seraient éliminés par ESCRT-III en même temps que la portion de membrane dans laquelle ils sont enchâssés. Cette situation est notamment observée au cours de la pyroptose, un autre type de mort cellulaire causé par l'insertion membranaire de pores gasdermine D et régulé de façon analogue par ESCRT-III (Rühl *et al.*, 2018). Selon cette dernière hypothèse, la perte d'expression d'ESCRT-III entraînerait également la persistance endomembranaire des pores MLKL, qui en plus d'entraîner la rupture des compartiments atteints et l'export des antigènes contenus,

préservait lesdits antigènes en vue de leur translocation. Dans ce cas de figure et contrairement à la première hypothèse mentionnée, l'autophagie limiterait l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée, en vertu de son rôle dans l'acheminement d'antigènes vers des compartiments dégradatifs.

Dans ce même ordre d'idées, la phagocytose associée à LC3 (désignée par l'acronyme LAP), une forme « non-canonique » d'autophagie, a très récemment été identifiée comme régulateur négatif de l'export cytosolique des antigènes et de la présentation croisée (Sil *et al.*, 2019 - disponible sur BioRxiv grâce au lien suivant <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/789867v1>). En effet, les BMDCs déficientes pour Rubicon, une protéine spécifiquement impliquée dans la LAP, séquestrent les antigènes dans des compartiments plus précoces que leurs homologues compétentes pour Rubicon. En conséquence, ces antigènes mieux préservés sont exportés et présentés plus efficacement, ce qui conduit à l'induction de puissantes réponses antitumorales. Si l'implication d'ESCRT-III dans la LAP est encore inconnue à ce jour, nous pourrions cependant l'estimer en mesurant par Western Blots les niveaux cellulaires de Rubicon et de LC3-II, la forme de LC3 liée aux membranes, dans les MutuDC déficientes ou non pour ESCRT-II.

2.1.3.3. Trafic des complexes CMH-I/peptide et dégradation

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse suggèrent que l'augmentation de la présentation croisée d'antigènes découle directement de l'induction de l'export cytosolique observée dans les cellules déficientes pour ESCRT-III. Cependant, à l'aune de l'implication d'ESCRT-III dans la dégradation de protéines membranaires internalisées, dont pourraient faire partie les complexes CMH-I/peptide, il est possible que le phénotype observé en présentation croisée résulte également d'un défaut de dégradation de ces complexes. Ainsi, dans les MutuDC silencées pour ESCRT-III, la perturbation de l'internalisation des complexes CMH-I/peptide au sein de vésicules intraluminales conduirait à leur recyclage membranaire plutôt qu'à leur dégradation. S'il reste à démontrer, ce phénomène participerait à l'établissement et au maintien d'un nombre plus important de complexes CMH-I/peptide à la membrane des cellules déficientes pour Chmp4b ou Chmp2a qu'à celle des cellules contrôle. Afin de rendre compte de la possible contribution de ce paramètre à nos observations, nous pourrions tenter de détecter

les complexes CMH-I/peptide présents dans les endosomes de recyclage Rab11+ et comparer leur abondance dans les cellules déplétées ou non pour ESCRT-III. Entre nos mains, le clone dédié à la reconnaissance de tels complexes n'a jamais montré de résultats probants et nous envisagerions donc une stratégie alternative, basée sur l'utilisation des cellules RMA-S, déficientes pour le transporteur TAP2. Incapables d'importer des peptides dans les compartiments contenant les molécules de CMH-I, les cellules RMA-S ne stabilisent ces molécules à la membrane plasmique qu'en présence d'un peptide, d'affinité connue, ajouté au milieu extracellulaire. Grâce au peptide SIINFEKL, nous souhaiterions donc comparer la cinétique de disparition des complexes CMH-I/peptide stabilisés à la membrane plasmique dans les cellules contrôle ou déficientes pour ESCRT-III. De cette façon, nous pourrions rendre compte d'un éventuel recyclage accru et/ou d'une dégradation diminuée en l'absence d'une machinerie ESCRT-III fonctionnelle.

2.2. ESCRT-III comme possible régulateur central de la biologie des cellules dendritiques

Dans cette étude, l'approche perte de fonction a été employée afin d'évaluer la possible contribution d'ESCRT-III à l'export cytosolique des antigènes et à la présentation croisée. Si ce type d'approche ne correspond à aucune situation physiologique connue, des mutations de plusieurs membres des complexes ESCRT sont recensées chez l'homme dans de nombreux cancers et dans certaines maladies neurodégénératives.

2.2.1. Mutations d'ESCRT-I et III chez l'homme : cas des cellules tumorales et des neurones

Initialement identifié comme suppresseur de tumeur (Li and Cohen, 1996), la fonction de TSG101 dans les cellules tumorales a été récemment réexaminée. En effet, cette protéine s'avère surexprimée dans de nombreux cancers (sein, ovaire, prostate, nasopharynx, leucémie), en raison de l'abondance d'un variant d'épissage particulier appelé TSG101 Δ 154-1054 dont le produit de traduction stabilise la protéine native et la protège de la dégradation (Gayther *et al.*, 1997; Klaes *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 1997). En conséquence, les

cellules tumorales porteuses de ce variant acquièrent un phénotype invasif caractérisé par un potentiel prolifératif et migratoire élevé (Chua *et al.*, 2019).

Si la description des mécanismes à l'origine des propriétés pro-métastatiques de TSG101 est encore préliminaire (Liu *et al.*, 2019), les phénomènes responsables de la toxicité neuronale causée par des mutants de Chmp2b sont mieux connus. En effet, ces mutations, identifiées chez des patients atteints de démence frontolatérale, codent toutes pour une version tronquée, et donc probablement constitutivement active (voir Partie 4.2.2. de l'introduction) de la protéine (Skibinski *et al.*, 2005; van der Zee *et al.*, 2008). De façon intéressante, les souris transgéniques porteuses de la mutation humaine présentent des inclusions toxiques positives pour p62 et pour l'ubiquitine, ce qui suggère une dérégulation de la voie autophagique associée, dans ce modèle, à un défaut de dégradation (Ghazi-Noori *et al.*, 2012). De plus, l'expression de cette version mutante de Chmp2b dans des neurones murins en culture conduit à l'accumulation d'autophagosomes, responsables d'une mort cellulaire massive et ce, en seulement quelques jours (Lee and Gao, 2009; Lee *et al.*, 2007).

Si les conséquences immunologiques de ces mutations d'ESCRT-I et III n'ont à ce jour pas été décrites, les niveaux d'ESCRT-III pourraient cependant être modulés au cours du cycle de vie des cellules dendritiques et réguler la fonction de ces dernières.

2.2.2. Cycle et durée de vie des cellules dendritiques

Contrairement à une idée longtemps répandue, les cellules dendritiques spléniques sont renouvelées rapidement, au bout d'environ 3 jours (Kamath *et al.*, 2002), ce qui suggère une durée de vie relativement courte de cette population immune dans leur organe de résidence. De plus, la vitesse de renouvellement des cellules dendritiques spléniques apparaît influencée par le contexte inflammatoire auquel elles sont exposées. Ainsi, l'injection intraveineuse de LPS provoque non seulement la mort d'une fraction des cellules dendritiques, mais induit aussi le recrutement de cellules nouvellement différenciées dans la rate (Kamath *et al.*, 2000). L'un des mécanismes évoqués pour tenter d'expliquer la mort des cellules dendritiques dans un tel environnement repose sur l'activation du facteur de transcription NFAT, consécutive à la liaison sélective du LPS à CD14 et visiblement indépendante de l'engagement de TLR4 (Zanoni *et al.*, 2009). Or, la déplétion de NFAT, ainsi que celle de CD14, ne suffisent pas à restaurer totalement

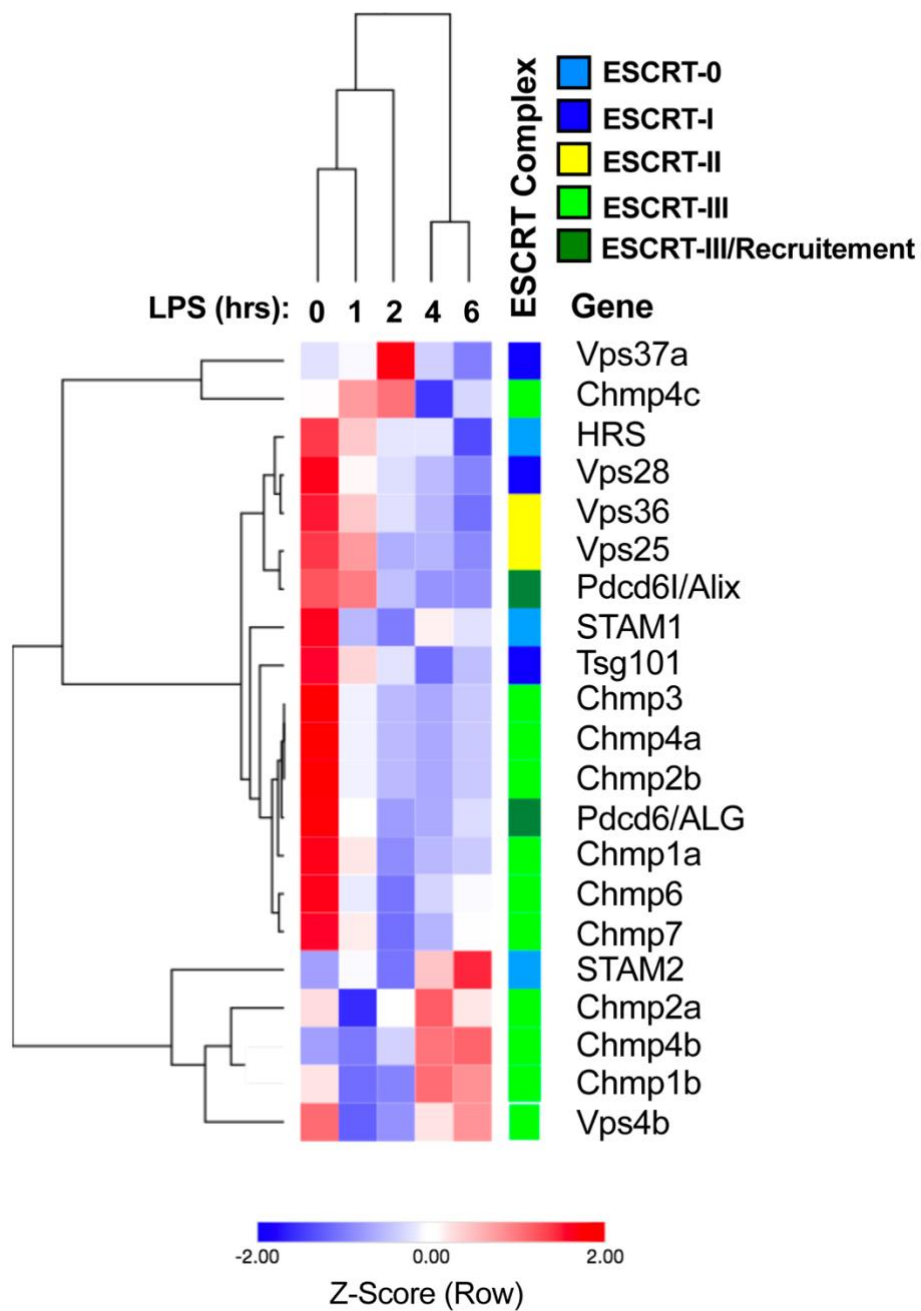


Figure D.2.3. : Diminution de l'expression d'ESCRT après stimulation au LPS dans des BMDCs

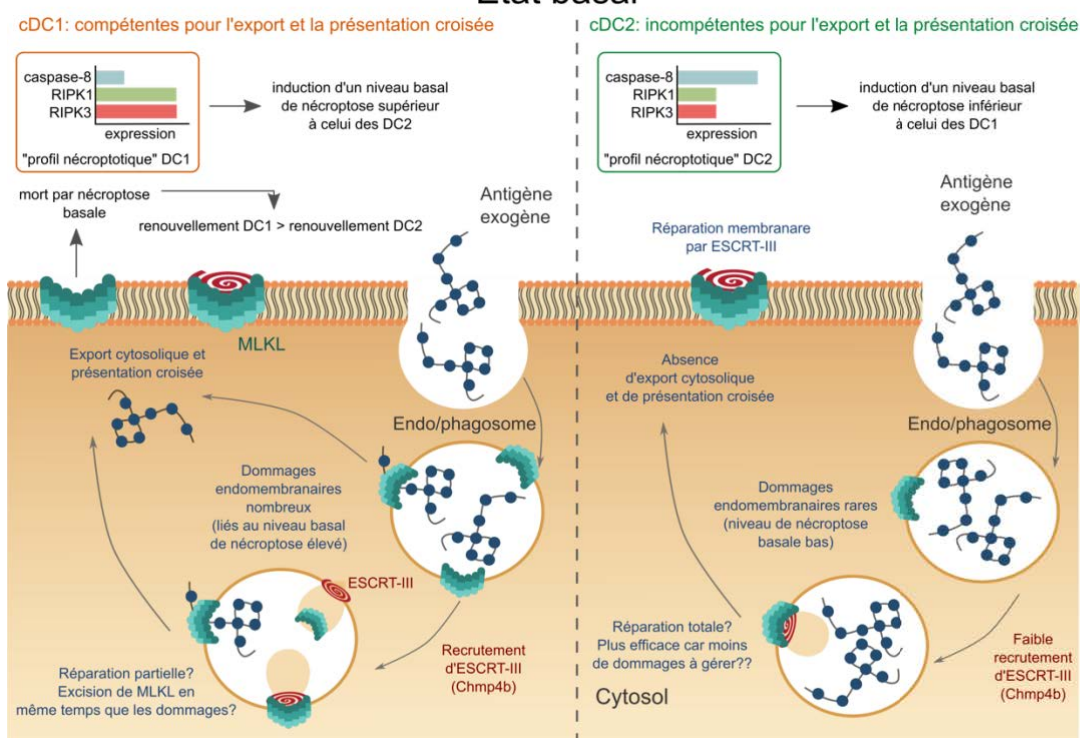
Cette heatmap, générée par nos soins, est tirée des données de RNAseq générées par Garber *et al.*, (2012) dans des BMDCs, traitées ou non au LPS.

la viabilité des cellules dendritiques spléniques à la suite de l'injection de LPS (Zanoni *et al.*, 2009).

Ainsi, en dehors de l'apoptose, supposément contrôlée par NFAT, d'autres voies de mort cellulaire, comme la nécroptose, pourraient contribuer à ce processus. En effet, cette voie est induite en aval de TLR4 en réponse au LPS et conduit, en association avec un inhibiteur à large spectre des caspases, à la mort des macrophages *in vivo* (He *et al.*, 2011). Dans ce cadre, il est possible que l'injection seule de LPS suffise à provoquer la mort cellulaire des cDC1 par nécroptose. Comme précédemment mentionné, cette sous-population de cellules dendritiques montre des niveaux protéiques de caspase-8 plus faibles que ses homologues cDC2 (Luber *et al.*, 2010). Ce paramètre, associé à l'expression élevée de RIPK3 dans les cDC1, pourrait évoquer une susceptibilité accrue de ces cellules vis-à-vis de l'induction nécroptotique, stimulée entre autres, par le LPS. À cet égard, il est frappant de constater qu'à l'état basal ou en réponse au LPS, les cDC1 subissent un renouvellement plus rapide que les cDC2 (Kamath *et al.*, 2002), associé à des taux de mortalité plus élevés. Cette observation initiale fut confirmée et enrichie par la démonstration de l'implication du récepteur aux glucocorticoïdes dans le processus décrit. Selon le modèle proposé, l'apoptose sélective des cDC1 serait causée par la liaison du récepteur aux glucocorticoïdes à son ligand, dont la sécrétion est stimulée par l'injection de LPS (Li *et al.*, 2015a). Si les auteurs de cette étude ne fournissent pas d'explication relative à la mortalité accrue des cDC1 dans ce système, un élément de réponse pourrait résider dans l'expression supérieure des caspases effectrices 3 et 6, observée dans cette sous-population (Luber *et al.*, 2010).

Ce mécanisme élégant et convaincant n'exclut cependant pas l'engagement possible des voies nécroptotiques, dans les cDC1, en réponse au LPS. Un argument supplémentaire en faveur de l'implication de ces voies tient à la diminution massive des transcrits codant pour les sous-unités d'ESCRT-III, à la suite du traitement de BMDCs par le LPS (Garber *et al.*, 2012) (Figure D.2.3.). Cette diminution de l'expression transcriptionnelle des sous-unités constitutives d'ESCRT-III pourrait partiellement compromettre la réalisation de la fonction d'excision des dommages nécroptotiques, portée par ce complexe. En conséquence, les cellules dendritiques verraient leur viabilité diminuer de façon plus ou moins drastique, en fonction de leur niveau basal d'induction nécroptotique. Selon cette hypothèse, les cDC1 (voir deuxième paragraphe de cette sous-partie) connaîtraient un épisode nécroptotique plus important que leurs homologues

Etat basal



Contexte infectieux ou tumoral (traitement aux anthracyclines)

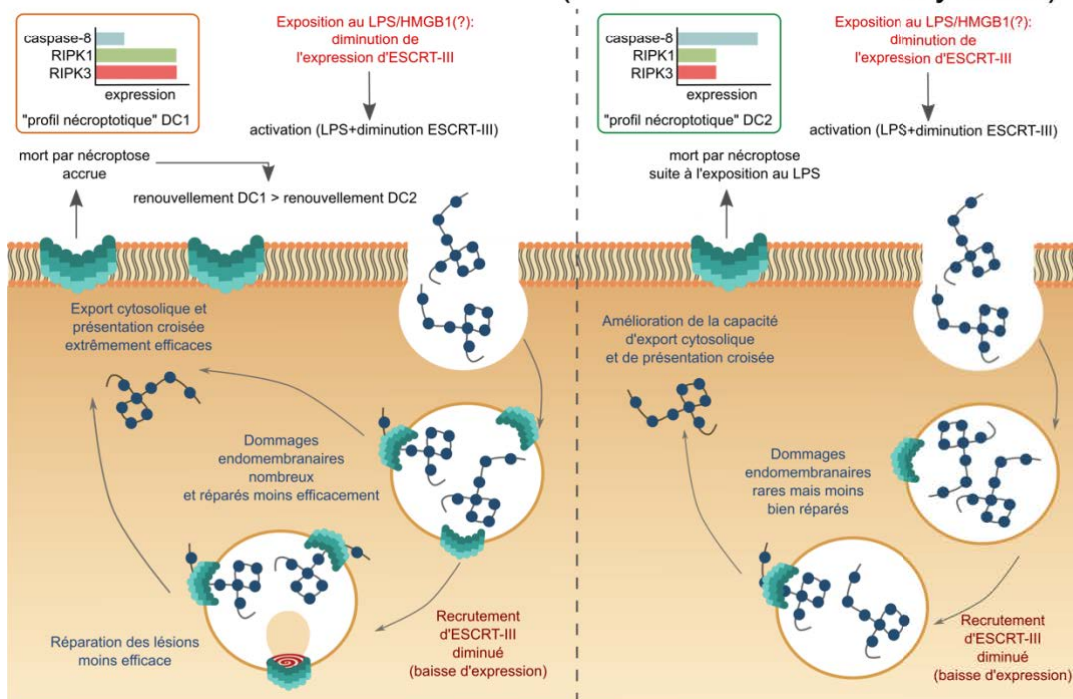


Figure D.2.4. : Modèle spéculatif de la régulation de la fonction des cDC1 par ESCRT-III

Ce modèle s'appuie sur certaines données préliminaires et sur la littérature pour supposer un rôle général d'ESCRT-III dans la physiologie des cellules dendritiques à l'état basal et en contexte infectieux. Selon ce modèle, l'induction nécroptotique basale serait plus élevée dans les cDC1 que dans les cDC2. Dans les cDC1, elle serait à l'origine de fréquents dommages endomembranaires, causés par l'insertion de MLKL. En contexte infectieux, la diminution des niveaux d'expression d'ESCRT-III exacerberait le phénotype observé à l'état basal : export cytosolique maximal, activation des cellules dendritiques et grande susceptibilité à la mort cellulaire par nécroptose.

cDC2. Cette observation sous-tend également en partie le modèle spéculatif global de régulation de la fonction des cDC1 par ESCRT-III, développé dans la section suivante.

