



**HAL**  
open science

# Recherche d'acteurs lysosomaux impliqués dans la présentation de lipides mycobactériens par CD1b aux lymphocytes T

Sonia Belkai

► **To cite this version:**

Sonia Belkai. Recherche d'acteurs lysosomaux impliqués dans la présentation de lipides mycobactériens par CD1b aux lymphocytes T. Médecine humaine et pathologie. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES176 . tel-04890294

**HAL Id: tel-04890294**

**<https://theses.hal.science/tel-04890294v1>**

Submitted on 16 Jan 2025

**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.

# Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

---

Recherche d'acteurs lysosomaux impliqués dans la  
présentation de lipides mycobactériens par CD1b aux  
lymphocytes T

---

Thèse présentée et soutenue, le 19 novembre 2024 par

**Sonia BELKAI**

## **École doctorale**

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

## **Spécialité**

Biologie structurale et fonctionnelle

## **Unité de recherche**

IPBS - Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale

## **Thèse dirigée par**

Martine GILLERON

## **Composition du jury**

M. Remy POUPOT, Président, Université Toulouse III- Paul Sabatier

Mme Oana DUMITRESCU, Rapporteur, Université Lyon 1

M. Jean-Louis HERRMANN, Rapporteur, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

M. Ludovic TAILLEUX, Rapporteur, Institut Pasteur

Mme Martine GILLERON, Directrice de thèse, CNRS Occitanie Ouest



## **Remerciements :**

La réalisation de cette thèse a été un parcours formateur, et je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à son aboutissement.

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury, les Drs Oana Dumitrescu, Jean-Louis Herrmann, Ludovic Tailleux et Rémi Poupot. Je suis honorée par votre intérêt pour mes recherches. Merci pour vos retours et conseils qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi individuel, les Drs Mary Poupot et Isabelle Ader pour leur écoute attentive et leurs retours constructifs.

J'ai effectué ma thèse dans l'équipe « Immunomodulation par les lipides et glycoconjugués mycobactériens », dirigée par le Dr Jérôme Nigou, que je remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Martine Gilleron, pour son accompagnement, sa confiance et ses conseils tout au long de ces trois années. Son aide m'a été précieuse lors de ma thèse, ainsi que pendant la rédaction de ce manuscrit. Je voudrais également exprimer ma gratitude envers les membres permanents de l'équipe pour leurs précieuses contributions, tant scientifiques qu'humaines. Un grand merci à Alain, mon voisin de bureau, pour ses conseils avisés et sa bonne humeur. Merci à Émilie et Isabelle pour leur participation à mes recherches. Merci également à Michel et Emeline.

Merci à Alexandre Stella d'avoir réalisé la protéomique, à Vanessa Soldan de m'avoir assistée à la microscopie et à Caroline Delmas pour l'irradiation des cellules.

Un immense merci à mes copains de l'équipe : Seb, Flo, Sophie, Hector, Hanamée et Chloé. Merci pour tous les moments et rires partagés, j'ai hâte de suivre la suite de vos parcours.

Tamara, Marion, Jerko, mes meilleurs souvenirs de ces trois années passées à Toulouse sont avec vous. Merci pour votre présence et votre amitié précieuse.

Enfin, un grand merci à mes parents, mes petits frères, et mes amis pour leur soutien à distance.



## Résumé

Les lipides peuvent être antigéniques et présentés en surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces lipides, généralement amphiphiles, sont présentés par les protéines CD1 (CD1a à CD1d), des protéines proches structurellement de la protéine du CMH de classe I, avec pour principale différence le site de liaison des antigènes. Cette présentation mène à une réponse immunitaire spécifique médiée par des lymphocytes T non conventionnels.