2.2.3. Vers un modèle spéculatif global de régulation de la fonction des cDC1 par ESCRT-III

À partir de nos observations et des données disponibles dans la littérature, nous avons élaboré un modèle possible de régulation de la fonction des cDC1, centré sur l'induction nécroptotique et son contrôle par ESCRT-III (Figure D.2.4.). En l'absence de stimulus inflammatoire, les niveaux cellulaires de caspase-8, RIPK1 et RIPK3 conditionnent l'intensité de la nécroptose basale et des dommages endomembranaires et membranaires qu'elle génère. Ainsi, le « profil nécroptotique » des cDC1, caractérisé par l'expression inférieure de caspase-8 et supérieure des kinases RIPK1 et RIPK3, conférerait à cette sous-population une capacité supérieure d'export cytosolique (Lin *et al.*, 2008 et cette étude) ainsi qu'une durée de vie réduite (Kamath *et al.*, 2000, 2002), par rapport à leurs homologues cDC2. Ces caractéristiques de base se verraient amplifiées dans un environnement pathologique, par exemple lors d'une infection bactérienne ou en contexte tumoral. Dans ces conditions, la liaison du LPS (et peut-être de HMGB1 en cas de mort induite par les traitements chimiothérapeutique ?) à TLR4 provoquerait une diminution de l'expression des sous-unités d'ESCRT-III, associée à une perturbation des fonctions cellulaires associées. À la suite de l'engagement de TLR4, les cellules dendritiques et *a fortiori* les cDC1, connaîtraient de ce fait une période de potentialisation de leurs fonctions immunes : la réduction de l'excision des dommages nécroptotiques par ESCRT-III favoriserait la fragilisation des compartiments endocytiques et donc l'export cytosolique des antigènes contenus. De plus, dans les cDC1, la présentation croisée pourrait également être facilitée par l'exacerbation de la réponse de NF- κ B, consécutive à la baisse des niveaux cellulaires d'ESCRT-III (Mamińska *et al.*, 2016). Enfin, bien qu'elle puisse optimiser les capacités de présentation croisée des cDC1, cette diminution de l'expression d'ESCRT-III induite par le LPS contribuerait également à rendre ces cellules plus sensibles à la mort cellulaire (Kamath *et al.*, 2002), exécutée par l'intermédiaire des voies nécroptotiques si l'on en croît notre hypothèse. De façon intéressante, ces phénomènes pourraient aussi survenir dans les cDC2 et conduire, dans une

moindre mesure cependant, à l'émergence d'une capacité à induire des réponses cytotoxiques, conformément aux résultats obtenus après activation de ces cellules (Desch *et al.*, 2014).

2.3. Conclusion générale

Nos travaux nous ont donc permis de mettre en évidence le rôle d'ESCRT-III dans la régulation de l'export cytosolique des antigènes au cours de la présentation croisée. Nos données suggèrent notamment qu'ESCRT-III interviendrait dans l'excision de lésions endomembranaires d'origine nécroptotique, responsables de la fragilisation et *in fine*, de la rupture du compartiment endocytique contenant les antigènes. Si la multiplicité des fonctions portées par ESCRT-III peut compliquer l'interprétation des résultats obtenus, notre étude a néanmoins le mérite d'apporter des éléments supplémentaires en faveur de l'hypothèse de la « rupture du compartiment », grâce à la manipulation, pour la première fois, d'une machinerie endogène impliquée dans ce processus. À l'issue de cette thèse, j'ai la sensation à la fois frustrante et excitante de laisser davantage de questions « en suspens » (nature des dommages endomembranaires, bases de la susceptibilité accrue des cDC1 à ces dommages, rôle d'ESCRT-III à l'échelle de la physiologie générale des cDC1...) que de questions résolues, mais j'imagine que cela révèle peut-être un peu de la richesse et de l'ambition du projet que nous avons tenté de conduire au mieux, en dépit de nos biais cognitifs, de nos hypothèses parfois fausses et des limitations techniques rencontrées. J'espère avoir réussi à travers ce manuscrit à ouvrir un peu le champ de réflexion et à remettre en perspective certaines données de la littérature, tout au long de l'introduction et grâce au modèle spéculatif exposé à la fin de cette discussion. À l'heure actuelle, la manipulation thérapeutique d'ESCRT-III en vue de potentialiser l'export cytosolique des antigènes et la présentation croisée dans un contexte antitumoral, à la façon de la Prazosine, ne semble pas constituer une stratégie optimale et souhaitable en raison du caractère vital de cette machinerie. Il est cependant possible que d'éventuels travaux, basés sur nos résultats, identifient des médiateurs cellulaires en amont d'ESCRT-III, spécifiquement impliqués dans la réparation des dommages endomembranaires. De telles molécules, si elles existent, pourraient représenter des cibles pharmacologiques de choix, en conjonction avec des traitements immunothérapeutiques actuels, comme les anticorps inhibiteurs de « checkpoints ». Enfin, la réhabilitation de l'hypothèse de la « rupture du compartiment » pourrait également ouvrir la

DISCUSSION

porte à l'exploitation de cette voie, notamment par l'intermédiaire de l'encapsulation d'antigènes tumoraux dans des particules « hérisson » (« hedgehog particles ») (Bahng *et al.*, 2015), véritables vaisseaux nanotechnologiques potentiellement capables de rompre les endomembranes et de promouvoir l'entrée des substrats immunitaires dans les voies de présentation croisée.

REFERENCES

RÉFÉRENCES

- Aaes, T.L., Kaczmarek, A., Delvaeye, T., De Craene, B., De Koker, S., Heyndrickx, L., Delrue, I., Taminau, J., Wiernicki, B., De Groote, P., *et al.* (2016). Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Rep.* *15*, 274–287.
- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12889–12894.
- Ackerman, A.L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* *25*, 607–617.
- Adell, M.A.Y., Vogel, G.F., Pakdel, M., Müller, M., Lindner, H., Hess, M.W., and Teis, D. (2014). Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J. Cell Biol.* *205*, 33–49.
- Adell, M.A.Y., Migliano, S.M., Upadhyayula, S., Bykov, Y.S., Sprenger, S., Pakdel, M., Vogel, G.F., Jih, G., Skillern, W., Behrouzi, R., *et al.* (2017). Recruitment dynamics of ESCRT-III and Vps4 to endosomes and implications for reverse membrane budding. *ELife* *6*.
- Agmon, E., Solon, J., Bassereau, P., and Stockwell, B.R. (2018). Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Sci. Rep.* *8*, 5155.
- Agudo-Canalejo, J., and Lipowsky, R. (2018). Domes and cones: Adhesion-induced fission of membranes by ESCRT proteins. *PLoS Comput. Biol.* *14*, e1006422.
- Ahrens, S., Zelenay, S., Sancho, D., Hanč, P., Kjær, S., Feest, C., Fletcher, G., Durkin, C., Postigo, A., Skehel, M., *et al.* (2012). F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* *36*, 635–645.
- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A.-M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., Corcelle-Termeau, E., Høgh, S., Farkas, T., Holm Jonassen, A., *et al.* (2015). Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy* *11*, 1408–1424.
- Akishiba, M., Takeuchi, T., Kawaguchi, Y., Sakamoto, K., Yu, H.-H., Nakase, I., Takatani-Nakase, T., Madani, F., Gräslund, A., and Futaki, S. (2017). Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat. Chem.* *9*, 751–761.
- Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* *392*, 86–89.
- Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8 α ⁺ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* *301*, 1925–1928.
- Allan, R.S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C.M., Villadangos, J.A., Zhan, Y., Lew, A.M., Shortman, K., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* *25*, 153–162.
- Alloati, A., Kotsias, F., Pauwels, A.-M., Carpier, J.-M., Jouve, M., Timmerman, E., Pace, L., Vargas, P., Maurin, M., Gehrmann, U., *et al.* (2015). Toll-like Receptor 4 Engagement on Dendritic Cells Restrains Phago-Lysosome Fusion and Promotes Cross-Presentation of Antigens. *Immunity* *43*, 1087–1100.
- Alloati, A., Kotsias, F., Magalhaes, J.G., and Amigorena, S. (2016a). Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol. Rev.* *272*, 97–108.
- Alloati, A., Kotsias, F., Hoffmann, E., and Amigorena, S. (2016b). Evaluation of Cross-presentation in Bone Marrow-derived Dendritic Cells in vitro and Splenic Dendritic Cells ex vivo Using Antigen-coated Beads. *Bio-Protoc.* *6*.
- Alloati, A., Rookhuizen, D.C., Joannas, L., Carpier, J.-M., Iborra, S., Magalhaes, J.G., Yatim, N., Kozik, P., Sancho, D., Albert, M.L., Amigorena, S., 2017. Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. *Journal of Experimental Medicine* *214*, 2231–2241. doi:10.1084/jem.20170229
- de Almagro, M.C., Goncharov, T., Izrael-Tomasevic, A., Duttler, S., Kist, M., Varfolomeev, E., Wu, X., Lee, W.P., Murray, J., Webster, J.D., *et al.* (2017). Coordinated ubiquitination and phosphorylation of RIP1 regulates necroptotic cell death. *Cell Death Differ.* *24*, 26–37.
- Amin, P., Florez, M., Najafov, A., Pan, H., Geng, J., Ofengeim, D., Dziedzic, S.A., Wang, H., Barrett, V.J., Ito, Y., *et al.* (2018). Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNF α -mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E5944–E5953.

RÉFÉRENCES

- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., *et al.* (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* *13*, 1050–1059.
- Azmi, I., Davies, B., Dimaano, C., Payne, J., Eckert, D., Babst, M., and Katzmann, D.J. (2006). Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J. Cell Biol.* *172*, 705–717.
- Azmi, I.F., Davies, B.A., Xiao, J., Babst, M., Xu, Z., and Katzmann, D.J. (2008). ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Dev. Cell* *14*, 50–61.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* *17*, 2982–2993.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., and Emr, S.D. (2002a). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* *3*, 283–289.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., and Emr, S.D. (2002b). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* *3*, 271–282.
- Bache, K.G., Stuffers, S., Malerød, L., Slagsvold, T., Raiborg, C., Lechardeur, D., Wälchli, S., Lukacs, G.L., Brech, A., and Stenmark, H. (2006). The ESCRT-III Subunit hVps24 Is Required for Degradation but Not Silencing of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol. Biol. Cell* *17*, 2513–2523.
- Bae, Y.S., Lee, J.H., Choi, S.H., Kim, S., Almazan, F., Witztum, J.L., and Miller, Y.I. (2009). Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ. Res.* *104*, 210–218, 21p following 218.
- Bahnig, J.H., Yeom, B., Wang, Y., Tung, S.O., Hoff, J.D., and Kotov, N. (2015). Anomalous dispersions of ‘hedgehog’ particles. *Nature* *517*, 596–599.
- Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.-M.B., Uter, N.T., Myszka, D.G., Hill, C.P., and Sundquist, W.I. (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 754–762.
- Basha, G., Lizée, G., Reinicke, A.T., Seipp, R.P., Omilusik, K.D., and Jefferies, W.A. (2008). MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS One* *3*, e3247.
- Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A.T., Lack, N., Choi, K.B., and Jefferies, W.A. (2012). A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat. Immunol.* *13*, 237–245.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M., and Srivastava, P.K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* *12*, 1539–1546.
- Baumgärtel, V., Ivanchenko, S., Dupont, A., Sergeev, M., Wiseman, P.W., Kräusslich, H.-G., Bräuchle, C., Müller, B., and Lamb, D.C. (2011). Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat. Cell Biol.* *13*, 469–474.
- Bedoui, S., Prato, S., Mintern, J., Gebhardt, T., Zhan, Y., Lew, A.M., Heath, W.R., Villadangos, J.A., and Segura, E. (2009). Characterization of an immediate splenic precursor of CD8+ dendritic cells capable of inducing antiviral T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 4200–4207.
- Beissbarth, T., Hyde, L., Smyth, G.K., Job, C., Boon, W.-M., Tan, S.-S., Scott, H.S., and Speed, T.P. (2004). Statistical modeling of sequencing errors in SAGE libraries. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *20 Suppl 1*, i31-39.
- Belzair, R., and Unanue, E.R. (2009). Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17463–17468.
- Belz, G.T., Behrens, G.M.N., Smith, C.M., Miller, J.F.A.P., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R., *et al.* (2002). The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J. Exp. Med.* *196*, 1099–1104.
- Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8670–8675.
- Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., and Heath, W.R. (2005). CD8alpha+ dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 196–200.

RÉFÉRENCES

- Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., Houde, M., Desjardins, M., Sher, A., and Sacks, D. (2006). Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 3525–3533.
- Bertrand, M.J.M., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., and Barker, P.A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* *30*, 689–700.
- Bevan, M.J. (1976a). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* *143*, 1283–1288.
- Bevan, M.J. (1976b). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *117*, 2233–2238.
- Binder, R.J., and Srivastava, P.K. (2005). Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* *6*, 593–599.
- Blachère, N.E., Darnell, R.B., and Albert, M.L. (2005). Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol.* *3*, e185.
- Blander, J.M. (2018). Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. *Annu. Rev. Immunol.* *36*, 717–753.
- Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G., Hulsik, D.L., Belly, A., Goldberg, Y., Chatellard-Causse, C., Blot, B., *et al.* (2011). Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* *286*, 40276–40286.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., 2002. Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8+ T Cell Tolerance. *J Exp Med* *196*, 1627–1638. doi:10.1084/jem.20021598
- Böttcher, J.P., Reis e Sousa, C., 2018. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer* *4*, 784–792. doi:10.1016/j.trecan.2018.09.001
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B.H.-J., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., *et al.* (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* *31*, 232–244.
- Boura, E., Różycki, B., Chung, H.S., Herrick, D.Z., Canagarajah, B., Cafiso, D.S., Eaton, W.A., Hummer, G., and Hurley, J.H. (2012). Solution structure of the ESCRT-I and -II supercomplex: implications for membrane budding and scission. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *20*, 874–886.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* *27*, 6434–6451.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.-A., Poncet, D., Andraeu, K., Vieira, H.L.A., Roumier, T., Perfettini, J.-L., and Kroemer, G. (2003). Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* *22*, 3927–3936.
- den Brok, M.H., Büll, C., Wassink, M., de Graaf, A.M., Wagenaars, J.A., Minderman, M., Thakur, M., Amigorena, S., Rijke, E.O., Schrier, C.C., *et al.* (2016). Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat. Commun.* *7*, 13324.
- Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., *et al.* (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* *26*, 938.
- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H.A., Krieg, A.M., Hartmann, G., Endres, S., 2000. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* *165*, 6278–6286. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6278
- Buchkovich, N.J., Henne, W.M., Tang, S., and Emr, S.D. (2013). Essential N-terminal insertion motif anchors the ESCRT-III filament during MVB vesicle formation. *Dev. Cell* *27*, 201–214.
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 6770–6776.

RÉFÉRENCES

- Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* *316*, 612–616.
- Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R., and Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* *9*, 558–566.
- Busche, A., Jirno, A.C., Welten, S.P.M., Zischke, J., Noack, J., Constabel, H., Gatzke, A.-K., Keyser, K.A., Arens, R., Behrens, G.M.N., *et al.* (2013). Priming of CD8+ T cells against cytomegalovirus-encoded antigens is dominated by cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 2767–2777.
- Caillat, C., Macheboeuf, P., Wu, Y., McCarthy, A.A., Boeri-Erba, E., Effantin, G., Göttlinger, H.G., Weissenhorn, W., and Renesto, P. (2015). Asymmetric ring structure of Vps4 required for ESCRT-III disassembly. *Nat. Commun.* *6*, 8781.
- Callahan, M.K., Garg, M., and Srivastava, P.K. (2008). Heat-shock protein 90 associates with N-terminal extended peptides and is required for direct and indirect antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1662–1667.
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C.Y., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L.H., *et al.* (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* *112*, 3264–3273.
- Campsteijn, C., Vietri, M., and Stenmark, H. (2016). Novel ESCRT functions in cell biology: spiraling out of control? *Curr. Opin. Cell Biol.* *41*, 1–8.
- Cao, X. (2016). Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 35–50.
- Carlson, L.-A., Shen, Q.-T., Pavlin, M.R., and Hurley, J.H. (2015). ESCRT Filaments as Spiral Springs. *Dev. Cell* *35*, 397–398.
- Carlton, J.G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., and Martin-Serrano, J. (2012). ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science* *336*, 220–225.
- Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., *et al.* (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* *202*, 1691–1701.
- Cashikar, A.G., Shim, S., Roth, R., Maldazys, M.R., Heuser, J.E., and Hanson, P.I. (2014). Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding. *ELife* *3*.
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L.F., Amigorena, S., and Savina, A. (2011). Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *147*, 1355–1368.
- Cebrian, I., Croce, C., Guerrero, N.A., Blanchard, N., and Mayorga, L.S. (2016). Rab22a controls MHC-I intracellular trafficking and antigen cross-presentation by dendritic cells. *EMBO Rep.* *17*, 1753–1765.
- Cerovic, V., Houston, S.A., Scott, C.L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A.M., and Milling, S.W.F. (2013). Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol.* *6*, 104–113.
- Chefalo, P.J., Grandea, A.G., Van Kaer, L., and Harding, C.V. (2003). Tapasin^{-/-} and TAP1^{-/-} macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 5825–5833.
- Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, J.M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, D.W., Salvesen, G.S., *et al.* (2010). Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* *467*, 863–867.
- Chen, W., Frank, M.E., Jin, W., and Wahl, S.M. (2001). TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* *14*, 715–725.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.-T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., *et al.* (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res.* *24*, 105–121.
- Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., Colom, A., Humbert, F., Lenz, M., Scheuring, S., and Roux, A. (2015). Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell* *163*, 866–879.
- Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., and Chan, F.K.-M. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* *137*, 1112–1123.

RÉFÉRENCES

- Christ, L., Wenzel, E.M., Liestøl, K., Raiborg, C., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2016). ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission. *J. Cell Biol.* *212*, 499–513.
- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E.M., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2017). Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 42–56.
- Chu, T., Sun, J., Saksena, S., and Emr, S.D. (2006). New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J. Cell Biol.* *175*, 815–823.
- Chua, H.-H., Kameyama, T., Mayeda, A., and Yeh, T.-H. (2019). Cancer-Specifically Re-Spliced TSG101 mRNA Promotes Invasion and Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Contreras, F.-X., Sot, J., Alonso, A., and Goñi, F.M. (2006). Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes. *Biophys. J.* *90*, 4085–4092.
- Corrotte, M., Fernandes, M.C., Tam, C., and Andrews, N.W. (2012). Toxin pores endocytosed during plasma membrane repair traffic into the lumen of MVBs for degradation. *Traffic Cph. Den.* *13*, 483–494.
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* *26*, 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511
- Crittenden, M.R., Zebertavage, L., Kramer, G., Bambina, S., Friedman, D., Troesch, V., Blair, T., Baird, J.R., Alice, A., Gough, M.J., 2018. Tumor cure by radiation therapy and checkpoint inhibitors depends on pre-existing immunity. *Sci. Rep.* *8*, 7012. doi:10.1038/s41598-018-25482-w
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., *et al.* (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α + dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1283–1292.
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Williams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., *et al.* (2011). Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α + type. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 4411–4415.
- Cruz, F.M., Colbert, J.D., Merino, E., Kriegsman, B.A., and Rock, K.L. (2017). The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu. Rev. Immunol.* *35*, 149–176.
- Cullen, S.P., Henry, C.M., Kearney, C.J., Logue, S.E., Feoktistova, M., Tynan, G.A., Lavelle, E.C., Leverkus, M., and Martin, S.J. (2013). Fas/CD95-induced chemokines can serve as “find-me” signals for apoptotic cells. *Mol. Cell* *49*, 1034–1048.
- Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* *197*, 1141–1151.
- Datta, S.K., Redecke, V., Prilliman, K.R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S.P., *et al.* (2003). A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 4102–4110.
- Davies, B.A., Norgan, A.P., Payne, J.A., Schulz, M.E., Nichols, M.D., Tan, J.A., Xu, Z., and Katzmman, D.J. (2014). Vps4 stimulatory element of the cofactor Vta1 contacts the ATPase Vps4 α 7 and α 9 to stimulate ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* *289*, 28707–28718.
- Day, P.M., Esquivel, F., Lukszo, J., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (1995). Effect of TAP on the generation and intracellular trafficking of peptide-receptive major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* *2*, 137–147.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., *et al.* (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 313–321.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* *307*, 1630–1634.
- Denais, C.M., Gilbert, R.M., Isermann, P., McGregor, A.L., te Lindert, M., Weigelin, B., Davidson, P.M., Friedl, P., Wolf, K., and Lammerding, J. (2016). Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* *352*, 353–358.
- Desch, A.N., Randolph, G.J., Murphy, K., Gautier, E.L., Kedl, R.M., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Shortman, K., Henson, P.M., and Jakubzick, C.V. (2011). CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J. Exp. Med.* *208*, 1789–1797.
- Desch, A.N., Gibbings, S.L., Clambey, E.T., Janssen, W.J., Slansky, J.E., Kedl, R.M., Henson, P.M., and Jakubzick, C. (2014). Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *Nat. Commun.* *5*, 4674.

RÉFÉRENCES

- Ding, Y., Guo, Z., Liu, Y., Li, X., Zhang, Q., Xu, X., Gu, Y., Zhang, Y., Zhao, D., and Cao, X. (2016). The lectin Siglec-G inhibits dendritic cell cross-presentation by impairing MHC class I-peptide complex formation. *Nat. Immunol.* *17*, 1167–1175.
- Dingjan, I., Verboogen, D.R., Paardekooper, L.M., Revelo, N.H., Sittig, S.P., Visser, L.J., Mollard, G.F. von, Henriët, S.S., Figdor, C.G., Ter Beest, M., *et al.* (2016). Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Sci. Rep.* *6*, 22064.
- Dingjan, I., Paardekooper, L.M., Verboogen, D.R.J., von Mollard, G.F., Ter Beest, M., and van den Bogaart, G. (2017). VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release. *Eur. J. Cell Biol.* *96*, 705–714.
- Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., Hulpiau, P., Weber, K., Schon, C.A., Marquis, R.W., *et al.* (2014). MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell Rep.* *7*, 971–981.
- Dondelinger, Y., Delanghe, T., Rojas-Rivera, D., Priem, D., Delvaeye, T., Bruggeman, I., Van Herreweghe, F., Vandenabeele, P., and Bertrand, M.J.M. (2017). MK2 phosphorylation of RIPK1 regulates TNF-mediated cell death. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1237–1247.
- Dondelinger, Y., Delanghe, T., Priem, D., Wynosky-Dolfi, M.A., Sorobetea, D., Rojas-Rivera, D., Giansanti, P., Roelandt, R., Gropengiesser, J., Ruckdeschel, K., *et al.* (2019). Serine 25 phosphorylation inhibits RIPK1 kinase-dependent cell death in models of infection and inflammation. *Nat. Commun.* *10*, 1729.
- Doody, A.D.H., Kovalchin, J.T., Mihalyo, M.A., Hagymasi, A.T., Drake, C.G., and Adler, A.J. (2004). Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 6087–6092.
- Drutman, S.B., and Trombetta, E.S. (2010). Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 2140–2146.
- Dudzick, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C.G., *et al.* (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* *315*, 107–111.
- Edelson, B.T., KC, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., *et al.* (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α + conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 823–836.
- Edwards, A.D., Chaussabel, D., Tomlinson, S., Schulz, O., Sher, A., and Reis e Sousa, C. (2003). Relationships among murine CD11c(high) dendritic cell subsets as revealed by baseline gene expression patterns. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 47–60.
- Effantin, G., Dordor, A., Sandrin, V., Martinelli, N., Sundquist, W.I., Schoehn, G., and Weissenhorn, W. (2013). ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding. *Cell. Microbiol.* *15*, 213–226.
- Eisenbarth, S.C. (2019). Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat. Rev. Immunol.* *19*, 89–103.
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* *461*, 282–286.
- El-Sayed, A., Futaki, S., and Harashima, H. (2009). Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J.* *11*, 13–22.
- Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A.G., Weissenhorn, W., and Kozlov, M.M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput. Biol.* *5*, e1000575.
- Falo, L.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Thompson, K., Rock, K.L., 1995. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat Med* *1*, 649–653.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Häcker, G., and Leverkus, M. (2011). cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol. Cell* *43*, 449–463.
- Ferguson, T.A., Herndon, J., Elzey, B., Griffith, T.S., Schoenberger, S., and Green, D.R. (2002). Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 5589–5595.

RÉFÉRENCES

- Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerød, L., Fisher, E.M.C., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., and Simonsen, A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* *179*, 485–500.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* *73*, 1907–1916.
- Firat, E., Saveanu, L., Aichele, P., Staeheli, P., Huai, J., Gaedicke, S., Nil, A., Besin, G., Kanzler, B., van Ender, P., *et al.* (2007). The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2241–2248.
- Frank, D., Vaux, D.L., Murphy, J.M., Vince, J.E., and Lindqvist, L.M. (2019). Activated MLKL attenuates autophagy following its translocation to intracellular membranes. *J. Cell Sci.* *132*.
- Fuertes Marraco, S.A., Grosjean, F., Duval, A., Rosa, M., Lavanchy, C., Ashok, D., Haller, S., Otten, L.A., Steiner, Q.-G., Descombes, P., *et al.* (2012). Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Front. Immunol.* *3*, 331.
- Fujita, H., Umezaki, Y., Imamura, K., Ishikawa, D., Uchimura, S., Nara, A., Yoshimori, T., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Ishidoh, K., *et al.* (2004). Mammalian class E Vps proteins, SBP1 and mVps2/CHMP2A, interact with and regulate the function of an AAA-ATPase SKD1/Vps4B. *J. Cell Sci.* *117*, 2997–3009.
- Fyfe, I., Schuh, A.L., Edwardson, J.M., and Audhya, A. (2011). Association of the endosomal sorting complex ESCRT-II with the Vps20 subunit of ESCRT-III generates a curvature-sensitive complex capable of nucleating ESCRT-III filaments. *J. Biol. Chem.* *286*, 34262–34270.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., *et al.* (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* *25*, 486–541.
- Gamrekelashvili, J., Kapanadze, T., Han, M., Wissing, J., Ma, C., Jaensch, L., Manns, M.P., Armstrong, T., Jaffee, E., White, A.O., *et al.* (2013). Peptidases released by necrotic cells control CD8+ T cell cross-priming. *J. Clin. Invest.* *123*, 4755–4768.
- Garber, M., Yosef, N., Goren, A., Raychowdhury, R., Thielke, A., Guttman, M., Robinson, J., Minie, B., Chevrier, N., Itzhaki, Z., *et al.* (2012). A high throughput Chromatin ImmunoPrecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol. Cell* *47*.
- Gardaï, S.J., McPhillips, K.A., Frasc, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M., and Henson, P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* *123*, 321–334.
- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Côté, M., Rich, R.L., *et al.* (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* *107*, 55–65.
- Gayther, S.A., Barski, P., Batley, S.J., Li, L., de Foy, K.A., Cohen, S.N., Ponder, B.A., and Caldas, C. (1997). Aberrant splicing of the TSG101 and FHIT genes occurs frequently in multiple malignancies and in normal tissues and mimics alterations previously described in tumours. *Oncogene* *15*, 2119–2126.
- Geng, J., Ito, Y., Shi, L., Amin, P., Chu, J., Ouchida, A.T., Mookhtiar, A.K., Zhao, H., Xu, D., Shan, B., *et al.* (2017). Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis. *Nat. Commun.* *8*, 359.
- Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W.-L., *et al.* (2011). Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* *471*, 591–596.
- GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rij, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., *et al.* (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *205*, 1621–1634.
- Ghazi-Noori, S., Froud, K.E., Mizielinska, S., Powell, C., Smidak, M., Fernandez de Marco, M., O'Malley, C., Farmer, M., Parkinson, N., Fisher, E.M.C., *et al.* (2012). Progressive neuronal inclusion formation and axonal degeneration in CHMP2B mutant transgenic mice. *Brain J. Neurol.* *135*, 819–832.

RÉFÉRENCES

- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., *et al.* (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* *15*, 1170–1178.
- Gilfillan, S., Chan, C.J., Cella, M., Haynes, N.M., Rapaport, A.S., Boles, K.S., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Colonna, M., 2008. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *Journal of Experimental Medicine* *205*, 2965–2973. doi:10.1084/jem.20081752
- Gill, D.J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* *26*, 600–612.
- Gil-Torregrosa, B.C., Lennon-Duménil, A.M., Kessler, B., Guermontprez, P., Ploegh, H.L., Fruci, D., van Endert, P., and Amigorena, S. (2004). Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* *34*, 398–407.
- Giodini, A., and Cresswell, P. (2008). Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *EMBO J.* *27*, 201–211.
- Goldszmid, R.S., Coppens, I., Lev, A., Caspar, P., Mellman, I., and Sher, A. (2009). Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J. Exp. Med.* *206*, 399–410.
- Gong, Y.-N., Guy, C., Crawford, J.C., and Green, D.R. (2017a). Biological events and molecular signaling following MLKL activation during necroptosis. *Cell Cycle Georget. Tex* *16*, 1748–1760.
- Gong, Y.-N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J.U., Yang, M., Fitzgerald, P., Linkermann, A., and Green, D.R. (2017b). ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. *Cell* *169*, 286-300.e16.
- Graham, D.B., Stephenson, L.M., Lam, S.K., Brim, K., Lee, H.M., Bautista, J., Gilfillan, S., Akilesh, S., Fujikawa, K., and Swat, W. (2007). An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2889–2897.
- Granucci, F., Ferrero, E., Foti, M., Aggujaro, D., Vettoretto, K., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect.* *1*, 1079–1084.
- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 353–363.
- Griffith, T.S., Yu, X., Herndon, J.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1996). CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* *5*, 7–16.
- Griffith, T.S., Kazama, H., VanOosten, R.L., Earle, J.K., Herndon, J.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (2007). Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8+ T cells that produce TRAIL. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *178*, 2679–2687.
- Gros, M., and Amigorena, S. (2019). Regulation of Antigen Export to the Cytosol During Cross-Presentation. *Front. Immunol.* *10*, 41.
- Grotzke, J.E., Kozik, P., Morel, J.-D., Impens, F., Pietrosemoli, N., Cresswell, P., Amigorena, S., and Demangel, C. (2017). Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E5910–E5919.
- Gu, M., LaJoie, D., Chen, O.S., von Appen, A., Ladinsky, M.S., Redd, M.J., Nikolova, L., Bjorkman, P.J., Sundquist, W.I., Ullman, K.S., *et al.* (2017). LEM2 recruits CHMP7 for ESCRT-mediated nuclear envelope closure in fission yeast and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E2166–E2175.
- Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* *425*, 397–402.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.
- Guilliams, M., Dutertre, C.-A., Scott, C.L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prieck, S., *et al.* (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* *45*, 669–684.
- Guizetti, J., and Gerlich, D.W. (2012). ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol.* *22*, 133–140.

RÉFÉRENCES

- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Müller-Reichert, T., and Gerlich, D.W. (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* *331*, 1616–1620.
- Gurka, S., Hartung, E., Becker, M., and Kroczyk, R.A. (2015). Mouse Conventional Dendritic Cells Can be Universally Classified Based on the Mutually Exclusive Expression of XCR1 and SIRP α . *Front. Immunol.* *6*, 35.
- den Haan, J.M.M., and Bevan, M.J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* *196*, 817–827.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 1685–1696.
- Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., *et al.* (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol. Cell* *36*, 831–844.
- Hammerich, L., Marron, T.U., Upadhyay, R., Svensson-Arvelund, J., Dhainaut, M., Hussein, S., Zhan, Y., Ostrowski, D., Yellin, M., Marsh, H., Salazar, A.M., Rahman, A.H., Brown, B.D., Merad, M., Brody, J.D., 2019. Systemic clinical tumor regressions and potentiation of PD1 blockade with in situ vaccination. *Nat Med* *25*, 814–824. doi:10.1038/s41591-019-0410-x
- Han, D., Liu, J., Chen, C., Dong, L., Liu, Y., Chang, R., Huang, X., Liu, Y., Wang, J., Dougherty, U., *et al.* (2019). Anti-tumour immunity controlled through mRNA m6A methylation and YTHDF1 in dendritic cells. *Nature* *566*, 270–274.
- Hanč, P., Fujii, T., Iborra, S., Yamada, Y., Huotari, J., Schulz, O., Ahrens, S., Kjær, S., Way, M., Sancho, D., *et al.* (2015). Structure of the Complex of F-Actin and DNGR-1, a C-Type Lectin Receptor Involved in Dendritic Cell Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens. *Immunity* *42*, 839–849.
- Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* *180*, 389–402.
- Harding, C.V., and Song, R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *153*, 4925–4933.
- He, S., Liang, Y., Shao, F., and Wang, X. (2011). Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 20054–20059.
- Helft, J., Manicassamy, B., Guermonprez, P., Hashimoto, D., Silvin, A., Agudo, J., Brown, B.D., Schmolke, M., Miller, J.C., Leboeuf, M., *et al.* (2012). Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection. *J. Clin. Invest.* *122*, 4037–4047.
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B.U., Goubau, D., and Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* *42*, 1197–1211.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Zhao, Y., and Emr, S.D. (2012). The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell* *151*, 356–371.
- Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., de Bovis, B., Devillard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., *et al.* (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* *207*, 189–206.
- Hierro, A., Sun, J., Rusnak, A.S., Kim, J., Prag, G., Emr, S.D., and Hurley, J.H. (2004). Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature* *431*, 221–225.
- Hildebrand, J.M., Tanzer, M.C., Lucet, I.S., Young, S.N., Spall, S.K., Sharma, P., Pierotti, C., Garnier, J.-M., Dobson, R.C.J., Webb, A.I., *et al.* (2014). Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 15072–15077.
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., *et al.* (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α + dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* *322*, 1097–1100.
- Hirano, S., Suzuki, N., Slagsvold, T., Kawasaki, M., Trambaiolo, D., Kato, R., Stenmark, H., and Wakatsuki, S. (2006). Structural basis of ubiquitin recognition by mammalian Eap45 GLUE domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1031–1032.
- Hoffmann, E., Pauwels, A.-M., Alloatti, A., Kotsias, F., and Amigorena, S. (2016). Analysis of Phagosomal Antigen Degradation by Flow Organelloctometry. *Bio-Protoc.* *6*.

RÉFÉRENCES

- Horii, M., Shibata, H., Kobayashi, R., Katoh, K., Yorikawa, C., Yasuda, J., and Maki, M. (2006). CHMP7, a novel ESCRT-III-related protein, associates with CHMP4b and functions in the endosomal sorting pathway. *Biochem. J.* *400*, 23–32.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* *9*, 847–856.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell Death. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1570–1583.
- Hotta, C., Fujimaki, H., Yoshinari, M., Nakazawa, M., and Minami, M. (2006). The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* *117*, 97–107.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* *425*, 402–406.
- Howland, S.W., and Wittrup, K.D. (2008). Antigen release kinetics in the phagosome are critical to cross-presentation efficiency. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 1576–1583.
- Huang, A.Y., Bruce, A.T., Pardoll, D.M., and Levitsky, H.I. (1996). In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* *4*, 349–355.
- Huang, D., Zheng, X., Wang, Z.-A., Chen, X., He, W.-T., Zhang, Y., Xu, J.-G., Zhao, H., Shi, W., Wang, X., *et al.* (2017). The MLKL Channel in Necroptosis Is an Octamer Formed by Tetramers in a Dyadic Process. *Mol. Cell Biol.* *37*.
- Hurley, J.H., and Hanson, P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 556–566.
- Iborra, S., Izquierdo, H.M., Martínez-López, M., Blanco-Menéndez, N., Reis e Sousa, C., and Sancho, D. (2012). The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1628–1643.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N.W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* *180*, 905–914.
- Igyártó, B.Z., Haley, K., Ortner, D., Bobr, A., Gerami-Nejad, M., Edelson, B.T., Zurawski, S.M., Malissen, B., Zurawski, G., Berman, J., *et al.* (2011). Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* *35*, 260–272.
- Im, Y.J., and Hurley, J.H. (2008). Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Dev. Cell* *14*, 902–913.
- Im, Y.J., Wollert, T., Boura, E., and Hurley, J.H. (2009). Structure and function of the ESCRT-II-III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev. Cell* *17*, 234–243.
- Imai, J., Hasegawa, H., Maruya, M., Koyasu, S., and Yahara, I. (2005). Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int. Immunol.* *17*, 45–53.
- Imai, T., Kato, Y., Kajiwara, C., Mizukami, S., Ishige, I., Ichiyangi, T., Hikida, M., Wang, J.-Y., and Udono, H. (2011). Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16363–16368.
- Itzhak, D.N., Davies, C., Tyanova, S., Mishra, A., Williamson, J., Antrobus, R., Cox, J., Weekes, M.P., Borner, G.H.H., 2017. A Mass Spectrometry-Based Approach for Mapping Protein Subcellular Localization Reveals the Spatial Proteome of Mouse Primary Neurons. *Cell Rep* *20*, 2706–2718. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.063
- Itzhak, D.N., Schessner, J.P., Borner, G.H.H., 2018. Dynamic Organellar Maps for Spatial Proteomics. *Current Protocols in Cell Biology* *83*, e81–29. doi:10.1002/cpcb.81
- Itzhak, D.N., Tyanova, S., Cox, J., Borner, G.H., 2016. Global, quantitative and dynamic mapping of protein subcellular localization. *eLife* *5*, e16950. doi:10.7554/eLife.16950
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 1289–1302.

RÉFÉRENCES

- Jacobsen, A.V., Lowes, K.N., Tanzer, M.C., Lucet, I.S., Hildebrand, J.M., Petrie, E.J., van Delft, M.F., Liu, Z., Conos, S.A., Zhang, J.-G., *et al.* (2016). HSP90 activity is required for MLKL oligomerisation and membrane translocation and the induction of necroptotic cell death. *Cell Death Dis.* *7*, e2051.
- Jaiswal, J.K., Andrews, N.W., and Simon, S.M. (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J. Cell Biol.* *159*, 625–635.
- Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmacheva, T., El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Pascolo, S., Gougerot-Pocidal, M.-A., Raposo, G., Seabra, M.C., *et al.* (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat. Cell Biol.* *9*, 367–378.
- Jimenez, A.J., and Perez, F. (2015). Physico-chemical and biological considerations for membrane wound evolution and repair in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *45*, 2–9.
- Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* *343*, 1247136.
- Jiménez-Rojo, N., Sot, J., Viguera, A.R., Collado, M.I., Torrecillas, A., Gómez-Fernández, J.C., Goñi, F.M., and Alonso, A. (2014). Membrane permeabilization induced by sphingosine: effect of negatively charged lipids. *Biophys. J.* *106*, 2577–2584.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 557–569.
- Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D., and Simon, S.M. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* *13*, 394–401.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* *17*, 211–220.
- Kadowaki, H., Satrimafitrah, P., Takami, Y., and Nishitoh, H. (2018). Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1. *Sci. Rep.* *8*, 7317.
- Kamath, A.T., Pooley, J., O’Keefe, M.A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A.M., D’Amico, A., Wu, L., Tough, D.F., and Shortman, K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 6762–6770.
- Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* *100*, 1734–1741.
- Karttunen, J., and Shastri, N. (1991). Measurement of ligand-induced activation in single viable T cells using the lacZ reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3972–3976.
- Karttunen, J., Sanderson, S., and Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6020–6024.
- Kato, Y., Kajiwara, C., Ishige, I., Mizukami, S., Yamazaki, C., Eikawa, S., Kakimi, K., and Udono, H. (2012). HSP70 and HSP90 Differentially Regulate Translocation of Extracellular Antigen to the Cytosol for Cross-Presentation. *Autoimmune Dis.* *2012*, 745962.
- Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., and Maki, M. (2003). The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J. Biol. Chem.* *278*, 39104–39113.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* *106*, 145–155.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* *162*, 413–423.
- Kazama, H., Ricci, J.-E., Herndon, J.M., Hoppe, G., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (2008). Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* *29*, 21–32.
- Kerksiek, K.M., Niedergang, F., Chavrier, P., Busch, D.H., and Brocker, T. (2005). Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* *105*, 742–749.

RÉFÉRENCES

- Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J., and Sundquist, W.I. (2008). Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev. Cell* *15*, 62–73.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., and Goldberg, A.L. (1999). The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes IMPLICATIONS FOR UNDERSTANDING THE DEGRADATIVE MECHANISM AND ANTIGEN PRESENTATION. *J. Biol. Chem.* *274*, 3363–3371.
- Klaes, R., Kloor, M., Willeke, F., Melsheimer, P., von Knebel Doeberitz, M., and Ridder, R. (1999). Significant increase of a specific variant TSG101 transcript during the progression of cervical neoplasia. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *35*, 733–737.
- Koopmann, J.O., Albring, J., Hüter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neeffes, J., Hämmerling, G.J., and Momburg, F. (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* *13*, 117–127.
- Kornhuber, J., Tripal, P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Muehlbacher, M., Groemer, T.W., Gulbins, E., 2010. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell. Physiol. Biochem.* *26*, 9–20. doi:10.1159/000315101
- Kostelansky, M.S., Schluter, C., Tam, Y.Y.C., Lee, S., Ghirlando, R., Beach, B., Conibear, E., and Hurley, J.H. (2007). Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* *129*, 485–498.
- Kovacovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* *267*, 243–246.
- Kretzer, N.M., Theisen, D.J., Tussiwand, R., Briseño, C.G., Grajales-Reyes, G.E., Wu, X., Durai, V., Albring, J., Bagadia, P., Murphy, T.L., *et al.* (2016). RAB43 facilitates cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *213*, 2871–2883.
- Krysko, D.V., Brouckaert, G., Kalai, M., Vandenabeele, P., and D’Herde, K. (2003). Mechanisms of internalization of apoptotic and necrotic L929 cells by a macrophage cell line studied by electron microscopy. *J. Morphol.* *258*, 336–345.
- Krysko, D.V., Denecker, G., Festjens, N., Gabriels, S., Parthoens, E., D’Herde, K., and Vandenabeele, P. (2006). Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* *13*, 2011–2022.
- Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., 2014. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Meth* *11*, 319–324. doi:10.1038/nmeth.2834
- Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (1998). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* *188*, 409–414.
- Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., and Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *166*, 1439–1442.
- Langelier, C., von Schwedler, U.K., Fisher, R.D., De Domenico, I., White, P.L., Hill, C.P., Kaplan, J., Ward, D., and Sundquist, W.I. (2006). Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J. Virol.* *80*, 9465–9480.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2008). Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* *321*, 1354–1357.
- Law, V., Knox, C., Djoumbou, Y., Jewison, T., Guo, A.C., Liu, Y., Maciejewski, A., Arndt, D., Wilson, M., Neveu, V., Tang, A., Gabriel, G., Ly, C., Adamjee, S., Dame, Z.T., Han, B., Zhou, Y., Wishart, D.S., 2014. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res* *42*, D1091–7. doi:10.1093/nar/gkt1068
- Lawand, M., Abramova, A., Manceau, V., Springer, S., and van Endert, P. (2016). TAP-Dependent and -Independent Peptide Import into Dendritic Cell Phagosomes. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *197*, 3454–3463.
- Lee, J.-A., and Gao, F.-B. (2008). Roles of ESCRT in autophagy-associated neurodegeneration. *Autophagy* *4*, 230–232.
- Lee, J.-A., and Gao, F.-B. (2009). Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 8506–8511.
- Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010). In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* *32*, 227–239.