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agent causal de la tuberculose, possède dans son enveloppe des lipides antigènes présentés par les protéines CD1, et particulièrement par l'isoforme CD1b. Ces lipides sont chargés sur CD1b au niveau du lysosome des cellules dendritiques (CD), dans leur état natif ou après un apprêtement. Cet apprêtement nécessite des protéines de transfert de lipides (LTP), telles que CD1e et les saposines, mais aussi des enzymes (hydrolases), permettant de digérer les parties polaire ou apolaires des lipides. Peu de LTP et hydrolases lysosomales ont à l'heure actuelle été identifiées, il est donc nécessaire de caractériser d'autres acteurs lysosomaux impliqués dans la présentation des antigènes lipidiques mycobactériens par CD1b. Les objectifs de ces travaux étaient de mettre en place des stratégies pour rechercher et identifier ces acteurs.

Ainsi, dans le but d'identifier de nouveaux acteurs lysosomaux impliqués dans le transport ou la maturation des glycolipides de Mtb, deux approches complémentaires ont été mises en place. La première, plus globale, nous a conduit à préparer des fractions enrichies en lysosomes provenant de CPA. Pour valider le protocole d'obtention de ces fractions, elles ont été caractérisées morphologiquement ainsi que par la présence de marqueurs protéiques. Elles ont également servi à réaliser des tests de dégradation de lipides mycobactériens *in vitro*, confirmant l'action des lipases précédemment caractérisées. Enfin, l'analyse protéomique du contenu de ces fractions a contribué à l'élaboration d'une liste de cinq protéines candidates, possiblement impliquées dans l'apprêtement. Parmi elles, certaines n'ont jamais été décrites dans le contexte de présentation de lipides antigènes, et d'autres sont déjà connues pour contribuer à la présentation de lipides par CD1d. La seconde approche a consisté à définir l'interactome de CD1b dans le lysosome, en réalisant une coimmunoprécipitation de CD1b à partir de fractions lysosomales. L'analyse protéomique des partenaires a permis de proposer quatre autres protéines candidates, toutes non décrites à ce jour dans le cadre de la présentation d'antigènes lipidiques. L'expression de certaines de ces protéines candidates, sera par la suite inactivée pour étudier l'impact de cette inactivation sur la présentation des complexes CD1b-lipides. Parmi ces protéines, la protéine NPC1 (« *Niemann-Pick disease C1* »), déjà connue pour être impliquée dans la présentation de lipides par l'isoforme CD1d chez la souris, a retenu notre intérêt. Des essais d'inactivation ont été réalisés grâce à un inhibiteur spécifique, avant d'envisager une inactivation de l'expression par utilisation de siRNA ou CRISPR/Cas9. Dans le but d'apprécier les effets de cette inactivation, il est nécessaire de posséder des outils biologiques capables d'évaluer la participation du candidat dans la présentation d'un lipide particulier. Lors de cette étude, deux outils ont été validés : 1) des anticorps recombinants spécifiques de CD1 présentant le sulfoglycolipide diacylé mycobactérien (Ac2SGL), et 2) différents clones lymphocytaires spécifiques de CD1b en complexe avec divers glycolipides mycobactériens.



## Summary

Lipids can be antigenic and presented on the surface of antigen-presenting cells (APCs). These lipids, which are generally amphiphilic, are presented by CD1 proteins (CD1a to CD1d), which are structurally similar to class I MHC proteins, with the primary difference being in the antigen-binding site. This presentation leads to a specific immune response mediated by unconventional T lymphocytes.

*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the causative agent of tuberculosis, has antigenic lipids in its envelope that are presented by CD1 proteins, particularly by the CD1b isoform. Some of these lipids are antigenic and are then loaded onto CD1b in the lysosome of dendritic cells (DCs), either in their native state or after processing. This processing requires lipid transfer proteins (LTPs), such as CD1e and saposins, as well as enzymes (hydrolases) that digest the polar or apolar parts of the lipids. Few lysosomal LTPs and hydrolases have been identified so far, making it necessary to characterize other lysosomal actors involved in the presentation of mycobacterial lipid antigens by CD1b. The objectives of this work were to develop strategies to search for and identify these actors.