RÉFÉRENCES

- Lee, I.-H., Kai, H., Carlson, L.-A., Groves, J.T., and Hurley, J.H. (2015). Negative membrane curvature catalyzes nucleation of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-III assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 15892–15897.
- Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.-B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol. CB* *17*, 1561–1567.
- Lee, T.H., Shank, J., Cusson, N., and Kelliher, M.A. (2004). The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor- α -induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J. Biol. Chem.* *279*, 33185–33191.
- Lennon-Duménil, A.-M., Bakker, A.H., Maehr, R., Fiebiger, E., Overkleeft, H.S., Roseblatt, M., Ploegh, H.L., and Lagaudrière-Gesbert, C. (2002). Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med.* *196*, 529–540.
- Lenz, M., Crow, D.J.G., and Joanny, J.-F. (2009). Membrane Buckling Induced by Curved Filaments. *Phys. Rev. Lett.* *103*, 038101.
- Leung, K.F., Dacks, J.B., and Field, M.C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic Cph. Den.* *9*, 1698–1716.
- Li, L., and Cohen, S.N. (1996). Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell* *85*, 319–329.
- Li, C.C., Munitic, I., Mittelstadt, P.R., Castro, E., and Ashwell, J.D. (2015a). Suppression of Dendritic Cell-Derived IL-12 by Endogenous Glucocorticoids Is Protective in LPS-Induced Sepsis. *PLOS Biol.* *13*, e1002269.
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., *et al.* (2012). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* *150*, 339–350.
- Li, M., Davey, G.M., Sutherland, R.M., Kurts, C., Lew, A.M., Hirst, C., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* *166*, 6099–6103.
- Li, M., Tao, Y., Shu, Y., LaRochelle, J.R., Steinauer, A., Thompson, D., Schepartz, A., Chen, Z.-Y., and Liu, D.R. (2015b). Discovery and characterization of a peptide that enhances endosomal escape of delivered proteins in vitro and in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* *137*, 14084–14093.
- Li, Y., Wang, L.-X., Yang, G., Hao, F., Urba, W.J., and Hu, H.-M. (2008). Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res.* *68*, 6889–6895.
- Li, Z., Agellon, L.B., Allen, T.M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A., and Vance, D.E. (2006). The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab.* *3*, 321–331.
- Lin, M.L., Zhan, Y., Proietto, A.I., Prato, S., Wu, L., Heath, W.R., Villadangos, J.A., and Lew, A.M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8⁺ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3029–3034.
- Lin, P.M., Liu, T.C., Chang, J.G., Chen, T.P., and Lin, S.F. (1998). Aberrant TSG101 transcripts in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* *102*, 753–758.
- Lin, Y., Kimpler, L.A., Naismith, T.V., Lauer, J.M., and Hanson, P.I. (2005). Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J. Biol. Chem.* *280*, 12799–12809.
- Liu, Z., Tian, Z., Cao, K., Zhang, B., Wen, Q., Zhou, X., Yang, W., Wang, T., Shi, H., and Wang, R. (2019). TSG101 promotes the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating the PEG10. *J. Cell. Mol. Med.* *23*, 70–82.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* *25*, 402–408.
- Lizée, G., Basha, G., Tjong, J., Julien, J.-P., Tian, M., Biron, K.E., and Jefferies, W.A. (2003). Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* *4*, 1065–1073.

RÉFÉRENCES

- López-Jiménez, A.T., Cardenal-Muñoz, E., Leuba, F., Gerstenmaier, L., Barisch, C., Hagedorn, M., King, J.S., and Soldati, T. (2018). The ESCRT and autophagy machineries cooperate to repair ESX-1-dependent damage at the Mycobacterium-containing vacuole but have opposite impact on containing the infection. *PLoS Pathog.* *14*, e1007501.
- Lu, Q., Grotzke, J.E., and Cresswell, P. (2018). A novel probe to assess cytosolic entry of exogenous proteins. *Nat. Commun.* *9*, 3104.
- Luber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O’Keefe, M., *et al.* (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* *32*, 279–289.
- Lukacs, G.L., Rotstein, O.D., and Grinstein, S. (1990). Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* *265*, 21099–21107.
- Lundberg, E., Borner, G.H.H., 2019. Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 1–18. doi:10.1038/s41580-018-0094-y
- MacDonald, M.L., Lamerdin, J., Owens, S., Keon, B.H., Bilter, G.K., Shang, Z., Huang, Z., Yu, H., Dias, J., Minami, T., Michnick, S.W., Westwick, J.K., 2006. Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nat Chem Biol* *2*, 329–337. doi:10.1038/nchembio790
- Macjima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., *et al.* (2013). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* *32*, 2336–2347.
- Mamińska, A., Bartosik, A., Banach-Orłowska, M., Pilecka, I., Jastrzębski, K., Zdżalik-Bielecka, D., Castanon, I., Poulain, M., Neyen, C., Wolińska-Nizioł, L., *et al.* (2016). ESCRT proteins restrict constitutive NF- κ B signaling by trafficking cytokine receptors. *Sci. Signal.* *9*, ra8–ra8.
- Mandal, P., Berger, S.B., Pillay, S., Moriwaki, K., Huang, C., Guo, H., Lich, J.D., Finger, J., Kasparcova, V., Votta, B., *et al.* (2014). RIP3 induces apoptosis independent of proinflammatory kinase activity. *Mol. Cell* *56*, 481–495.
- Mant, A., Chinnery, F., Elliott, T., and Williams, A.P. (2012). The pathway of cross-presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology* *136*, 163–175.
- Martinez, J., Malireddi, R.K.S., Lu, Q., Cunha, L.D., Pelletier, S., Gingras, S., Orchard, R., Guan, J.-L., Tan, H., Peng, J., *et al.* (2015). Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.* *17*, 893–906.
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., Bieniasz, P.D., and Yarovoy, A. (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12414–12419.
- Matheoud, D., Perić, L., Hoeffel, G., Vimeux, L., Parent, I., Marañón, C., Bourdoncle, P., Renia, L., Prevost-Blondel, A., Lucas, B., *et al.* (2010). Cross-presentation by dendritic cells from live cells induces protective immune responses in vivo. *Blood* *115*, 4412–4420.
- Matheoud, D., Baey, C., Vimeux, L., Tempez, A., Valente, M., Louche, P., Le Bon, A., Hosmalin, A., and Feuillet, V. (2011). Dendritic cells crosspresent antigens from live B16 cells more efficiently than from apoptotic cells and protect from melanoma in a therapeutic model. *PLoS One* *6*, e19104.
- Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M.T., Hong, W.J., Olivier, M., Gagnon, E., Desjardins, M., and Descoteaux, A. (2013). Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe* *14*, 15–25.
- McCullough, J., Fisher, R.D., Whitby, F.G., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 7687–7691.
- McDonnell, A.M., Prosser, A.C., van Bruggen, I., Robinson, B.W.S., and Currie, A.J. (2010). CD8 α ⁺ DC are not the sole subset cross-presenting cell-associated tumor antigens from a solid tumor. *Eur. J. Immunol.* *40*, 1617–1627.
- McNeil, P.L., and Baker, M.M. (2001). Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell Tissue Res.* *304*, 141–146.
- McQuade, T., Cho, Y., and Chan, F.K.-M. (2013). Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis. *Biochem. J.* *456*, 409–415.

RÉFÉRENCES

- Mehnert, M., Sommer, T., and Jarosch, E. (2014). Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane. *Nat. Cell Biol.* *16*, 77–86.
- Ménager, J., Ebstein, F., Oger, R., Hulin, P., Nedellec, S., Duverger, E., Lehmann, A., Kloetzel, P.-M., Jotereau, F., and Guilloux, Y. (2014). Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PLoS One* *9*, e89897.
- Meng, H., Liu, Z., Li, X., Wang, H., Jin, T., Wu, G., Shan, B., Christofferson, D.E., Qi, C., Yu, Q., *et al.* (2018). Death-domain dimerization-mediated activation of RIPK1 controls necroptosis and RIPK1-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E2001–E2009.
- Menon, M.B., Gropengießer, J., Fischer, J., Novikova, L., Deuretzbacher, A., Lafera, J., Schimmeck, H., Czymmeck, N., Ronkina, N., Kotlyarov, A., *et al.* (2017). p38MAPK/MK2-dependent phosphorylation controls cytotoxic RIPK1 signalling in inflammation and infection. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1248–1259.
- Merrill, S.A., and Hanson, P.I. (2010). Activation of human VPS4A by ESCRT-III proteins reveals ability of substrates to relieve enzyme autoinhibition. *J. Biol. Chem.* *285*, 35428–35438.
- Merzougui, N., Kratzer, R., Saveanu, L., and van Endert, P. (2011). A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep.* *12*, 1257–1264.
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., *et al.* (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* *334*, 1573–1577.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5299–5305.
- Mierzwa, B.E., Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., von Filseck, J.M., König, J., Larios, J., Poser, I., Müller-Reichert, T., Scheuring, S., Roux, A., *et al.* (2017). Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* *19*, 787–798.
- Mintern, J.D., Macri, C., Chin, W.J., Panozza, S.E., Segura, E., Patterson, N.L., Zeller, P., Bourges, D., Bedoui, S., McMillan, P.J., *et al.* (2015). Differential use of autophagy by primary dendritic cells specialized in cross-presentation. *Autophagy* *11*, 906–917.
- Miyake, K., McNeil, P.L., Suzuki, K., Tsunoda, R., and Sugai, N. (2001). An actin barrier to resealing. *J. Cell Sci.* *114*, 3487–3494.
- Miyawaki, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidyserine receptor. *Nature* *450*, 435–439.
- Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepfer, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., *et al.* (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* *124*, 1283–1298.
- Momburg, F., Roelse, J., Hämmerling, G.J., and Neefjes, J.J. (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.* *179*, 1613–1623.
- Monroe, N., Han, H., Gonciarz, M.D., Eckert, D.M., Karren, M.A., Whitby, F.G., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2014). The oligomeric state of the active Vps4 AAA ATPase. *J. Mol. Biol.* *426*, 510–525.
- Monroe, N., Han, H., Shen, P.S., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2017). Structural basis of protein translocation by the Vps4-Vta1 AAA ATPase. *ELife* *6*.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* *26*, 4215–4227.
- Morita, E., Colf, L.A., Karren, M.A., Sandrin, V., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12889–12894.
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W.I. (2011). ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* *9*, 235–242.
- Moriwaki, K., Balaji, S., McQuade, T., Malhotra, N., Kang, J., and Chan, F.K.-M. (2014). The necroptosis adaptor RIPK3 promotes injury-induced cytokine expression and tissue repair. *Immunity* *41*, 567–578.

RÉFÉRENCES

- Murphy, J.M., Czabotar, P.E., Hildebrand, J.M., Lucet, I.S., Zhang, J.-G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A.I., *et al.* (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* *39*, 443–453.
- Murshid, A., Gong, J., and Calderwood, S.K. (2010). Heat shock protein 90 mediates efficient antigen cross presentation through the scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 2903–2917.
- Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborlini, A., Usami, Y., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell* *10*, 821–830.
- Nadanaciva, S., Lu, S., Gebhard, D.F., Jessen, B.A., Pennie, W.D., Will, Y., 2011. A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds. *Toxicol In Vitro* *25*, 715–723. doi:10.1016/j.tiv.2010.12.010
- Nair-Gupta, P., Baccarini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y., Banerjee, M., Overholtzer, M., Roche, P.A., Tampé, R., *et al.* (2014). TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* *158*, 506–521.
- Najafav, A., Mookhtiar, A.K., Luu, H.S., Ordureau, A., Pan, H., Amin, P.P., Li, Y., Lu, Q., and Yuan, J. (2019). TAM Kinases Promote Necroptosis by Regulating Oligomerization of MLKL. *Mol. Cell* *75*, 457–468.e4.
- Nakayama, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2009). Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* *113*, 3821–3830.
- Neubert, K., Lehmann, C.H.K., Heger, L., Baranska, A., Staedtler, A.M., Buchholz, V.R., Yamazaki, S., Heidkamp, G.F., Eissing, N., Zebroski, H., *et al.* (2014). Antigen delivery to CD11c+CD8- dendritic cells induces protective immune responses against experimental melanoma in mice in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 5830–5838.
- Newton, K., Dugger, D.L., Wickliffe, K.E., Kapoor, N., de Almagro, M.C., Vucic, D., Komuves, L., Ferrando, R.E., French, D.M., Webster, J., *et al.* (2014). Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* *343*, 1357–1360.
- Nickerson, D.P., West, M., and Odorizzi, G. (2006). Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J. Cell Biol.* *175*, 715–720.
- Norbury, C.C., Hewlett, L.J., Prescott, A.R., Shastri, N., and Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* *3*, 783–791.
- Norbury, C.C., Chambers, B.J., Prescott, A.R., Ljunggren, H.G., and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *27*, 280–288.
- Norbury, C.C., Basta, S., Donohue, K.B., Tscharke, D.C., Princiotta, M.F., Berglund, P., Gibbs, J., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2004). CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science* *304*, 1318–1321.
- Norgan, A.P., Davies, B.A., Azmi, I.F., Schroeder, A.S., Payne, J.A., Lynch, G.M., Xu, Z., and Katzmann, D.J. (2013). Relief of autoinhibition enhances Vta1 activation of Vps4 via the Vps4 stimulatory element. *J. Biol. Chem.* *288*, 26147–26156.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* *13*, 54–61.
- Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G.S., and Green, D.R. (2011). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature* *471*, 363–367.
- Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D.J., Perisic, O., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* *449*, 735–739.
- Ocaña-Morgner, C., Sales, S., Rothe, M., Shevchenko, A., and Jessberger, R. (2017). Tolerogenic versus Immunogenic Lipidomic Profiles of CD11c+ Immune Cells and Control of Immunogenic Dendritic Cell Ceramide Dynamics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *198*, 4360–4372.
- Oh, K.B., Stanton, M.J., West, W.W., Todd, G.L., and Wagner, K.-U. (2007). Tsg101 is upregulated in a subset of invasive human breast cancers and its targeted overexpression in transgenic mice reveals weak oncogenic properties for mammary cancer initiation. *Oncogene* *26*, 5950–5959.
- Oh, Y.K., Harding, C.V., and Swanson, J.A. (1997). The efficiency of antigen delivery from macrophage phagosomes into cytoplasm for MHC class I-restricted antigen presentation. *Vaccine* *15*, 511–518.

RÉFÉRENCES

- Olmos, Y., Hodgson, L., Mantell, J., Verkade, P., and Carlton, J.G. (2015). ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* *522*, 236–239.
- Olmos, Y., Perdrix-Rosell, A., and Carlton, J.G. (2016). Membrane Binding by CHMP7 Coordinates ESCRT-III-Dependent Nuclear Envelope Reformation. *Curr. Biol. CB* *26*, 2635–2641.
- O’Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.
- Orozco, S., Yatim, N., Werner, M.R., Tran, H., Gunja, S.Y., Tait, S.W.G., Albert, M.L., Green, D.R., and Oberst, A. (2014). RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death Differ.* *21*, 1511–1521.
- Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., Zhang, W., Luoma, A., Giobbie-Hurder, A., Peter, L., Chen, C., Olive, O., Carter, T.A., Li, S., Lieb, D.J., Eisenhaure, T., Gjini, E., Stevens, J., Lane, W.J., Javeri, I., Nellaiappan, K., Salazar, A.M., Daley, H., Seaman, M., Buchbinder, E.I., Yoon, C.H., Harden, M., Lennon, N., Gabriel, S., Rodig, S.J., Barouch, D.H., Aster, J.C., Getz, G., Wucherpfennig, K., Neuberg, D., Ritz, J., Lander, E.S., Fritsch, E.F., Hacohen, N., Wu, C.J., 2017. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* *547*, 217–221. doi:10.1038/nature22991
- Pace, L., Tempez, A., Arnold-Schrauf, C., Lemaitre, F., Bouso, P., Fetler, L., Sparwasser, T., and Amigorena, S. (2012). Regulatory T cells increase the avidity of primary CD8+ T cell responses and promote memory. *Science* *338*, 532–536.
- Palmowski, M.J., Gileadi, U., Salio, M., Gallimore, A., Millrain, M., James, E., Addey, C., Scott, D., Dyson, J., Simpson, E., *et al.* (2006). Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 983–990.
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.-C., Chapman, D.C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., *et al.* (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* *28*, 578–590.
- Park, S.Y., Shim, J.H., and Cho, Y.S. (2014). Distinctive roles of receptor-interacting protein kinases 1 and 3 in caspase-independent cell death of L929. *Cell Biochem. Funct.* *32*, 62–69.
- Pedersen, C.D., Fang, J.J., and Pedersen, A.E. (2009). A Comparative Study of Transfection Methods for RNA Interference in Bone Marrow-Derived Murine Dendritic Cells. *Scand. J. Immunol.* *70*, 447–456.
- Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hägerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Håkansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., *et al.* (2013). IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* *38*, 958–969.
- Pfeifer, J.D., Wick, M.J., Roberts, R.L., Findlay, K., Normark, S.J., and Harding, C.V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* *361*, 359–362.
- Philips, J.A., Porto, M.C., Wang, H., Rubin, E.J., and Perrimon, N. (2008). ESCRT factors restrict mycobacterial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3070–3075.
- Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., *et al.* (2009). A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Struct. Lond. Engl.* *17*, 843–856.
- Platt, C.D., Ma, J.K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R.A.D., Mellman, I., and Delamarre, L. (2010). Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4287–4292.
- Ploegh, H.L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* *448*, 435–438.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 5327–5330.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P.A., Escott, K.J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., Pirmohamed, M., 2019. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* *18*, 41–58. doi:10.1038/nrd.2018.168
- Raab, M., Gentili, M., de Belly, H., Thiam, H.R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.M., Manel, N., *et al.* (2016). ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* *352*, 359–362.

RÉFÉRENCES

- Radulovic, M., Schink, K.O., Wenzel, E.M., Nähse, V., Bongiovanni, A., Lafont, F., and Stenmark, H. (2018). ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *EMBO J.* *37*.
- Rawson, P.M., Molette, C., Videtta, M., Altieri, L., Franceschini, D., Donato, T., Finocchi, L., Propato, A., Paroli, M., Meloni, F., *et al.* (2007). Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat. Med.* *13*, 1431–1439.
- Ray, K., Bobard, A., Danckaert, A., Paz-Haftel, I., Clair, C., Ehsani, S., Tang, C., Sansonetti, P., Tran, G.V.N., and Enninga, J. (2010). Tracking the dynamic interplay between bacterial and host factors during pathogen-induced vacuole rupture in real time. *Cell. Microbiol.* *12*, 545–556.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., and Stevens, T.H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol. Biol. Cell* *3*, 1389–1402.
- Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* *106*, 157–169.
- Reis e Sousa, C., and Germain, R.N. (1995). Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.* *182*, 841–851.
- Ren, X., and Hurley, J.H. (2011). Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast. *EMBO J.* *30*, 2130–2139.
- Ren, X., Kloer, D.P., Kim, Y.C., Ghirlando, R., Saidi, L.F., Hummer, G., and Hurley, J.H. (2009). Hybrid structural model of the complete human ESCRT-0 complex. *Struct. Lond. Engl.* *17*, 406–416.
- Repnik, U., Borg Distefano, M., Speth, M.T., Ng, M.Y.W., Progidia, C., Hoflack, B., Gruenberg, J., and Griffiths, G. (2017). L-leucyl-L-leucine methyl ester does not release cysteine cathepsins to the cytosol but inactivates them in transiently permeabilized lysosomes. *J. Cell Sci.* *130*, 3124–3140.
- Rock, K.L., Shen, L., 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* *207*, 166–183. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* *1*, 362–368.
- Rodriguez, D.A., Weinlich, R., Brown, S., Guy, C., Fitzgerald, P., Dillon, C.P., Oberst, A., Quarato, G., Low, J., Cripps, J.G., *et al.* (2016). Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis. *Cell Death Differ.* *23*, 76–88.
- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., and Alnemri, E.S. (2017). Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat. Commun.* *8*, 14128.
- Römisch, K. (2017). A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD. *Trends Biochem. Sci.* *42*, 171–179.
- Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M.P., Garancini, M.P., Manfredi, A.A., Rugarli, C., and Bellone, M. (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 130–136.
- Ros, U., Peña-Blanco, A., Hänggi, K., Kundendorf, U., Krautwald, S., Wong, W.W.-L., and García-Sáez, A.J. (2017). Necroptosis Execution Is Mediated by Plasma Membrane Nanopores Independent of Calcium. *Cell Rep.* *19*, 175–187.
- Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentinis, B., Catalanotti, F., Giazzon, M., Dumitriu, I.E., Müller, S., Iannaccone, M., Traversari, C., *et al.* (2004). HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* *5*, 825–830.
- Rühl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J.C., and Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* *362*, 956–960.
- Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J. Cell Sci.* *122*, 2179–2183.
- Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M.W., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.-P., Brech, A., Bilder, D., *et al.* (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr. Biol. CB* *17*, 1817–1825.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev. Cell* *20*, 131–139.