To identify new lysosomal actors involved in the transport or maturation of Mtb glycolipids, two complementary approaches were implemented. The first, more global approach, involved preparing lysosome-enriched fractions from APCs. To validate the protocol for obtaining these fractions, they were characterized morphologically and by the presence of protein markers. They were also used to perform *in vitro* degradation tests of mycobacterial lipids, confirming the action of previously characterized lipases. Finally, proteomic analysis of the contents of these fractions contributed to the development of a list of five candidate proteins that may be involved in processing. Among them, some have never been described in the context of lipid antigen presentation, while others are already known to contribute to lipid presentation by CD1d. The second approach involved defining the interactome of CD1b in the lysosome by performing co-immunoprecipitation of CD1b from lysosomal fractions. Proteomic analysis of the partners identified four other candidate proteins, none of which have been described to date in the context of lipid antigen presentation. The expression of some of these candidate proteins will subsequently be knocked out to study the impact of this inactivation on the presentation of CD1b-lipid complexes. Among these proteins, NPC1 (“Niemann-Pick disease C1”), already known to be involved in lipid presentation by the CD1d isoform in mice, attracted our interest. Inactivation tests were performed using a specific inhibitor, before considering inactivation of expression using siRNA or CRISPR/Cas9.

To evaluate the effects of this inactivation, it is necessary to have biological tools capable of assessing the candidate's participation in the presentation of a particular lipid. In this study, two tools were validated : 1) recombinant antibodies specific to CD1 presenting the mycobacterial diacylated sulfoglycolipid (Ac2SGL), and 2) different lymphocyte clones specific to CD1b in complex with various mycobacterial glycolipids.

## Abréviations

$\alpha$ -GalCer :  $\alpha$ -galactosylcéramide  
 $\beta$ 2-m :  $\beta$ 2-microglobuline  
Ac2SGL : sulfoglycolipides di-acylés  
AM : acides mycoliques  
AOAH : « Acyloxyacyl Hydrolase »  
AP2 et AP3 : « adaptator protein complex » 2 et 3  
BCG : bacille de Calmette et Guérin  
BMP : Bis(monoacylglycéro)phosphate  
CD : cellule dendritique  
CD1b : « cluster of differentiation 1 isoform b »  
pCD1b : « papain-cleavable CD1b »  
CMH-I et CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité  
Co-IP : co-immunoprécipitation  
CPA : cellule présentatrice d'antigènes  
DAT, TAT, PAT : Di - Tri – Pentaacyl tréhalose  
DDM : didésoxymycobactine  
DLS : « dynamic light scattering »  
DN : « double negative »  
ELISA : « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »  
EPDR1 : « Ependymin Related 1 Protein »  
FL : Fraction lysosomale  
GM2AP : « GM2 activator protein »  
GM-CSF : « granulocyte macrophage colony stimulating factor »  
GMM : glucose monomycolate  
GroMM : glycerol monomycolate  
HEV : « Host extravesicular vesicles »  
IFN : interféron  
iGb3 : isoglobotrihexosylcéramide  
IL : interleukine  
LM : lipomannane  
LPLA2 : « Lysosomal phospholipase A2 »  
LT : lymphocyte T  
LTP : protéine de transfert de lipides  
MDR : « Multi Drug Resistant »  
MET : microscope électronique à transmission  
MFI : « mean fluorescence intensity »

MALDI-Tof : « matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight »  
(Man)LAM : lipoarabinomannane (à coiffes mannosyles)  
MPM : mannosyl- $\beta$ -1-phosphomycokétide  
MS : « mass spectrometry »  
Mtb : *Mycobacterium tuberculosis*  
MTBC : *Mycobacterium tuberculosis* complex  
MTP : « microsomal transfert protein » (i)NKT : « (invariant) natural killer T »  
NPC1 et NPC2 : « Niemann-Pick disease C1 et C2 »  
PBMC : « peripheral blood mononuclear cell »  
PC, PG, PE, PI et PS : phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylsérine  
PEG : polyéthylène glycol  
PIM : phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides  
PLRP2 : « Lysosomal Pancreatic lipase-related protein 2 »  
PLBL2 : « Phospholipase B-Like 2 »  
PRR : « pattern recognition receptor »  
RE : réticulum endoplasmique  
Sap : saposine  
ScFv : single-chain variable fragment  
SGL : Sulfoglycolipide  
TCR : « T cell receptor »  
TDM et TMM : tréhalose mono- et di-mycolate  
Th1, Th2, Th17 : T helper 1, 2, 17  
TLR : récepteur « Toll-like »  
TNF : « tumor necrosis factor »  
XDR : « Extensively Drug Resistant »