RÉFÉRENCES

- Saka, H.A., and Valdivia, R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 411–437.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E., and Emr, S.D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* *136*, 97–109.
- Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., Chakarov, S., Rivera, C., Hogstad, B., Bosenberg, M., Hashimoto, D., Gnjjatic, S., Bhardwaj, N., Palucka, A.K., Brown, B.D., Brody, J., Ginhoux, F., Merad, M., 2016. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* *44*, 924–938. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.012
- Samie, M., and Cresswell, P. (2015). The transcription factor TFEB acts as a molecular switch that regulates exogenous antigen-presentation pathways. *Nat. Immunol.* *16*, 729–736.
- Sancho, D., Mourão-Sá, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., and Reis e Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest.* *118*, 2098–2110.
- Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martínez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* *458*, 899–903.
- Sanderson, S., Shastri, N., 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *International Immunology* *6*, 369–376.
- Sánchez-Paulete, A.R., Teijeira, Á., Quetglas, J.I., Rodríguez-Ruiz, M.E., Sánchez-Arráez, Á., Labiano, S., Etxeberria, I., Azpilikueta, A., Bolaños, E., Ballesteros-Briones, M.C., Casares, N., Quezada, S.A., Berraondo, P., Sancho, D., Smerdou, C., Melero, I., 2018. Intratumoral Immunotherapy with XCL1 and sFlt3L Encoded in Recombinant Semliki Forest Virus-Derived Vectors Fosters Dendritic Cell-Mediated T-cell Cross-Priming. *Cancer Res* *78*, 6643–6654. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0933
- Sapozhnikov, A., Fischer, J.A.A., Zaft, T., Krauthgamer, R., Dzionek, A., and Jung, S. (2007). Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 1923–1933.
- Sathe, P., Pooley, J., Vremec, D., Mintern, J., Jin, J.-O., Wu, L., Kwak, J.-Y., Villadangos, J.A., and Shortman, K. (2011). The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5184–5192.
- Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S.R., *et al.* (2009). IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* *325*, 213–217.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Duménil, A.-M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *126*, 205–218.
- Savina, A., Peres, A., Cebrian, I., Carmo, N., Moita, C., Hacohen, N., Moita, L.F., and Amigorena, S. (2009). The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* *30*, 544–555.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* *418*, 191–195.
- Schäuble, N., Cavalié, A., Zimmermann, R., and Jung, M. (2014). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A with the human Sec61 complex suppresses passive calcium efflux from the endoplasmic reticulum. *Channels Austin Tex* *8*, 76–83.
- Scheffer, L.L., Sreetama, S.C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K.J., Defour, A., and Jaiswal, J.K. (2014). Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat. Commun.* *5*, 5646.
- Scheffer, S.R., Nave, H., Korangy, F., Schlote, K., Pabst, R., Jaffee, E.M., Manns, M.P., and Greten, T.F. (2003). Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int. J. Cancer* *103*, 205–211.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H.C., Belardelli, F., and Gabriele, L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J. Exp. Med.* *196*, 1415–1425.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., *et al.* (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* *38*, 970–983.

RÉFÉRENCES

- Schnorrer, P., Behrens, G.M.N., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., *et al.* (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10729–10734.
- Schoebel, S., Mi, W., Stein, A., Ovchinnikov, S., Pavlovicz, R., DiMaio, F., Baker, D., Chambers, M.G., Su, H., Li, D., *et al.* (2017). Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature* *548*, 352–355.
- Schöneberg, J., Lee, I.-H., Iwasa, J.H., and Hurley, J.H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 5–17.
- Schöneberg, J., Pavlin, M.R., Yan, S., Righini, M., Lee, I.-H., Carlson, L.-A., Bahrami, A.H., Goldman, D.H., Ren, X., Hummer, G., *et al.* (2018). ATP-dependent force generation and membrane scission by ESCRT-III and Vps4. *Science* *362*, 1423–1428.
- Schuh, A.L., Hanna, M., Quinney, K., Wang, L., Sarkeshik, A., Yates, J.R., and Audhya, A. (2015). The VPS-20 subunit of the endosomal sorting complex ESCRT-III exhibits an open conformation in the absence of upstream activation. *Biochem. J.* *466*, 625–637.
- Schulz, O., and Reis e Sousa, C. (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* *107*, 183–189.
- Schulz, O., Pennington, D.J., Hodivala-Dilke, K., Febbraio, M., and Reis e Sousa, C. (2002). CD36 or alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins are not essential for MHC class I cross-presentation of cell-associated antigen by CD8 alpha+ murine dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 6057–6065.
- Schulz, O., Hanč, P., Böttcher, J.P., Hoogeboom, R., Diebold, S.S., Tolar, P., and Reis E Sousa, C. (2018). Myosin II Synergizes with F-Actin to Promote DNGR-1-Dependent Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens. *Cell Rep.* *24*, 419–428.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* *473*, 337–342.
- von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Müller, B., Ward, D.M., Chung, H.-Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.-P., Cimbora, D.M., *et al.* (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* *114*, 701–713.
- Segura, E., Albiston, A.L., Wicks, I.P., Chai, S.Y., and Villadangos, J.A. (2009). Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20377–20381.
- Segura, E., Kapp, E., Gupta, N., Wong, J., Lim, J., Ji, H., Heath, W.R., Simpson, R., and Villadangos, J.A. (2010). Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis. *Mol. Immunol.* *47*, 1765–1773.
- Semrich, M., Plantinga, M., Svensson-Frej, M., Uronen-Hansson, H., Gustafsson, T., Mowat, A.M., Yrlid, U., Lambrecht, B.N., and Agace, W.W. (2012). Directed antigen targeting in vivo identifies a role for CD103+ dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses. *Mucosal Immunol.* *5*, 150–160.
- Sengupta, D., Graham, M., Liu, X., and Cresswell, P. (2019). Proteasomal degradation within endocytic organelles mediates antigen cross-presentation. *EMBO J.* e99266.
- Shen, L., and Rock, K.L. (2004). Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3035–3040.
- Shen, K.-Y., Song, Y.-C., Chen, I.-H., Leng, C.-H., Chen, H.-W., Li, H.-J., Chong, P., and Liu, S.-J. (2014a). Molecular mechanisms of TLR2-mediated antigen cross-presentation in dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4233–4241.
- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., and Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* *21*, 155–165.
- Shen, Q.-T., Schuh, A.L., Zheng, Y., Quinney, K., Wang, L., Hanna, M., Mitchell, J.C., Otegui, M.S., Ahlquist, P., Cui, Q., *et al.* (2014b). Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly. *J. Cell Biol.* *206*, 763–777.
- Shestakova, A., Curtiss, M., Davies, B.A., Katzmann, D.J., and Babst, M. (2013). The linker region plays a regulatory role in assembly and activity of the Vps4 AAA ATPase. *J. Biol. Chem.* *288*, 26810–26819.

RÉFÉRENCES

- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* *425*, 516–521.
- Shim, S., Kimpler, L.A., and Hanson, P.I. (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic Cph. Den.* *8*, 1068–1079.
- Shrimpton, R.E., Butler, M., Morel, A.-S., Eren, E., Hue, S.S., and Ritter, M.A. (2009). CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol. Immunol.* *46*, 1229–1239.
- Sil, P., Muse, G.W., Wong, S.-W., Kolb, J.P., DeGraff, L.M., Tucker, C.J., Scappini, E., Snyder, A.G., Grimm, S., Oberst, A., *et al.* (2019). Non-canonical autophagy in dendritic cells restricts cross-presentation and anti-tumor immunity. *BioRxiv* 789867.
- Singh, R., and Cresswell, P. (2010). Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science* *328*, 1394–1398.
- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. (2002). Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 26796–26803.
- Skalicky, J.J., Aarii, J., Wenzel, D.M., Stubblefield, W.-M.B., Katsuyama, A., Uter, N.T., Bajorek, M., Myszka, D.G., and Sundquist, W.I. (2012). Interactions of the human LIP5 regulatory protein with endosomal sorting complexes required for transport. *J. Biol. Chem.* *287*, 43910–43926.
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., *et al.* (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.* *37*, 806–808.
- Skowyra, M.L., Schlesinger, P.H., Naismith, T.V., and Hanson, P.I. (2018). Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science* *360*.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S., and Stenmark, H. (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J. Biol. Chem.* *280*, 19600–19606.
- Snyder, A.G., Hubbard, N.W., Messmer, M.N., Kofman, S.B., Hagan, C.E., Orozco, S.L., Chiang, K., Daniels, B.P., Baker, D., and Oberst, A. (2019). Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. *Sci. Immunol.* *4*.
- Song, R., and Harding, C.V. (1996). Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 4182–4190.
- Stein, A., Ruggiano, A., Carvalho, P., and Rapoport, T.A. (2014). Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components. *Cell* *158*, 1375–1388.
- Steiner, Q.-G., Otten, L.A., Hicks, M.J., Kaya, G., Grosjean, F., Saeuberli, E., Lavanchy, C., Beerhmann, F., McClain, K.L., and Acha-Orbea, H. (2008). In vivo transformation of mouse conventional CD8 α + dendritic cells leads to progressive multisystem histiocytosis. *Blood* *111*, 2073–2082.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Steinman, R.M., and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 5132–5136.
- Stuchell, M.D., Garrus, J.E., Müller, B., Stray, K.M., Ghaffarian, S., McKinnon, R., Kräusslich, H.-G., Morham, S.G., and Sundquist, W.I. (2004). The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J. Biol. Chem.* *279*, 36059–36071.
- Stuchell-Brereton, M.D., Skalicky, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W.I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* *449*, 740–744.
- Stylianopoulos, T., Martin, J.D., Chauhan, V.P., Jain, S.R., Diop-Frimpong, B., Bardeesy, N., Smith, B.L., Ferrone, C.R., Hornicek, F.J., Boucher, Y., *et al.* (2012). Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 15101–15108.
- Subramanian, M., Hayes, C.D., Thome, J.J., Thorp, E., Matsushima, G.K., Herz, J., Farber, D.L., Liu, K., Lakshmana, M., and Tabas, I. (2014). An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo. *J. Clin. Invest.* *124*, 1296–1308.

RÉFÉRENCES

- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., *et al.* (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* *148*, 213–227.
- Sun, S., Li, L., Yang, F., Wang, X., Fan, F., Yang, M., Chen, C., Li, X., Wang, H.-W., and Sui, S.-F. (2017). Cryo-EM structures of the ATP-bound Vps4E233Q hexamer and its complex with Vta1 at near-atomic resolution. *Nat. Commun.* *8*, 16064.
- Sun, Z., Pan, J., Bubley, G., and Balk, S.P. (1997). Frequent abnormalities of TSG101 transcripts in human prostate cancer. *Oncogene* *15*, 3121–3125.
- Suto, R., and Srivastava, P.K. (1995). A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* *269*, 1585–1588.
- Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., *et al.* (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8981–8986.
- Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M.M., Serfass, J.M., Chen, L., Gebru, M., Chen, C., *et al.* (2018). An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat. Commun.* *9*, 2855.
- Takahashi, Y., Liang, X., Hattori, T., Tang, Z., He, H., Chen, H., Liu, X., Abraham, T., Imamura-Kawasawa, Y., Buchkovich, N.J., *et al.* (2019). VPS37A directs ESCRT recruitment for phagophore closure. *J. Cell Biol.* jcb.201902170.
- Tang, S., Henne, W.M., Borbat, P.P., Buchkovich, N.J., Freed, J.H., Mao, Y., Fromme, J.C., and Emr, S.D. (2015). Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments. *ELife* *4*.
- Tanzer, M.C., Tripaydonis, A., Webb, A.I., Young, S.N., Varghese, L.N., Hall, C., Alexander, W.S., Hildebrand, J.M., Silke, J., and Murphy, J.M. (2015). Necroptosis signalling is tuned by phosphorylation of MLKL residues outside the pseudokinase domain activation loop. *Biochem. J.* *471*, 255–265.
- Tanzer, M.C., Matti, I., Hildebrand, J.M., Young, S.N., Wardak, A., Tripaydonis, A., Petric, E.J., Mildenhall, A.L., Vaux, D.L., Vince, J.E., *et al.* (2016). Evolutionary divergence of the necroptosis effector MLKL. *Cell Death Differ.* *23*, 1185–1197.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* *15*, 578–589.
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B.L., and Emr, S.D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* *29*, 871–883.
- Teo, H., Perisic, O., González, B., and Williams, R.L. (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev. Cell* *7*, 559–569.
- Teo, H., Gill, D.J., Sun, J., Perisic, O., Vepintsev, D.B., Vallis, Y., Emr, S.D., and Williams, R.L. (2006). ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* *125*, 99–111.
- Terasaki, M., Miyake, K., and McNeil, P.L. (1997). Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca²⁺-dependent vesicle-vesicle fusion events. *J. Cell Biol.* *139*, 63–74.
- Theisen, D.J., Davidson, J.T., Briseño, C.G., Gargaro, M., Lauron, E.J., Wang, Q., Desai, P., Durai, V., Bagadia, P., Brickner, J.R., *et al.* (2018). WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science* *362*, 694–699.
- Theisen, D.J., Ferris, S.T., Briseño, C.G., Kretzer, N., Iwata, A., Murphy, K.M., and Murphy, T.L. (2019). Batf3-Dependent Genes Control Tumor Rejection Induced by Dendritic Cells Independently of Cross-Presentation. *Cancer Immunol. Res.* *7*, 29–39.
- Thiele, D.L., and Lipsky, P.E. (1990). Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 83–87.
- Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* *482*, 414–418.
- Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* *299*, 1400–1403.

RÉFÉRENCES

- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Meth* 13, 731–740. doi:10.1038/nmeth.3901
- Uhl, M., Kepp, O., Jusforgues-Saklani, H., Vicencio, J.-M., Kroemer, G., and Albert, M.L. (2009). Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. *Cell Death Differ.* 16, 991–1005.
- Van Hoecke, L., Van Lint, S., Roose, K., Van Parys, A., Vandenabeele, P., Grooten, J., Tavernier, J., De Koker, S., and Saelens, X. (2018). Treatment with mRNA coding for the necroptosis mediator MLKL induces antitumor immunity directed against neo-epitopes. *Nat. Commun.* 9, 3417.
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Ploegh, H.L., and Tonegawa, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 71, 1205–1214.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 17, 922–930.
- Vietri, M., Schink, K.O., Campsteijn, C., Wegner, C.S., Schultz, S.W., Christ, L., Thoresen, S.B., Brech, A., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2015). Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* 522, 231–235.
- Vivar, O.I., Magalhaes, J.G., and Amigorena, S. (2016). Measurement of Export to the Cytosol in Dendritic Cells Using a Cytofluorimetry-Based Assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1423, 183–188.
- Voorhees, R.M., Fernández, I.S., Scheres, S.H.W., and Hegde, R.S. (2014). Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell* 157, 1632–1643.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 565–573.
- Wagner, C.S., Grotzke, J., and Cresswell, P. (2013). Intracellular regulation of cross-presentation during dendritic cell maturation. *PLoS One* 8, e76801.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L.-F., Wang, F.-S., and Wang, X. (2014). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol. Cell* 54, 133–146.
- Wang, H., Meng, H., Li, X., Zhu, K., Dong, K., Mookhtiar, A.K., Wei, H., Li, Y., Sun, S.-C., and Yuan, J. (2017a). PELI1 functions as a dual modulator of necroptosis and apoptosis by regulating ubiquitination of RIPK1 and mRNA levels of c-FLIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 11944–11949.
- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K., and Shao, F. (2017b). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* 547, 99–103.
- Wehman, A.M., Poggioli, C., Schweinsberg, P., Grant, B.D., and Nance, J. (2011). The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Curr. Biol. CB* 21, 1951–1959.
- Weimershaus, M., Mauvais, F.-X., Saveanu, L., Adiko, C., Babbor, J., Abramova, A., Montealegre, S., Lawand, M., Evnouchidou, I., Huber, K.J., *et al.* (2018). Innate Immune Signals Induce Anterograde Endosome Transport Promoting MHC Class I Cross-Presentation. *Cell Rep.* 24, 3568–3581.
- West, M.A., Wallin, R.P.A., Matthews, S.P., Svensson, H.G., Zaru, R., Ljunggren, H.-G., Prescott, A.R., and Watts, C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305, 1153–1157.
- Whitney, P.G., Makhlof, C., MacLeod, B., Ma, J.Z., Gressier, E., Greyer, M., Hochheiser, K., Bachem, A., Zaid, A., Voehringer, D., *et al.* (2018). Effective Priming of Herpes Simplex Virus-Specific CD8+ T Cells In Vivo Does Not Require Infected Dendritic Cells. *J. Virol.* 92.
- Wiśniewski, J.R., Hein, M.Y., Cox, J., Mann, M., 2014. A “proteomic ruler” for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 3497–3506. doi:10.1074/mcp.M113.037309
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M., 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Meth* 6, 359–362. doi:10.1038/nmeth.1322
- Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864–869.

RÉFÉRENCES

- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* *458*, 172–177.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., and Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* *93*, 4225–4236.
- Wu, L., D’Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* *9*, 839–847.
- Wu, S.J., Niknafs, Y.S., Kim, S.H., Oravec-Wilson, K., Zajac, C., Toubai, T., Sun, Y., Prasad, J., Peltier, D., Fujiwara, H., *et al.* (2017). A Critical Analysis of the Role of SNARE Protein SEC22B in Antigen Cross-Presentation. *Cell Rep.* *19*, 2645–2656.
- Wu, X.-N., Yang, Z.-H., Wang, X.-K., Zhang, Y., Wan, H., Song, Y., Chen, X., Shao, J., and Han, J. (2014). Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death Differ.* *21*, 1709–1720.
- Xia, B., Fang, S., Chen, X., Hu, H., Chen, P., Wang, H., and Gao, Z. (2016). MLKL forms cation channels. *Cell Res.* *26*, 517–528.
- Xiao, J., Xia, H., Yoshino-Koh, K., Zhou, J., and Xu, Z. (2007). Structural characterization of the ATPase reaction cycle of endosomal AAA protein Vps4. *J. Mol. Biol.* *374*, 655–670.
- Xiao, J., Chen, X.-W., Davies, B.A., Saltiel, A.R., Katzmann, D.J., and Xu, Z. (2009). Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3514–3524.
- Xu, D., Jin, T., Zhu, H., Chen, H., Ofengeim, D., Zou, C., Mifflin, L., Pan, L., Amin, P., Li, W., *et al.* (2018). TBK1 Suppresses RIPK1-Driven Apoptosis and Inflammation during Development and in Aging. *Cell* *174*, 1477-1491.e19.
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., and Saito, T. (2008). Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat. Immunol.* *9*, 1179–1188.
- Yan, J., Parekh, V.V., Mendez-Fernandez, Y., Olivares-Villagómez, D., Dragovic, S., Hill, T., Roopenian, D.C., Joyce, S., and Van Kaer, L. (2006). In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J. Exp. Med.* *203*, 647–659.
- Yang, B., Stjepanovic, G., Shen, Q., Martin, A., and Hurley, J.H. (2015). Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 492–498.
- Yang, Z., Wang, Y., Zhang, Y., He, X., Zhong, C.-Q., Ni, H., Chen, X., Liang, Y., Wu, J., Zhao, S., *et al.* (2018). RIP3 targets pyruvate dehydrogenase complex to increase aerobic respiration in TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.* *20*, 186–197.
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., Green, D.R., Oberst, A., and Albert, M.L. (2015). RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8+ T cells. *Science* *350*, 328–334.
- Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* *162*, 71–84.
- Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., and Wallach, D. (2017). MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity* *47*, 51-65.e7.
- Yorikawa, C., Shibata, H., Waguri, S., Hatta, K., Horii, M., Katoh, K., Kobayashi, T., Uchiyama, Y., and Maki, M. (2005). Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem. J.* *387*, 17–26.
- Yuan, J., Amin, P., and Ofengeim, D. (2019). Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* *20*, 19–33.
- Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S.R., Popova, E., Palu, G., and Göttlinger, H. (2006). Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19140–19145.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Capuano, G., Collini, M., Caccia, M., Ronchi, A.E., Rocchetti, M., Mingozzi, F., Foti, M., Chirico, G., *et al.* (2009). CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* *460*, 264–268.

RÉFÉRENCES

- Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., Croker, B.A., Regev-Rudzki, N., Edry-Botzer, L., and Gerlic, M. (2017). Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS Biol.* *15*, e2002711.
- van der Zee, J., Urwin, H., Engelborghs, S., Bruyland, M., Vandenberghe, R., Dermaut, B., De Pooter, T., Peeters, K., Santens, P., De Deyn, P.P., *et al.* (2008). CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 313–322.
- Zehner, M., Chasan, A.I., Schuette, V., Embgenbroich, M., Quast, T., Kolanus, W., and Burgdorf, S. (2011). Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9933–9938.
- Zehner, M., Marschall, A.L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A.J., *et al.* (2015). The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells. *Immunity* *42*, 850–863.
- Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1615–1627.
- Zhang, X., Wang, W., Bedigian, A.V., Coughlin, M.L., Mitchison, T.J., Eggert, U.S., 2012. Dopamine receptor D3 regulates endocytic sorting by a Prazosin-sensitive interaction with the coatomer COPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 12485–12490. doi:10.1073/pnas.1207821109
- Zhang, T., Zhang, Y., Cui, M., Jin, L., Wang, Y., Lv, F., Liu, Y., Zheng, W., Shang, H., Zhang, J., *et al.* (2016). CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat. Med.* *22*, 175–182.
- Zhang, Y., Su, S.S., Zhao, S., Yang, Z., Zhong, C.-Q., Chen, X., Cai, Q., Yang, Z.-H., Huang, D., Wu, R., *et al.* (2017). RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nat. Commun.* *8*, 14329.
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., and Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* *28*, 9–21.
- Zhitomirsky, B., Yunaev, A., Kreiserman, R., Kaplan, A., Stark, M., Assaraf, Y.G., 2018. Lysosomotropic drugs activate TFEB via lysosomal membrane fluidization and consequent inhibition of mTORC1 activity. *Cell Death Dis* *9*, 1–15. doi:10.1038/s41419-018-1227-0
- Zhou, X., Pan, S., Sun, L., Corvera, J., Lee, Y.-C., Lin, S.-H., and Kuang, J. (2009). The CHMP4b- and Src-docking sites in the Bro1 domain are autoinhibited in the native state of Alix. *Biochem. J.* *418*, 277–284.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974a). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* *248*, 701–702.
- Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974b). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* *251*, 547–548.
- Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* *140*, 798–804.
- Zlokarnik, G., Negulescu, P.A., Knapp, T.E., Mere, L., Burres, N., Feng, L., Whitney, M., Roemer, K., Tsien, R.Y., 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* *279*, 84–88.
- Zou, L., Zhou, J., Zhang, J., Li, J., Liu, N., Chai, L., Li, N., Liu, T., Li, L., Xie, Z., *et al.* (2009). The GTPase Rab3b/3c-positive recycling vesicles are involved in cross-presentation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15801–15806.

ANNEXES



Regulation of Antigen Export to the Cytosol During Cross-Presentation

Marine Gros and Sebastian Amigorena*

INSERM U932, Institut Curie, Paris, France

Cross-priming refers to the induction of primary cytotoxic CD8⁺ T cell responses to antigens that are not expressed in antigen presenting cells (APCs) responsible for T cell priming. Cross-priming is achieved through cross-presentation of exogenous antigens derived from tumors, extracellular pathogens or infected neighboring cells on Major Histocompatibility Complex (MHC) class I molecules. Despite extensive research efforts to understand the intracellular pathways involved in antigen cross-presentation, certain critical steps remain elusive and controversial. Here we review recent advances on antigen cross-presentation, focusing on the mechanisms involved in antigen export to the cytosol, a crucial step of this pathway.

Keywords: dendritic cells, cross-presentation, cytosolic antigen export, ERAD, endosomal leakage

OPEN ACCESS

Edited by:

Diana Dudziak,
Universitätsklinikum Erlangen,
Germany

Reviewed by:

Marianne Boes,
Utrecht University, Netherlands
Margarita Del Val,
Spanish National Research Council
(CSIC), Spain

*Correspondence:

Sebastian Amigorena
sebastian.amigorena@curie.fr

Specialty section:

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

Received: 29 September 2018

Accepted: 09 January 2019

Published: 28 January 2019

Citation:

Gros M and Amigorena S (2019)
Regulation of Antigen Export to the
Cytosol During Cross-Presentation.
Front. Immunol. 10:41.
doi: 10.3389/fimmu.2019.00041

INTRODUCTION

Dendritic cells (DCs) play a central role in immune homeostasis by linking innate sensing to adaptive immune responses. After sampling antigens in peripheral tissues, DCs mature and migrate to lymph nodes, where they initiate adaptive immune responses by presenting processed antigens in the context of Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules to T cells. For a long time, the generally accepted paradigm supposed that exogenous antigens were exclusively presented *via* MHC-II molecules to CD4⁺ T cells, while endogenous cytosolic antigens, derived from self or foreign proteins, were loaded on MHC-I, thereby leading to naïve cytotoxic CD8⁺ T cell activation. Yet, this simple assumption failed to explain how cytotoxic immune responses could be mounted against pathogens that do not readily infect DCs. This apparent contradiction was resolved by the discovery of cross-presentation, a process enabling the delivery of exogenous antigens to the MHC-I pathway for cross-priming CD8⁺ cytotoxic T cell responses (1, 2). Since its first description over forty years ago, our understanding of the sequence of events governing antigen cross-priming has extensively increased, leading to the description of two main pathways of antigen cross-presentation, referred to as “vacuolar” and “cytosolic.” While the requirement for cross-presentation in the initiation of anti-tumor immune responses is now well established (3–7), its control and the precise intracellular routes involved remain incompletely understood and, for some parts, controversial.

Here, we review the most recent advances in the analysis of antigen cross-presentation in mouse (unless stated otherwise), with a particular emphasis on the advances in understanding of antigen export to the cytosol, a crucial, yet debated, step of the cytosolic pathway.

PATHWAYS FOR ANTIGEN CROSS-PRESENTATION

In 1976, seminal work by M. Bevan showed that exogenous antigens could be presented on MHC-I molecules and prime cytotoxic immune responses, thereby unearthing a novel antigen presentation pathway that he called cross-priming (1, 2). However, the molecular mechanisms underlying cross-priming and “cross-presentation” remained elusive until the early nineties.

At that time, several lines of evidence reported that cross-presentation of bacterial antigens [i.e., the 257-264 H-2K^b-restricted epitope of ovalbumin (OVA) fused to *E. coli* Crl protein] was resistant to proteasome inhibitors (8) (suggesting lysosomal processing of the corresponding peptides), unaffected by brefeldin A (BFA) treatment (8–10) [arguing against a critical role for endoplasmic reticulum (ER)-Golgi transport] and most of the time, occurred independently from TAP, the transporter mediating peptide import into the ER (8, 11). These observations led to the first description of the “vacuolar pathway.” After internalization, antigens remain confined in intracellular compartments, where they undergo lysosomal degradation, a process largely dependent on cathepsin S activity (12), and followed by loading onto post-Golgi MHC-I molecules.

Simultaneous studies with particulate, non-bacterial antigens (i.e., bead-bound OVA), showed that TAP1 deficiency in macrophages, as well as BFA treatment, abolished their ability to cross-present exogenous antigens, thereby suggesting that antigen-derived peptides must be transferred from the cytosol to the ER to bind newly synthesized MHC-I molecules (13). Additionally, cross-presentation was disrupted by proteasome inhibitors (13–16), consistent with a model in which antigens are delivered into the cytosol before proteasomal degradation and peptide import into the ER. This pathway, later termed the “cytosolic pathway,” implies the export of antigens from endocytic compartments to the cytosol. The first experimental evidence of this crucial step was provided by the use of geldonin, a membrane-impermeant toxin that inactivates ribosomes when transferred to the cytosol. Macrophages phagocytosing geldonin-coated beads displayed reduced protein synthesis, indicating export of bead-bound geldonin to the cytosol (13, 14).

The aforementioned pivotal studies used mouse macrophages as models of antigen-presenting cells (APCs). It later became clear that DCs, rather than macrophages, cross-present antigens and cross-prime cytotoxic immune responses efficiently (17, 18), by means of different properties of their phagocytic pathway, including lower degradation capacity (19). When considering DCs, these cells represent a series of ontogenically and functionally diverse populations. In mice, two main resident DC subsets are found in the spleen and lymph nodes, namely Batf3-dependent CD8⁺ XCR1⁺ DCs (DC1s) and IRF4-dependent CD8[−] CD11b⁺ DCs (DC2s) [reviewed in (20)]. At steady state, DC1s cross-present cell-associated antigens more efficiently than their DC2 counterparts, a capacity first attributed to their increased ability to capture this type of antigen (21, 22). Later experiments showed that higher cross-presentation efficacy in mouse DC1s is intrinsic and unrelated to the route of antigen uptake (23, 24), thus contrasting with the FcγR-dependent optimization of cross-presentation observed in human DC1s (25). In mouse, surface receptors, including Clec9A/DNGR-1 (26–29) or mannose receptor (MR) (30), were proposed to preferentially deliver antigens to the cross-presentation pathway, most likely through delaying delivery of their cargoes to late endosomal and lysosomal degradative compartments. DC1s also bear specialized endocytic properties that reduce/delay acidification and degradation of endocytic cargo (19, 31).

Consistent with these *in vitro* observations, mice deficient for DC1s (5), or displaying cross-presentation-defective DCs (4, 6), fail to mount cytotoxic immune responses against tumors and to control tumor development, even after treatment with checkpoint blockers. Although DC1s are best suited for cross-presentation both *in vitro* and *in vivo*, DC2s' ability to cross-present is increased by targeting antigens to DC2 specific receptors, such as FcγR (32) or DCIR2, in a stimulatory context (33), thus suggesting that both DC1 and DC2 are capable of cross-presenting antigens depending on the conditions.

The relative contributions of the cytosolic and vacuolar pathways to *in vivo* cross-presentation and cross-priming remain unclear. TAP dependency can potentially affect both pathways, as it impairs the exit of MHC-I molecules from the ER (34–37). Whether critical players in cross-presentation, such as Sec22b (4, 38, 39) or Rab43 (40), which are both required for effective cross-priming, are selectively involved in one or both pathways is unknown. The best available evidence for the cytosolic pathway being predominant in cross-priming comes from a study using mice defective for the immunoproteasome subunit LMP7. These mice show impaired cross-priming for an immunoproteasome-dependent H-Y epitope, supporting a critical role for proteasome-dependent processing, and therefore, for the cytosolic pathway *in vivo* (41). Since delivery of internalized antigens to the cytosol is very ineffective in most cell types, DCs might have developed specialized pathways to link these two subcellular compartments.

BIOLOGICAL PARAMETERS INFLUENCING ANTIGEN EXPORT TO THE CYTOSOL

Nature of Cytosolic Export-Competent Cells

By using geldonin activity or cytosolic fluorescence quantification as readouts, initial studies showed that inflammatory (14) or activated (16) mouse macrophages displayed a measurable ability to export bead-conjugated (14) or soluble (16) cargo into the cytosol. Further work revealed that soluble or complexed antigens also get access to the cytosol in steady-state bone-marrow derived DCs (BMDCs) or in a DC cell line, without prior activation (17, 18). Moreover, antigen export to the cytosol is more efficient in DCs than in macrophages, as illustrated by subcellular fractionation and subsequent western blotting (18). To assess whether DC subsets differ in their capacity to perform such transfer, Lin et al. developed a cytochrome c-based assay relying on the selective apoptosis of cells exporting exogenous cytochrome c into the cytosol (42). Only a fraction of DC1s showed susceptibility to cytochrome c-induced apoptosis, indicating a functional specialization for endosome to cytosol transport in these cells (42, 43). Notably, this cytochrome c-sensitive DC1 population strictly corresponds to the cohort of efficient cross-presenters, whereas cytochrome c-resistant DC1s cross-present antigens inefficiently and share other functional features with DC2s (42).

Nature of Antigens Exported to the Cytosol

Early microscopy observations showed that fluorescent (i.e., dextrans) or soluble (i.e., enzymatically active horseradish peroxidase: HRP) antigens gained access to the cytosol in DCs (17, 18). While 3–40 K dextrans are rapidly relocated to the cytosol, higher molecular mass dextrans (500–2,000 K) remain vacuolar (18), suggesting that antigen export to the cytosol is size-selective (18, 44). Particulate antigens, which are more efficiently cross-presented than soluble ones (14), often form large aggregates and therefore require dissociation before their translocation to the cytosol. Indeed, inhibition of vacuolar acidification abolishes the disaggregation of immune complexes and their subsequent cytosolic export (18), thus pointing to a crucial role of slightly acidic endo/phagosomal pH in this process. While some degree of degradation might favor antigen export to the cytosol due to the size-restriction of transported antigens (18), high proteolytic activity, favored by acidic pH, could destroy MHC-I-binding epitopes. In this regard, regulation of endocytic pH is of crucial importance. In DCs' endocytic compartments, incomplete assembly of v-ATPase proton pump together with Rab27a-dependent recruitment of NOX2 jointly lead to active alkalization of luminal pH (19, 45), thereby preserving antigens from detrimental excessive degradation (46).

Export to the Cytosol and DC Activation

Aside from putative intrinsic properties of DC1s, extrinsic signals, such as Toll-Like Receptor stimulation, influence antigen export to the cytosol. Indeed, short (3–5 h) lipopolysaccharide (LPS) stimulation of BMDCs increases the proportion of cells displaying exogenous HRP in their cytosol (47). A possible explanation for the observed LPS-mediated increase in antigen export may reside in the requirement for TRIF in this process (48). Until recently, absence of quantitative reliable antigen export assays based on endotoxin-free reagents impeded detailed analysis of the role of DC activation in antigen transport to the cytosol. Recently published export assays should overcome this limitation (49).

Kinetics of Antigen Export to the Cytosol in DCs

Kinetics studies showed that HRP appeared in BMDC cytosol only 15 min after internalization (17). Rapid egress suggests that antigens are exported from early endosomes (50), as supported by microscopy experiments (51) or by mathematical modeling (52). The latter predicts that 20 min after internalization, cytosolic export of yeast-derived antigen competes with degradation associated with maturation of the endocytic compartment. Thus, only a tiny fraction of, at least, non-complexed antigens released after this time point might contribute to cross-presentation. Cytosolic translocation of HRP immune complexes appears after 60 min, and reaches a plateau after 6 h (18). Similar findings were reported for cytosolic egress of antigens associated to beads (53, 54). Additionally, these two studies provided compelling evidence that ER-mediated delivery of MHC-I loading machinery to the phagosome rendered this compartment competent for cross-presentation (55) following TAP-mediated import of cytosolic peptides (53, 54). While the relative contributions of ER

and plasma membrane to the formation of cross-presentation-competent phagosomes remain debated (39, 56), Houde et al. postulated that an ER transporter, Sec61, might be involved in the translocation of antigens from the phagosomal lumen to the cytosol (53). This hypothesis was later experimentally supported by several studies detailed in the next section.

MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIGEN EXPORT TO THE CYTOSOL

ERAD Transporter-Dependent Hypothesis

Existence of a transporter mediating antigen export to the cytosol naturally imposes conformational constraints on the translocated antigen. Indeed, antigens are unlikely to be transported in their native structure, considering the narrow diameter of known transporter pores, and are therefore expected to undergo an unfolding step before translocation. Supporting this idea, fixed OVA is less efficiently translocated into the cytosol than structurally flexible one (57). Moreover, during unfolding, reduction of disulfide bonds by GILT, a phagolysosomal thiol reductase constitutively expressed in APCs, is essential for cytosolic export of viral disulfide-rich antigens and subsequent cross-presentation (58) (**Figure 1**, left panel).

Although the requirement for protein unfolding suggests that antigens gain access to the cytosol through a transporter, the nature of the channel mediating this process remains controversial. Studies attempting to answer this question reported interactions between unfolded OVA and members of the ER-associated degradation (ERAD) machinery in ER-associated compartments (59), consistent with previous findings (53, 54). This observation led to the hypothesis that the ERAD machinery, mediating retro-translocation of misfolded proteins from the ER lumen to the cytosol, potentially through the trimeric Sec61 channel, could also operate from endocytic compartments during cross-presentation. The first functional insights into ERAD contributions to antigen export to the cytosol, came from studies using exotoxin A (ExoA), a bacterial toxin binding to the cytosolic N-terminal domain of Sec61 α , and resulting in channel closure (60, 61). ExoA treatment reversed the ICP47-mediated inhibition of TAP, the latter resulting from the translocation of exogenously delivered ICP47 to the cytosol and its subsequent interaction with the cytosolic side of TAP (62). This finding, associated with the observed decrease in OVA cross-presentation following ExoA treatment (62, 63) or siRNA-mediated silencing of Sec61 (48, 59), strongly pointed to Sec61 being the channel controlling antigen export to the cytosol (**Figure 1**, left panel). In line with this hypothesis, the expression of the Sec61 α , β and γ subunits is increased in DC1s, as compared to DC2s, correlating with their specific cross-presenting ability (64).

However, it has been extremely difficult to address the precise contribution of Sec61 in antigen cross-presentation and retrotranslocation from endo/phagosomes, as this channel also mediates co-translational import of proteins, including MHC-I, into the ER. To shed some light on this issue, Zehner et al. used an intrabody-based approach aiming to retain Sec61 in the ER and thereby prevent its recruitment to endocytic

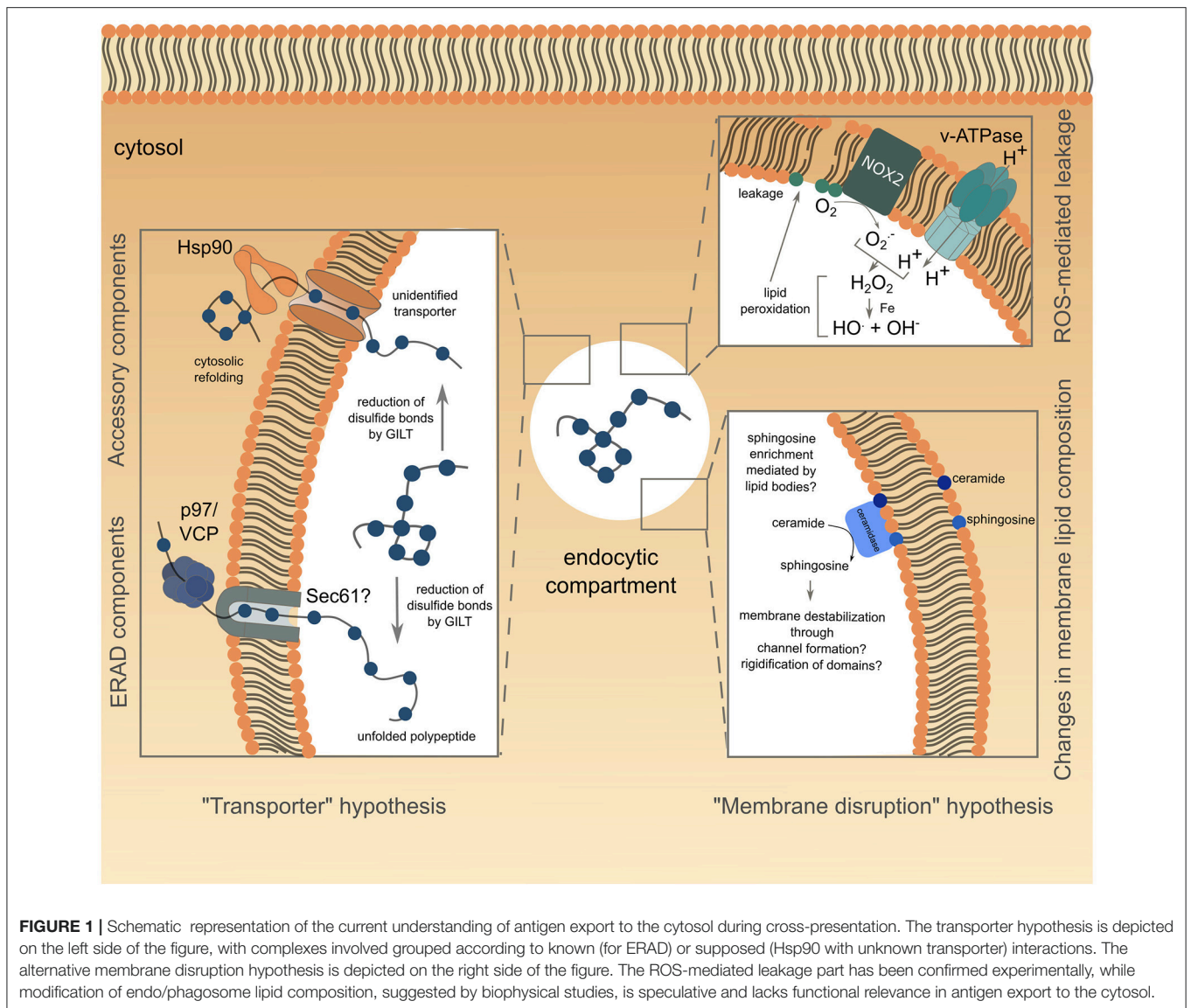


FIGURE 1 | Schematic representation of the current understanding of antigen export to the cytosol during cross-presentation. The transporter hypothesis is depicted on the left side of the figure, with complexes involved grouped according to known (for ERAD) or supposed (Hsp90 with unknown transporter) interactions. The alternative membrane disruption hypothesis is depicted on the right side of the figure. The ROS-mediated leakage part has been confirmed experimentally, while modification of endo/phagosome lipid composition, suggested by biophysical studies, is speculative and lacks functional relevance in antigen export to the cytosol.

compartments (48). Expression of the anti-Sec61 intrabody in BMDCs impairs antigen export to the cytosol and OVA cross-presentation, consistent with a role for Sec61 outside the ER, possibly in endosomes. Still, the involvement of Sec61 itself in ERAD-dependent retrotranslocation remains unclear and fraught with technical issues [reviewed in (65)]. Additionally, recent work has shown that sustained inhibition of Sec61 with a specific toxin, mycolactone, has no effect on antigen export to the cytosol, and indirectly reduces OVA cross-presentation through downregulation of other players in the pathway, including MHC-I (66). While Sec61 involvement in cytosolic antigen translocation needs further clarification, other ERAD components, such as Hrd1 and Derlin-1, might be alternative candidates.