## **Table des illustrations**

### **Figures :**

**Figure 1 :** Carte des pays où l'incidence de la tuberculose était supérieure à 100 000 en 2022.

**Figure 2 :** Schéma du cycle infectieux de Mtb.

**Figure 3 :** Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne.

**Figure 4 :** Structures de certains lipides présents dans le feuillet externe de l'enveloppe mycobactérienne.

**Figure 5 :** Quelques PRR à la surface des CPA impliqués dans l'interaction avec les lipides mycobactériens.

**Figure 6 :** Caractéristiques des protéines CD1 humaines.

**Figure 7 :** Exemples de structures de lipides endogènes et exogènes présentés par les protéines CD1.

**Figure 8 :** Mécanismes de capture du matériel par les cellules infectées permettant aux CD non infectées de présenter les lipides antigènes.

**Figure 9 :** Trafic intracellulaire des protéines CD1 humaines.

**Figure 10 :** Activation et différenciation des LT CD4+ en LT effecteurs.

**Figure 11 :** Représentation schématique des trois modèles de reconnaissance des complexes CD1-lipides par les TCRs.

**Figure 12 :** Fonctions effectrices des LT restreints par CD1 du groupe 1 et 2.

**Figure 13 :** Trafic et localisation intracellulaire de CD1e dans les CD.

**Figure 14 :** Représentation schématique des deux modèles de fonctionnement des LTP.

**Figure 15 :** Digestion lysosomale des PIMs pour la présentation par CD1b.

**Figure 16 :** Analyses par cytométrie en flux des CD et THP-1 CD1b

**Figure 17 :** Présentation de l'AC scFv D11.

**Figure 18 :** Etude de la spécificité de D11.

**Figure 19** : Schéma du protocole de présentation lipidique de l'Ac2SGL (ou SL37) par CD1b et détection par FACS à l'aide des différents AC recombinants

**Figure 20** : Analyse par cytométrie en flux de la reconnaissance de CD1b-SL37 par l'AC D11 en surface des THP-1.

**Figure 21** : Comparaison par cytométrie en flux de la reconnaissance spécifique des SL par les AC D11, B7 et B12

**Figure 22** : Analyse par cytométrie en flux de la reconnaissance de CD1b-SL37 par l'AC D11 en surface des CD.

**Figure 23** : Etude de l'effet de l'activation des CPA par du LPS sur la détection de CD1b-SL37 par D11.

**Figure 24** : Analyse par cytométrie en flux de l'expansion du clone LDN5

**Figure 25** : Résultats de tests ELISA mesurant la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (en pg/mL) par les LT en fonction de la dose de lipide antigène (en  $\mu$ M).

**Figure 26** : Protocole d'obtention de fractions enrichies en lysosomes avec deux méthodes: la séparation sur gradient de densité et les centrifugations différentielles.

**Figure 27** : Caractérisation de la taille et morphologie des objets contenus dans le culot lysosomal

**Figure 28** : Western blot à l'aide d'AC marqueurs de différents organites.

**Figure 29** : Comparaison de l'activité  $\beta$ -hexosaminidase.

**Figure 30** : Tests de digestion de PIM2Ac4 par la FL de THP-1 *in vitro*.

**Figure 21** : Analyse MS/MS des PIM2Ac4 de synthèse après digestion par la FL.

**Figure 32** : Volcano-plots des analyses protéomiques comparant les protéines du lysat total (gauche) et de la FL (droite).

**Figure 33** : Volcano-plots des analyses protéomiques montrant les protéines candidates identifiées.

**Figure 34** : Premiers tests de détection de 3 protéines candidates (AOAH, GM2AP et SAP) avec des AC polyclonaux

**Figure 35** : Expérience de purification de CD1b sur colonne

**Figure 36** : Expérience de co-IP pour identifier des partenaires lysosomaux de CD1b

**Figure 37** : Comparaison des capacités d'activation du clone A05 des CPA suivantes : CD, THP-1 CD1b, K562 CD1b et K562 CD1b-6his.

**Figure 38** : Volcano plots résultant des analyses protéomiques après co-IP pour identifier les partenaires de CD1b dans différentes conditions.

**Figure 39** : Test de mise en évidence d'une activité lipase sur le Ac4SGL permettant la reconnaissance de CD1b-Ac2SGL par les outils spécifiques

**Figure 40** : Premiers essais de l'étude de l'impact de l'inactivation de NPC1 sur la présentation du GMM et de l'Ac2SGL.

### **Tableaux :**

**Tableau 1** : Récapitulatif des vaccins vivants atténués, inactivés, sous-unitaires et à vecteurs viraux en différentes phases d'essais cliniques.

**Tableau 2** : Tableau récapitulatif des différentes copies des isoformes CD1 présentes chez certains mammifères.

**Tableau 3** : Liste des lipides présentés par les différentes isoformes CD1.

**Tableau 4** : Tableau récapitulatif des domaines cytoplasmiques des isoformes CD1a-CD1d.

**Tableau 5** : TCR conservés entre individus reconnaissant certains antigènes présentés par les protéines CD1.

**Tableau 6** : Tableau bilan des modes d'action des différentes protéines de transfert lipidique (LTP) identifiées à ce jour.

**Tableau 7** : Tableau récapitulatif des trois AC recombinants testés pour leur reconnaissance du complexe CD1b-Ac2SGL.

**Tableau 8** : Tableau des clones de LT restreints par CD1b et CD1d présentant différents antigènes cibles, et leurs affinités respectives.

**Tableau 9** : Tableau récapitulatif de l'expansion des LT.

**Tableau 10** : Tableau récapitulatif des différentes conditions testées afin de tester la dégradation du PIM2Ac4 synthétique *in vitro* par la FL

**Tableau 11** : Protéines candidates identifiées par analyse protéomique des FL et étude bibliographique.

**Tableau 12** : Protéines candidates identifiées par co-IP.

**Tableau 13** : Protéines candidates et recherche de l'existence d'inhibiteurs spécifiques.

# Table des matières

Introduction .....	1
<b>I) <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, agent de la tuberculose .....</b>	<b>1</b>
1) Les mycobactéries .....	1
2) La tuberculose .....	3
3) Les approches actuelles de prévention de la tuberculose et leurs limitations .....	6
a) L'antibiothérapie .....	6
b) Le vaccin BCG .....	7
c) Les vaccins de nouvelle génération .....	9
<b>II) <i>Mtb</i>, une bactérie riche en lipides .....</b>	<b>15</b>
1) Structure et composition lipidique de l'enveloppe mycobactérienne .....	15
a) Composition lipidique de la membrane plasmique .....	15
b) Composition lipidique de la paroi .....	17
c) Composition lipidique du feuillet externe .....	17
d) Composition de la capsule : .....	19
2) Rôle des lipides mycobactériens dans la virulence .....	19
3) Reconnaissance des lipides mycobactériens par le système immunitaire inné .....	21
a) Les "Toll-like receptor" (TLR) .....	22
b) Les récepteurs lectiniques de type C .....	23
<b>III) Présentation des antigènes lipidiques par les protéines CD1 .....</b>	<b>27</b>
1) Les protéines CD1 .....	27
a) La famille de gènes CD1 .....	27
b) Les cellules humaines exprimant les protéines CD1 .....	27
c) Impact du métabolisme cellulaire sur l'expression des protéines CD1 .....	28
d) Structure des protéines CD1 .....	31
2) Nature des lipides présentés par les protéines CD1 .....	35
a) Lipides d'origine endogène .....	37
b) Lipides d'origine microbienne .....	38
c) Capture des antigènes lipidiques microbiens .....	41
<b>IV) Rencontre des lipides mycobactériens et des protéines CD1 dans le réseau endosomal .....</b>	<b>43</b>
1) Trafic intracellulaire des protéines du CD1 .....	43