Hrd1, an ER-resident ubiquitin ligase tagging ERAD substrates, exhibits six transmembrane domains, which is enough to form a channel (67, 68). siRNA-mediated depletion of

Hrd1 in DCs results in decreased antigen export to the cytosol and cross-presentation, as well as impaired MHC-II presentation (48). These alterations in antigen presentation pathways might be caused by Hrd1 silencing-mediated ER stress and therefore require further investigation. On the other hand, the protease Derlin-1 (Der1), comprising four transmembrane domains, cannot form a channel but could possibly function as an accessory subunit of the export channel (69) by trapping ERAD substrates and rerouting them for cytosolic degradation (70). Yet, antigen cross-presentation is not perturbed by Der1 silencing in both murine BMDCs (48) and human monocyte-derived DCs (71), thus excluding a putative role for Der1 in antigen export to the cytosol.

To date, the best evidence available suggests that ERAD might control antigen transfer to the cytosol through the activity of the AAA ATPase p97. P97 forms a hexameric ring and is thought to provide the energy necessary for passage of proteins through

the retrotranslocating channel (72). Exogenous addition of p97 to isolated phagosomes loaded with luciferase leads to luciferase release, whereas addition of a dominant negative version of p97 fails to do so (62), suggesting a role for the ATPase in antigen translocation from phagosomes (**Figure 1**, left panel). Along the same lines, human and mouse DCs silenced for p97 (59, 71) or expressing a dominant negative form of p97 (62), display impaired cross-presentation of MelanA and OVA antigens, respectively, whereas p97 overexpression enhances this pathway (73). P97 is recruited to endosomes following mannose receptor (MR)-poly-ubiquitination. This post-translational modification proves to be crucial for antigen export to the cytosol and OVA cross-presentation as expression of a mono-ubiquitinated form of the MR is sufficient to reduce both processes (73). Of note, MR poly-ubiquitination is triggered by OVA binding to the receptor, and is negatively regulated by the ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)-I protein TSG-101 (73).

Several studies investigating the role of p97 in antigen export to the cytosol used the luciferase enzyme to monitor this intracellular event (62, 74). Following unfolding in endocytic compartments and subsequent translocation into the cytosol, luciferase would need to be refolded to exert its functionality, a process likely mediated by the chaperone Hsp90. Indeed, cytosolic refolding of exogenous unfolded luciferase is compromised in Hsp90 β -silenced human DCs or in DCs treated with the Hsp90 inhibitor radicicol (74). Furthermore, Hsp90 α deficiency not only inhibits cross-presentation in mouse BMDCs, but also decreases cytosolic translocation of OVA, therefore implying that Hsp90 itself could mediate antigen transport to the cytosol (43, 57). Additionally, Hsp90 could protect the exported antigens from premature cytosolic degradation, before Hsp70-mediated targeting to the proteasome (57) (**Figure 1**, left panel).

The “transporter hypothesis” has, so far, garnered the most experimental support, as the main conduit for antigen export. However, it still raises important questions. Given the high degree of substrate selectivity during ERAD [reviewed in (65)], the use of a unique transporter translocating a wide variety of antigens seems unlikely. Moreover, this hypothesis fails to explain how large, non-protein molecules, such as dextrans, can be transferred to the cytosol in absence of ubiquitination, the latter being a prerequisite for ERAD-mediated translocation. Altogether, these observations do not exclude a role for ERAD in antigen export to the cytosol, but rather suggest the contribution of additional mechanisms.

Alternative Hypothesis: Rupture of the Antigen-Containing Compartment

The first descriptions of the cytosolic pathway for cross-presentation supposed that antigens could escape endocytic compartments through membrane rupture. This hypothesis, at that time termed “indigestion model,” relies on the observation that large particles are more efficiently cross-presented than small ones, and could thus be responsible for phagosomal overload, leading to membrane disruption and efficient antigen leakage to the cytosol (14). Despite intensive use of this pathway for cytosolic delivery of antibodies or bioactive proteins

conjugated with endosomolytic peptides (75–77), evidence of its contribution to cross-presentation were lacking, until recently.

ROS, Lipid Peroxidation, and Membrane Rupture

A recent study showed that following LPS stimulation, VAMP8-dependent NOX2 recruitment to BMDC endosomes resulted in Reactive Oxygen Species (ROS) production and subsequent endosomal lipid peroxidation (78, 79). This alteration of lipid structure disrupts endosomal membrane integrity, leading to antigen escape to the cytosol and OVA cross-presentation (78) (**Figure 1**, upper right panel). Interestingly, ROS production in endocytic compartments is intrinsically linked to cells’ cross-presenting ability. Indeed, DCs show sustained and stronger ROS production than macrophages (19), the latter subset increasing phagosomal ROS production, as well as cross-presentation, only after activation (17, 19). Moreover, ROS generation is higher in DC1 than in DC2 phagosomes, thereby correlating with the enhanced ability of DC1s to cross-present antigens (31). Biophysical studies provided mechanistic insights into lipid peroxidation-dependent membrane rupture. Oxidized lipid-rich artificial bilayers show higher water permeability (80), as well as increased membrane curvature, associated with micellization and membrane destabilization (81).

Changes in Endolysosomal Membrane Lipid Composition

Aside from lipid peroxidation, enrichment in ceramide, and to a greater extent in sphingosine, also triggers membrane permeability to solutes (82). While some studies proposed that sphingosine-based lipids could form large channels in membranes through an “all or none” mechanism (83), others suggested that sphingolipids actually promote membrane permeabilization by a graded process involving rigidification of membrane domains and subsequent creation of local structural defects (82, 84) (**Figure 1**, lower right panel). Sphingosine synthesis results from ceramide deacetylation by two ceramidases, encoded by the *Asah1* and *Asah2* genes, and respectively functioning at acid or neutral pH. Notably, the expression of both enzymes is higher in DC1s than in DC2s (immgen.org), suggesting that ceramide conversion into membrane-disrupting sphingosine could be increased in DC1 endocytic compartments. This DC1-specific enrichment in sphingosine could possibly be mediated by lipid bodies, which have also been proposed to destabilize some ER or phagosomal membrane domains during their formation, thereby causing leakage of the content of these compartments (85). Along the same line, BMDCs deficient for *Igtp*, a GTPase controlling accumulation of lipid bodies, show a selective defect for cross-presentation (86). Moreover, intracellular accumulation of lipid droplets correlates with cross-presentation efficiency, as DC1s display significantly higher amounts of these organelles than DC2s (86). However, pharmacological interference with lipid body formation fails to influence antigen export to the cytosol in the context of saponin adjuvant-based cross-presentation (87). Thus, the precise role of lipid bodies in cross-presentation and cytosolic antigen leakage remains to be specified.

Compensatory Mechanisms for Endocytic Membrane Rupture

Although several lines of evidence point to a contribution of endocytic membrane disruption and subsequent antigen leakage into the cytosol, this model has been repeatedly dismissed owing to its presumable lack of regulation and ensuing cell toxicity. Indeed, links between endocytic leakage and cell death were reported in different systems. Silica crystal-dependent phagosomal rupture, for example, leads to cytosolic release of intraluminal cathepsin B, which in turn activates the NLRP3 inflammasome, resulting in pyroptosis (88). Hydroxychloroquine-mediated cathepsin release from lysosomes can also trigger caspase activation and apoptosis (89), suggesting a requirement for control mechanisms to contain damaging consequences of leakage.

In this regard, the ESCRT machinery, formerly known for its key role in viral budding or cytokinetic abscission (90, 91), was recently identified as a core component of biological membrane repair following damage (92–96). A role for the ESCRT-I protein TSG101 in antigen export to the cytosol and cross-presentation has been previously suggested (73). However, increased cytosolic export observed following TSG101 silencing had been attributed to TSG101-dependent inhibition of MR poly-ubiquitination, required for cytosolic antigen translocation. Yet, considering the dispensable role of ubiquitination in antigen export to the cytosol (43) and the fact that TSG101 is also required for ESCRT-III-mediated repair of endolysosomal membranes (95, 96), defects in endocytic membrane repair, concomitant with TSG101 depletion, may have also contributed to the observed increased export phenotype (73). Yet, the possible involvement of ESCRT-III in controlling antigen export to the cytosol has not been investigated so far.

REFERENCES

1. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med.* (1976) 143:1283–8.
2. Bevan MJ. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during *in vivo* priming. *J Immunol.* (1976) 117:2233–8.
3. Sharma MD, Rodriguez PC, Koehn BH, Baban B, Cui Y, Guo G, et al. Activation of p53 in immature myeloid precursor cells controls differentiation into Ly6c+CD103+ monocytic antigen-presenting cells in tumors. *Immunity* (2018) 48:91–106.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.12.014
4. Alloatti A, Rookhuizen DC, Joannas L, Carpier J-M, Iborra S, Magalhaes JG, et al. Critical role for Sec22b-dependent antigen cross-presentation in antitumor immunity. *J Exp Med.* (2017) 214:2231–41. doi: 10.1084/jem.20170229
5. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* (2008) 322:1097–100. doi: 10.1126/science.1164206
6. Theisen DJ, Davidson JT, Briseño CG, Gargaro M, Lauron EJ, Wang Q, et al. WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science* (2018) 362:694–9. doi: 10.1126/science.aat5030
7. Roberts EW, Broz ML, Binnewies M, Headley MB, Nelson AE, Wolf DM, et al. Critical role for CD103(+)/CD141(+) dendritic cells bearing CCR7 for tumor antigen trafficking and priming of T cell immunity in melanoma. *Cancer Cell* (2016) 30:324–36. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.003

CONCLUSION

Identification of several critical players in antigen cross-presentation, such as Sec22b (4), or Rab43 (40), and their subsequent validation in conditional knock-out mouse pre-clinical models established a major role for this pathway in different types of immune responses, including anti-tumor immune responses. Yet, the way antigens gain access to the cytosol during cross-presentation is far from being entirely resolved. Export to the cytosol is not only the last event in the pathway that remains largely obscure, but it is also a rate-limiting step in the process (52, 97). Identifying the molecular mechanism involved will certainly provide relevant targets to manipulate antigen cross-presentation for vaccination and immunotherapy purposes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG and SA designed, prepared and wrote the manuscript.

FUNDING

MG is supported by a Fondation pour la Recherche Médicale grant (grant No. FDT201805005336). MG and SA are supported by ANR-10-IDEX-0001-02 PSL*, ANR-11-LABX-0043 grants, and ERC grant 2013-AdG No. 340046 DCBIOX.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Philippe Benaroch and Dr. Marianne Burbage for critical reading and feedback on the manuscript. This work benefitted from data assembled by the Immgen consortium.

8. Song R, Harding CV. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol.* (1996) 156:4182–90.
9. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* (1993) 361:359–62. doi: 10.1038/361359a0
10. Harding CV, Song R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol.* (1994) 153:4925–33.
11. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, et al. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol.* (2006) 177:3525–33. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.3525
12. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation *in vivo*. *Immunity* (2004) 21:155–65. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.004
13. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* (1995) 267:243–6.
14. Reis e Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med.* (1995) 182:841–51.
15. Oh YK, Harding CV, Swanson JA. The efficiency of antigen delivery from macrophage phagosomes into cytoplasm for MHC class I-restricted antigen presentation. *Vaccine* (1997) 15:511–8.

16. Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, Watts C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* (1995) 3:783–91.
17. Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* (1997) 27:280–8. doi: 10.1002/eji.1830270141
18. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol.* (1999) 1:362–8. doi: 10.1038/14058
19. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during cross-presentation by dendritic cells. *Cell* (2006) 126:205–18. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.035
20. Williams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* (2014) 14:571–8. doi: 10.1038/nri3712
21. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and *in vivo*. *J Exp Med.* (2002) 195:1289–302. doi: 10.1084/jem.20020161
22. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*. *J Exp Med.* (2000) 192:1685–96. doi: 10.1084/jem.192.12.1685
23. Schnorrer P, Behrens GMN, Wilson NS, Pooley JL, Smith CM, El-Sukkari D, et al. The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2006) 103:10729–34. doi: 10.1073/pnas.0601956103
24. Pooley JL, Heath WR, Shortman K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol.* (2001) 166:5327–30. doi: 10.4049/jimmunol.166.9.5327
25. Flinsenberg TWH, Compeer EB, Koning D, Klein M, Amelung FJ, van Baarle D, et al. Fcγ receptor antigen targeting potentiates cross-presentation by human blood and lymphoid tissue BDCA-3+ dendritic cells. *Blood* (2012) 120:5163–72. doi: 10.1182/blood-2012-06-434498
26. Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanč P, Kjær S, Feest C, et al. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNDR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* (2012) 36:635–45. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.008
27. Hanč P, Fujii T, Iborra S, Yamada Y, Huotari J, Schulz O, et al. Structure of the complex of F-Actin and DNDR-1, a C-type lectin receptor involved in dendritic cell cross-presentation of dead cell-associated antigens. *Immunity* (2015) 42:839–49. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.009
28. Zelenay S, Keller AM, Whitney PG, Schraml BU, Deddouche S, Rogers NC, et al. The dendritic cell receptor DNDR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest.* (2012) 122:1615–27. doi: 10.1172/JCI60644
29. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martínez D, Hernanz-Falcón P, et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* (2009) 458:899–903. doi: 10.1038/nature07750
30. Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* (2007) 316:612–6. doi: 10.1126/science.1137971
31. Savina A, Peres A, Cebrían I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, et al. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen cross-presentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* (2009) 30:544–55. doi: 10.1016/j.immuni.2009.01.013
32. den Haan JMM, Bevan MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med.* (2002) 196:817–27. doi: 10.1084/jem.20020295
33. Neubert K, Lehmann CHK, Heger L, Baranska A, Staedtler AM, Buchholz VR, et al. Antigen delivery to CD11c+CD8- dendritic cells induces protective immune responses against experimental melanoma in mice *in vivo*. *J Immunol.* (2014) 192:5830–8. doi: 10.4049/jimmunol.1300975
34. Chefalo PJ, Grandea AG, Van Kaer L, Harding CV. Tapasin-/- and TAP1-/- macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *J Immunol.* (2003) 170:5825–33. doi: 10.4049/jimmunol.170.12.5825
35. Day PM, Esquivel F, Lukszo J, Bennink JR, Yewdell JW. Effect of TAP on the generation and intracellular trafficking of peptide-receptive major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* (1995) 2: 137–47.
36. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4–8+ T cells. *Cell* (1992) 71:1205–14.
37. Merzougui N, Kratzer R, Saveanu L, van Endert P. A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep.* (2011) 12:1257–64. doi: 10.1038/embor.2011.203
38. Cebrían I, Visentin G, Blanchard N, Jouve M, Bobard A, Moita C, et al. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen cross-presentation by dendritic cells. *Cell* (2011) 147:1355–68. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.021
39. Nair-Gupta P, Baccharini A, Tung N, Seyffner F, Florey O, Huang Y, et al. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* (2014) 158:506–21. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.054
40. Kretzer NM, Theisen DJ, Tussiwand R, Briseño CG, Grajales-Reyes GE, Wu X, et al. RAB43 facilitates cross-presentation of cell-associated antigens by CD8α+ dendritic cells. *J Exp Med.* (2016) 213:2871–83. doi: 10.1084/jem.20160597
41. Palmowski MJ, Gileadi U, Salio M, Gallimore A, Millrain M, James E, et al. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J Immunol.* (2006) 177:983–90. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.983
42. Lin ML, Zhan Y, Proietto AI, Prato S, Wu L, Heath WR, et al. Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2008) 105:3029–34. doi: 10.1073/pnas.0712394105
43. Imai T, Kato Y, Kajiwaru C, Mizukami S, Ishige I, Ichiyanagi T, et al. Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108:16363–8. doi: 10.1073/pnas.1108372108
44. Mant A, Chinnery F, Elliott T, Williams AP. The pathway of cross-presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology* (2012) 136:163–75. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03558.x
45. Jancic C, Savina A, Wasmeier A, Tolmachova T, El-Benna J, Dang PM-C, et al. Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol.* (2007) 9:367–78. doi: 10.1038/ncb1552
46. Accapezzato D, Visco V, Francavilla V, Molette C, Donato T, Paroli M, et al. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens *in vivo*. *J Exp Med.* (2005) 202:817–28. doi: 10.1084/jem.20051106
47. Gil-Torregrosa BC, Lennon-Duménil AM, Kessler B, Guermonprez P, Ploegh HL, Fruci D, et al. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* (2004) 34:398–407. doi: 10.1002/eji.200324508
48. Zehner M, Marschall AL, Bos E, Schloetel J-G, Kreer C, Fehrenschild D, et al. The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells. *Immunity* (2015) 42:850–63. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.008
49. Lu Q, Grotzke JE, Cresswell P. A novel probe to assess cytosolic entry of exogenous proteins. *Nat Commun* (2018) 9:3104. doi: 10.1038/s41467-018-05556-z
50. Burgdorf S, Schölz C, Kautz A, Tampé R, Kurts C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol.* (2008) 9:558–66. doi: 10.1038/ni.1601
51. Hotta C, Fujimaki H, Yoshinari M, Nakazawa M, Minami M. The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* (2006) 117:97–107. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02270.x
52. Howland SW, Wittrup KD. Antigen release kinetics in the phagosome are critical to cross-presentation efficiency. *J Immunol.* (2008) 180:1576–83. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1576
53. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* (2003) 425:402–6. doi: 10.1038/nature01912
54. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I

- cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* (2003) 425:397–402. doi: 10.1038/nature01911
55. Gagnon E, Ducloux S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, et al. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* (2002) 110:119–31. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00797-3
 56. Touret N, Paroutis P, Terebiznik M, Harrison RE, Trombetta S, Pypaert M, et al. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* (2005) 123:157–70. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.018
 57. Kato Y, Kajiwara C, Ishige I, Mizukami S, Yamazaki C, Eikawa S, et al. HSP70 and HSP90 differentially regulate translocation of extracellular antigen to the cytosol for cross-presentation. *Autoimmune Dis.* (2012) 2012:745962. doi: 10.1155/2012/745962
 58. Singh R, Cresswell P. Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science* (2010) 328:1394–8. doi: 10.1126/science.1189176
 59. Imai J, Hasegawa H, Maruya M, Koyasu S, Yahara I. Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol.* (2005) 17:45–53. doi: 10.1093/intimm/dxh184
 60. Schäuble N, Cavalié A, Zimmermann R, Jung M. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A with the human Sec61 complex suppresses passive calcium efflux from the endoplasmic reticulum. *Channels Austin Tex.* (2014) 8:76–83. doi: 10.4161/chan.26526
 61. Koopmann JO, Albring J, Hüter E, Bulbuc N, Spee P, Neefjes J, et al. Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* (2000) 13:117–27. doi: 10.1016/S1074-7613(00)00013-3
 62. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* (2006) 25:607–17. doi: 10.1016/j.immuni.2006.08.017
 63. Goldszmid RS, Coppens I, Lev A, Caspar P, Mellman I, Sher A. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med.* (2009) 206:399–410. doi: 10.1084/jem.20082108
 64. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumppfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science* (2007) 315:107–11. doi: 10.1126/science.1136080
 65. Römisch K. A case for Sec61 channel involvement in ERAD. *Trends Biochem Sci.* (2017) 42:171–9. doi: 10.1016/j.tibs.2016.10.005
 66. Grotzke JE, Kozik P, Morel J-D, Impens F, Pietrosemoli N, Cresswell P, et al. Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:E5910–19. doi: 10.1073/pnas.1705242114
 67. Schoebel S, Mi W, Stein A, Ovchinnikov S, Pavlovic R, DiMaio F, et al. Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature* (2017) 548:352–5. doi: 10.1038/nature23314
 68. Stein A, Ruggiano A, Carvalho P, Rapoport TA. Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components. *Cell* (2014) 158:1375–88. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.050
 69. Mehnert M, Sommer T, Jarosch E. Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane. *Nat Cell Biol.* (2014) 16:77–86. doi: 10.1038/ncb2882
 70. Kadowaki H, Satrimafitrah P, Takami Y, Nishitoh H. Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1. *Sci Rep.* (2018) 8:7317. doi: 10.1038/s41598-018-25724-x
 71. Ménager J, Ebstein F, Oger R, Hulin P, Nedellec S, Duverger E, et al. Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1. *PLoS ONE* (2014) 9:e89897. doi: 10.1371/journal.pone.0089897
 72. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol.* (2003) 162:71–84. doi: 10.1083/jcb.200302169
 73. Zehner M, Chasan AI, Schuette V, Embgenbroich M, Quast T, Kolanus W, et al. Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108:9933–8. doi: 10.1073/pnas.1102397108
 74. Giodini A, Cresswell P. Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *EMBO J.* (2008) 27:201–11. doi: 10.1038/sj.emboj.7601941
 75. Akishiba M, Takeuchi T, Kawaguchi Y, Sakamoto K, Yu H-H, Nakase I, et al. Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat Chem.* (2017) 9:751–61. doi: 10.1038/nchem.2779
 76. El-Sayed A, Futaki S, Harashima H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J.* (2009) 11:13–22. doi: 10.1208/s12248-008-9071-2
 77. Li M, Tao Y, Shu Y, LaRochelle JR, Steinauer A, Thompson D, et al. Discovery and characterization of a peptide that enhances endosomal escape of delivered proteins *in vitro* and *in vivo*. *J Am Chem Soc.* (2015) 137:14084–93. doi: 10.1021/jacs.5b05694
 78. Dingjan I, Verboogen DR, Paardekooper LM, Revelo NH, Sittig SP, Visser LJ, et al. Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Sci Rep.* (2016) 6:22064. doi: 10.1038/srep22064
 79. Dingjan I, Paardekooper LM, Verboogen DRJ, von Mollard GF, Ter Beest M, van den Bogaart G. VAMP8-mediated NOX2 recruitment to endosomes is necessary for antigen release. *Eur J Cell Biol.* (2017) 96:705–14. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.06.007
 80. Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang I-M, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J.* (2007) 93:4225–36. doi: 10.1529/biophysj.107.112565
 81. Agmon E, Solon J, Bassereau P, Stockwell BR. Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Sci Rep.* (2018) 8:5155. doi: 10.1038/s41598-018-23408-0
 82. Contreras F-X, Sot J, Alonso A, Goñi FM. Sphingosine increases the permeability of model and cell membranes. *Biophys J.* (2006) 90:4085–92. doi: 10.1529/biophysj.105.076471
 83. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biol Chem.* (2002) 277:26796–803. doi: 10.1074/jbc.M200754200
 84. Jiménez-Rojo N, Sot J, Viguera AR, Collado MI, Torrecillas A, Gómez-Fernández JC, et al. Membrane permeabilization induced by sphingosine: effect of negatively charged lipids. *Biophys J.* (2014) 106:2577–84. doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.038
 85. Ploegh HL. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* (2007) 448:435–8. doi: 10.1038/nature06004
 86. Bougnères L, Helft J, Tiwari S, Vargas P, Chang BH-J, Chan L, et al. A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* (2009) 31:232–44. doi: 10.1016/j.immuni.2009.06.022
 87. den Brok MH, Büll C, Wassink M, de Graaf AM, Wagenaars JA, Minderman M, et al. Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nat Commun.* (2016) 7:13324. doi: 10.1038/ncomms13324
 88. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* (2008) 9:847–56. doi: 10.1038/ni.1631
 89. Boya P, Gonzalez-Polo R-A, Poncet D, Andreau K, Vieira HLA, Roumier T, et al. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* (2003) 22:3927–36. doi: 10.1038/sj.onc.1206622
 90. Carlton JG, Caballe A, Agromayor M, Kloc M, Martin-Serrano J. ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science* (2012) 336:220–5. doi: 10.1126/science.1217180
 91. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* (2001) 107:55–65. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00506-2