2) Le trafic intracellulaire des lipides exogènes .....	45
3) Importance de l'environnement lysosomal .....	46
<b>V) Réponse adaptative dépendante des protéines CD1.....</b>	<b>47</b>
1) Les LT spécifiques du groupe 2 .....	47
a) Les cellules NKT .....	47
b) Rôle des cellules NKT dans l'immunité anti-bactérienne.....	49
2) Lymphocytes spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 .....	49
a) Diversité des TCR des cellules T restreintes par les protéines CD1 du groupe 1 .	51
b) Diversité du corécepteur : .....	53
3) Reconnaissance des complexes CD1-lipides par les LT spécifiques du groupe 1.	54
a) Importance de la partie polaire .....	54
b) Importance de la partie lipidique .....	55
c) Mécanismes de reconnaissance des complexes CD1-lipides par les TCR spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 .....	57
4) Fonctions effectrices et rôle dans la réponse immunitaire des LT spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 .....	59
a) Importance des LT spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 dans l'auto- immunité .....	60
b) Importance dans l'immunité anti-mycobactérienne.....	61
c) Importance dans l'immunité contre d'autres pathogènes : .....	62
d) Propriétés des LT mémoire spécifiques des protéines CD1 du groupe 1.....	63
e) Développement de vaccins de nouvelle génération à base de lipides mycobactériens .....	63
<b>VI) Apprêtement des lipides pour leur présentation par les protéines CD1 ..</b>	<b>67</b>
1) Rôle des protéines de transfert lipidique dans le chargement des antigènes sur CD1 67	
a) L'isoforme CD1e .....	69
b) Les saposines .....	71
c) GM2AP .....	73
d) NPC1 et NPC2 .....	74
2) Apprêtement des lipides par les enzymes lysosomales.....	74
a) Modification des parties osidiques.....	74
b) Modification des parties lipidiques .....	75
Présentation du projet .....	78
Résultats.....	80

<b>Chapitre 1 : Validation des outils biologiques permettant de suivre la présentation des antigènes lipidiques par CD1b.....</b>	<b>80</b>
1) Choix des CPA.....	80
a) Présentation des lignées THP-1 et K562.....	80
b) Utilisation de CD obtenues à partir de monocytes.....	81
2) Anticorps recombinant dirigé contre le complexe CD1b- Ac <sub>2</sub> SGL.....	83
a) Les anticorps recombinants : des outils intéressants pour détecter la présentation de l'Ac <sub>2</sub> SGL par CD1b en surface des CPA.....	85
b) L'anticorps D11 reconnaît le complexe CD1b-Ac <sub>2</sub> SGL en surface des CPA.....	87
3) LT spécifiques de différents complexes CD1b-lipide mycobactérien.....	97
a) Expansion des LT.....	97
b) Validation de l'outil LT par test d'activation.....	99
4) Conclusions et perspectives.....	102
<b>Chapitre 2 : Obtention d'une liste de protéines candidates.....</b>	<b>105</b>
1) Obtention et caractérisation d'une fraction enrichie en lysosomes (FL).....	105
a) Choix de la méthode d'enrichissement lysosomal.....	105
b) Caractérisation biophysique des FL obtenues.....	109
c) Caractérisation biochimique des FL obtenues.....	111
d) Tests de dégradation <i>in vitro</i> de lipides mycobactériens par la FL.....	115
2) Obtention d'une liste de protéines candidates par analyse protéomique des FL.....	119
a) Analyse protéomique des FL.....	119
b) Elaboration d'une liste de protéines candidates à partir des données protéomiques	121
c) Enrichissement de la liste de protéines candidates à partir des données bibliographiques.....	124
3) Identification du protéome intra-lysosomal de CD1b.....	129
a) Essai de purification de CD1b et ses protéines partenaires sur colonne.....	131
b) Identification de l'interactome de CD1b par co-IP.....	133
3) Conclusion et perspectives.....	140
<b>Chapitre 3 : Etude du rôle de NPC1 dans la présentation des antigènes lipidiques par CD1b.....</b>	<b>145</b>
1) Utilisation des outils spécifiques du Ac <sub>2</sub> SGL pour tenter de mettre en évidence une activité lipase.....	145
2) Premiers essais d'inactivation de NPC1 avec l'inhibiteur U18666A.....	145
3) Conclusions et perspectives.....	148