92. Olmos Y, Hodgson L, Mantell J, Verkade P, Carlton JG. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* (2015) 522:236–9. doi: 10.1038/nature14503
93. Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, Wegner CS, Schultz SW, Christ L, et al. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* (2015) 522:231–5. doi: 10.1038/nature14408
94. Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* (2014) 343:1247136. doi: 10.1126/science.1247136
95. Skowyra ML, Schlesinger PH, Naismith TV, Hanson PI. Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science* (2018) 360:eaar5078. doi: 10.1126/science.aar5078
96. Radulovic M, Schink KO, Wenzel EM, Nähse V, Bongiovanni A, Lafont F, et al. ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *EMBO J.* (2018) 37:e99753. doi: 10.15252/embj.201899753
97. Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* (1988) 54:777–85.

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

Copyright © 2019 Gros and Amigorena. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CROSS-PRESENTATION

Translate less, prime better, to improve anti-tumor responses

The N⁶-methyladenosine (m⁶A) RNA-modification pathway affects numerous aspects of immune responses. A new study now demonstrates that m⁶A modification of transcripts encoding lysosomal proteases limits the efficiency of tumor-antigen cross-presentation.

Marianne Burbage, Marine Gros and Sebastian Amigorena

Only a minority of cellular proteins are exposed on the surface of cells. T cells monitor intracellular fate, including intracellular infection or transformation, for example, through the presentation of protein-derived peptides associated with major histocompatibility complex (MHC) molecules. These peptides, of precise lengths, are generated intracellularly by controlled proteolysis, and the mechanisms that regulate this process are critical to the homeostasis and function of the immune system. In a study published in *Nature*, Han et al. now describe a previously overlooked mechanism for the regulation of antigen degradation with direct consequences for antigen cross-presentation and anti-tumor immune responses¹.

The authors show that control of the N⁶ methylation of adenosine residues (m⁶A) in mRNA, the most frequent mRNA modification, controls lysosomal functions. Genetic ablation of the m⁶A 'reader' YTHDF1 in mice leads to improved tumor control associated with increased infiltration of the tumor by T cells, while the presence of myeloid-derived suppressor cells is reduced. The increased anti-tumor immune responses in YTHDF1-deficient mice correlate with improved ability of conventional dendritic cells (cDCs) to cross-present antigens and prime T cells. By analyzing YTHDF1-binding sites on RNA, m⁶A profiles and translation speed in wild-type and YTHDF1-deficient cDCs, the authors show that YTHDF1 accelerates the translation of a select set of genes, including genes encoding molecules involved in lysosomal degradation and phagosome maturation. Thus, YTHDF1-deficient cDCs have lower expression of cathepsins, at the protein level, than that of their wild-type counterparts (Fig. 1). Consistent with the known role of antigen cross-presentation in the therapeutic effect of immunotherapy with checkpoint inhibitors, tumor rejection after treatment with antibody to the checkpoint inhibitor

PD-L1 is improved in YTHDF1-deficient mice, compared with that in their wild-type littermates that received the same treatment.

m⁶A is a broadly distributed RNA modification present on approximately 25% of mammalian mRNAs. It is deposited co-transcriptionally by 'writers' (such as METTL3) and can be bound by 'readers' (such as YTHDF1, YTHDF2 and YTHDF3) and removed by 'erasers' (ALKBH5)². Deposited predominantly near stop codons and 3' untranslated regions, m⁶A has been associated with the regulation of mRNA stability and translation efficiency. Interestingly, although some controversy remains as to their precise roles, distinct functions have been described for the closely related readers YTHDF1, YTHDF2 and YTHDF3. In particular, the binding of YTHDF1 to mRNA has been proposed to improve translation by increasing the delivery of mRNA to translation complexes or by directly facilitating translation initiation³. In contrast, the binding of YTHDF2 to m⁶A is associated with increased degradation of mRNA through the targeting of mRNA from the translatable pool to degradation complexes². While further molecular characterization is needed for full delineation of the molecular participants involved in the deposition of m⁶A and its role in mRNA biology, loss-of-function studies have started to shed light on its importance during multiple physiological processes.

In the immune system, deletion of the writer MTTL3 or its partner MTTL14 in all T cells (via Cre recombinase expressed from the T cell-specific *Cd4* promoter) leads to impaired homeostatic proliferation and differentiation, associated with increased expression of genes encoding the SOCS family of signaling inhibitors and thus to reduced sensitivity to the cytokine IL-7⁴. After viral infection, deletion of the writer MTTL3 or the reader YTHDF2 leads to substantial increases in the

induction of interferon-stimulated genes due to stabilization of mRNA encoding interferon- β ⁴. Interestingly, loss of YTHDF1 in mice causes impaired hippocampus-dependent spatial learning and memory due to loss of neuronal-transmission-induced stimulation of translation⁵. Han et al. highlight a similar mechanism in DCs whereby deletion of YTHDF1 in DCs leads to a reduction in the rate of translation of genes encoding molecules involved in antigen processing¹.

The aforementioned findings of Han et al.¹ add to a growing body of publications showing that cross-presentation of tumor antigens by type 1 cDCs (cDC1s) that is dependent on the transcription factor Batf3 has a crucial role in anti-tumor immune responses. Initial insights were provided by the study of Batf3-deficient mice, which lack both resident CD8⁺ cDC1s and migratory CD103⁺ cDC1s. Contrary to their wild-type counterparts, Batf3-deficient mice show impaired cytotoxic T cell responses and subsequently fail to control tumor growth, even in presence of checkpoint inhibitors⁶. Subsequent work, however, has shown that the absence of cDC1s impairs immune responses to tumors through multiple mechanisms, not simply through antigen cross-presentation⁷. Studies of new mouse models in which the cross-presenting ability of cDC1s is specifically targeted without perturbation of cDC1 development (such as *Sec22b*^{fl/fl} CD11c-Cre⁺ mice or *Wdfy4*^{-/-} mice) have confirmed the absolute requirement for cDC1-mediated cross-presentation in anti-tumor immunity^{6,8}.

Cross-presentation can be achieved through two main pathways that are referred to as 'vacuolar' and 'cytosolic' and notably differ by the intracellular location of antigen processing and subsequent loading on MHC class I molecules. In the vacuolar pathway, the degradation of antigens and their loading onto MHC class I molecules occur in

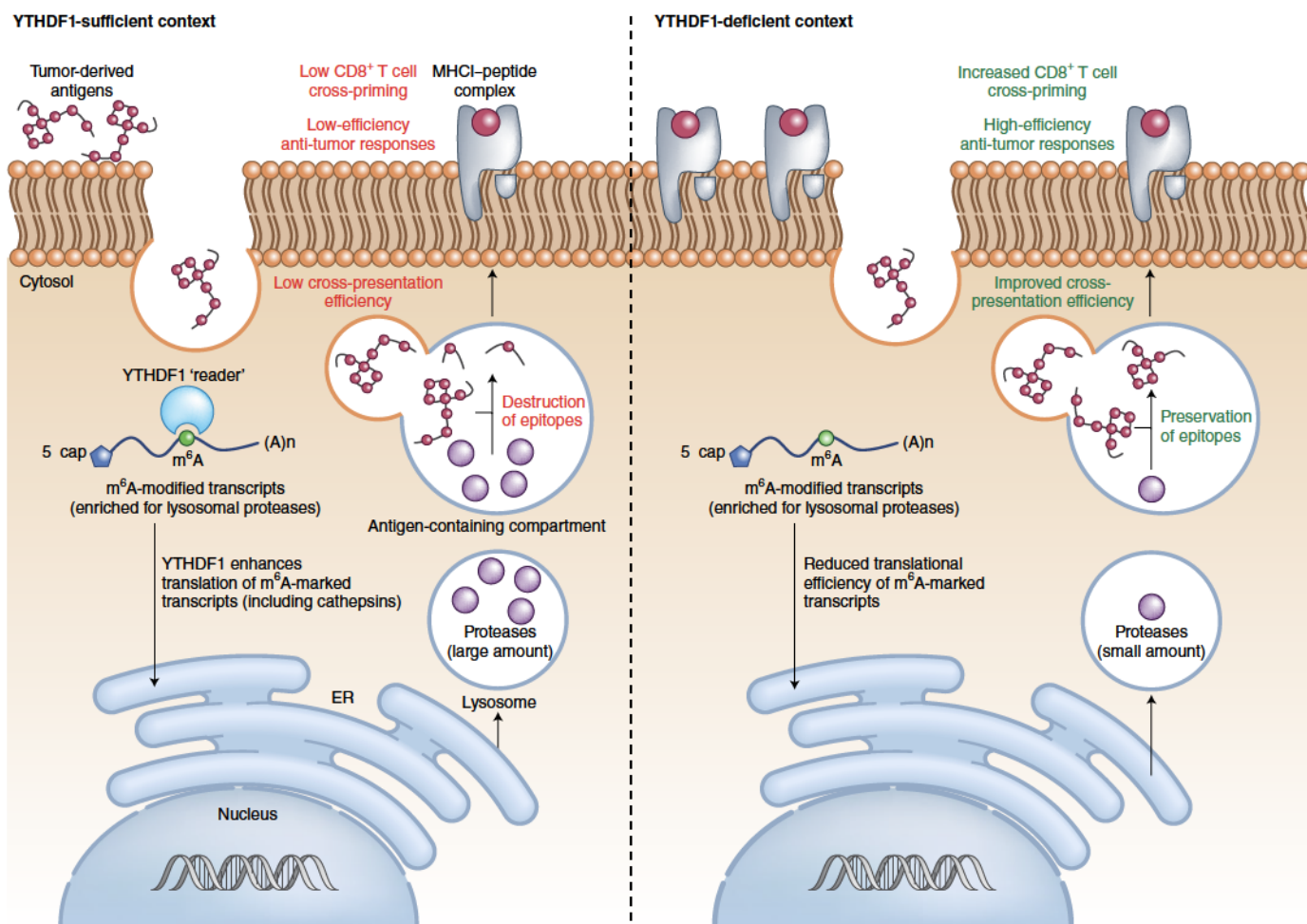


Fig. 1 | Regulation of antigen cross-presentation by YTHDF1. Tumor-derived antigens are captured by cDC1s and transferred to the antigen-containing compartment, where they are partially degraded by cathepsins. In YTHDF1-deficient DCs (right), the translation rate of cathepsin transcripts is reduced, which results in better preservation of antigens and increased cross-presentation efficiency. MHC I, MHC class I; A(n), poly(A) tail; ER, endoplasmic reticulum.

the same endolysosomal compartment. Conversely, in the cytosolic pathway, antigens are exported from endosomes to the cytosol, where they undergo proteasome-dependent degradation. The resulting peptides, after translocation mediated by the transporter TAP, are then loaded on MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum or in endocytic compartments. Despite the paucity of studies investigating the contributions of each pathway *in vivo* and under various physiological conditions, the best evidence so far points to prominent involvement of the cytosolic pathway⁹. Additionally, cDC1s use only the endosome-to-cytosol pathway under homeostatic conditions⁹. Among the unique properties that favor the delivery of antigens into this cross-presentation pathway, narrow regulation of endolysosomal pH and subsequent limitation of antigen degradation appear to be hallmarks of cDC1 physiology.

The insight that limited antigen degradation promotes antigen cross-presentation emerged from the comparison of two subsets of antigen-presenting immune cells with different degrees of cross-presentation efficiency: cDCs and macrophages. While macrophages show large amounts of lysosomal proteases and active proteolysis at an acidic pH, cDCs exhibit low levels of lysosomal cathepsins and attenuated antigen degradation associated with an increased ability to cross-present antigens¹⁰. Thus, cDC1s express substantially lower amounts of transcripts encoding cathepsins Z, H and C than do their cDC2 counterparts, which is thus correlated with increased cross-presenting efficiency¹⁰. Beyond differential expression of lysosomal cathepsins, cDC1s also actively maintain an endo- and/or phagosomal alkaline pH that prevents excessive antigen degradation and the potential destruction of epitopes by luminal proteases. So far, two

mechanisms operating at different cellular levels have been described to explain how cDC1s regulate the intraluminal pH of antigen-containing compartments. First, higher expression of the small GTPase Rac2 in cDC1s triggers recruitment of the NADPH oxidase NOX2 to phagosomes and results in proton consumption and the production of reactive oxygen species, which elevates the luminal pH¹⁰. Concurrently, silencing of the transcription factor TFEB in cDC1s impairs endo- and/or phagosomal acidification and thereby promotes cross-presentation in this subset¹¹.

The present study by Han et al. adds a new level of complexity to the current model by showing that regulation of endo- and/or lysosomal pH is dictated, at the translational level, by reading of the m⁶A modification of RNA by YTHDF1¹. Most interestingly, YTHDF1-mediated recognition of m⁶A-tagged transcripts encoding lysosomal proteases promotes their translation.

These findings provide an alternative mechanism for the regulation of lysosomal proteolytic activity that relies on the regulation of cathepsin protein levels, autonomous to cDC1. As the system here is pushed to its limits by YTHDF1's loss of function, further studies analyzing how m⁶A readers, writers and erasers are modulated in cDCs during immune responses will certainly improve the understanding of cDC biology.

As these proteases are also required for the processing of antigens and their presentation on MHC class II molecules, we are tempted to propose a model wherein variations between cDC1s and cDC2s in their YTHDF1 expression could act as a molecular 'switch' that controls the delivery of exogenous antigens to MHC class I- or MHC class II-presentation pathways. In addition, differential activity of the molecular machineries responsible for the deposition of m⁶A on or its removal from mRNA could also account for differences in cross-presentation

abilities observed in the two cDC subsets. This would be particularly interesting, as beyond the ovalbumin used here as surrogate tumor antigen, numerous genuine neoantigens resulting from single-nucleotide polymorphisms have been described in the B16-F10 melanoma model¹². Most of these neoepitopes are presented in a MHC class II-dependent context and trigger CD4⁺ T cell responses. In light of this observation, it would be of outstanding interest to study how YTHDF1 modulates targeting of exogenous antigens to presentation via the MHC class I or MHC class II pathways.

The striking results presented in this report shed new light on how antigen presentation by cDCs can be modulated in vivo. Indeed, the results suggest that inactivating YTHDF1 is sufficient to improve antigen cross-presentation and the priming of anti-tumor responses and thus open new perspectives for therapeutic targeting of this pathway (Fig. 1). □

Marianne Burbage, Marine Gros and Sebastian Amigorena*

Institut Curie, PSL Research University, INSERM U932, Paris, France.

*e-mail: sebastian.amigorena@curie.fr

Published online: 1 April 2019

<https://doi.org/10.1038/s41590-019-0371-8>

References

- Han, D. et al. *Nature* **566**, 270–274 (2019).
- Meyer, K. D. & Jaffrey, S. R. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **33**, 319–342 (2017).
- Li, H.-B. et al. *Nature* **548**, 338–342 (2017).
- Winkler, R. et al. *Nat. Immunol.* **20**, 173–182 (2019).
- Shi, H. et al. *Nature* **563**, 249–253 (2018).
- Theisen, D. J. et al. *Science* **362**, 694–699 (2018).
- Theisen, D. J. et al. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 29–39 (2019).
- Alloati, A. et al. *J. Exp. Med.* **214**, 2231–2241 (2017).
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 557–569 (2012).
- Gros, M. & Amigorena, S. *Front. Immunol.* **10**, 41 (2019).
- Samie, M. & Cresswell, P. *Nat. Immunol.* **16**, 729–736 (2015).
- Kreiter, S. et al. *Nature* **520**, 692–696 (2015).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

GENE REGULATION

Old dog PU.1 reveals new tricks

The transcription factor PU.1 is not needed for the maintenance of neutrophil identity but is essential for the prevention of excessive tissue damage due to a prolonged immune response. PU.1 restrains the activation of neutrophils by antagonizing the AP-1 transcription factor JunB.

Richard Dahl

Neutrophils are the predominant immune cell in the peripheral blood and are the first line of defense against bacterial and fungal infections¹. Neutrophils activated by cytokines or pathogen-associated antigens respond with the generation of reactive oxygen species, anti-microbial peptides and inflammatory cytokines. Overactivation can lead to tissue damage and autoimmunity; therefore, a feedback inhibitory response is needed to attenuate neutrophil activity. In this issue of *Nature Immunology*, Fischer et al. report a novel role for the Ets family transcription factor PU.1 (encoded by *Spi1*) in restraining neutrophil activation through regulation of the inflammatory epigenome of neutrophils².

PU.1 has been well studied for its role in the development of immune cells³. Germline null mutations in *Spi1* result in a complete loss of immune cells (monocytes, granulocytes, B cells and T cells)^{4,5}. Subsequent studies of conditional deletion of *Spi1* have demonstrated that

PU.1 is dispensable for the development of lymphoid cells from common lymphoid progenitors and subsequent B cell function^{6,7}. In contrast, disruption of PU.1 in common myeloid progenitors and granulocyte-monocyte progenitors results in a block in the differentiation of granulocytes and monocytes. Deletion of *Spi1* in adult mice via a *Mx1*-Cre transgene results in a decrease in mature granulocytes, common myeloid progenitors, granulocyte-monocyte progenitors, common lymphoid progenitors and hematopoietic stem cells.

Fischer et al. generate PU.1^{ΔNeu} mice, in which *Spi1* is deleted specifically in mature neutrophils². PU.1^{ΔNeu} neutrophils are morphologically indistinguishable from wild-type neutrophils, and analysis of peripheral blood, spleen and bone marrow by flow cytometry does not reveal any significant differences in the neutrophil population due to deletion of *Spi1*. The loss of granulocytes after the induction of *Spi1* deletion in adult mice appears to be not due to a requirement for PU.1 in the

maintenance of neutrophil identity. Instead, the granulocyte loss is due to a combination of the short half-life of granulocytes and the inability of *Spi1*^{-/-} hematopoietic stem and progenitor cells to repopulate the mature neutrophil population. Whole-transcriptome profiling of neutrophils identifies a role for PU.1 in regulating transcription in mature neutrophils, with almost 1,000 genes expressed differentially in *Spi1*^{-/-} cells relative to their expression in wild-type cells. Gene sets associated with myeloid differentiation (monocytes-granulocytes) do not have significantly different expression but, interestingly, the top-ranked gene ontology (GO) sets affected in the absence of PU.1 encode molecules in pathways involved in the immune response.

Neutrophils are the most important fungicidal immune cells during the early stage of an infection. To determine if the gene-expression changes noted above result in functional consequences, Fischer et al. challenge wild-type control and PU.1^{ΔNeu} mice with the fungus *Candida albicans*².