Conclusion générale.....	151
Annexe.....	154
Matériel et méthodes.....	195
1) Biologie cellulaire .....	195
2) Obtention et caractérisation de fractions lysosomales : .....	197
3) Identification de protéines candidates .....	200
Références bibliographiques.....	202

# Introduction

## I) *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose

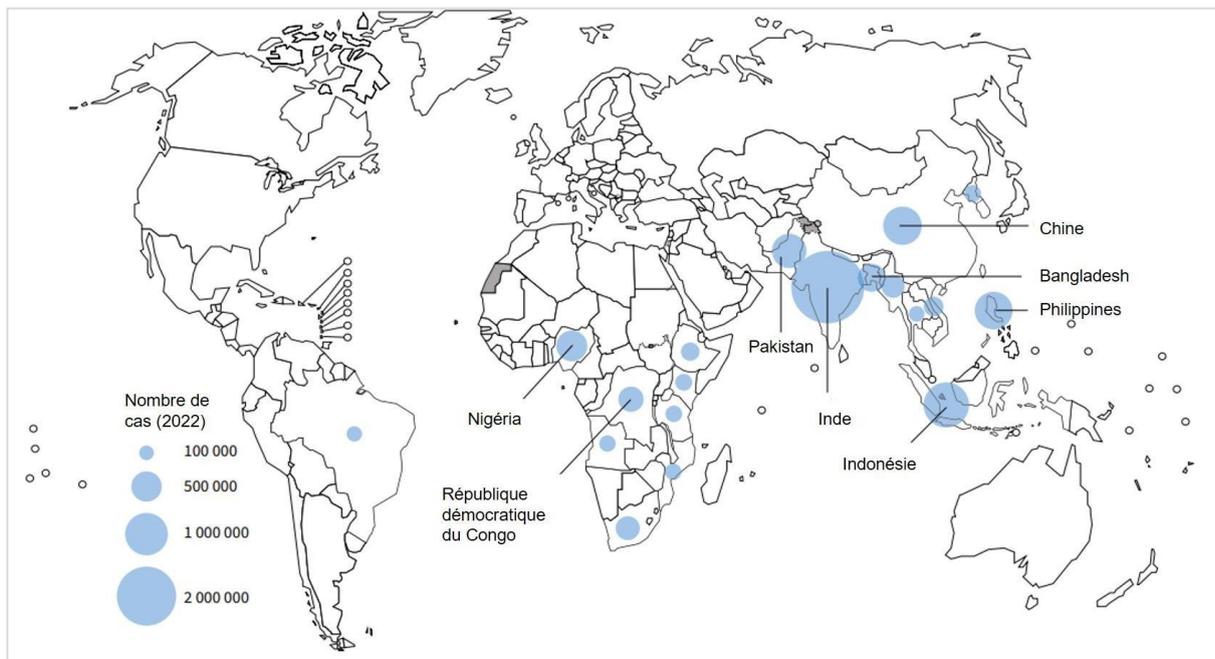
### 1) Les mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, le seul genre de la famille des Mycobacteriaceae, qui fait partie de l'ordre des Actinomycetales. À ce jour, plus de 180 espèces de mycobactéries ont été répertoriées, dont la plupart sont des organismes environnementaux (Tortoli 2006). Ces bactéries sont des bacilles droits ou légèrement incurvés, mesurant de 0,3 à 0,6 µm de diamètre et de 1,0 à 4,0 µm de long. Elles sont immobiles, aérobies et ne forment pas de spores.

Bien qu'elles soient des bactéries à Gram positif (Gram+), les mycobactéries ne se colorent pas avec la méthode de Gram. Elles sont acido-alcool-résistantes en raison de leur enveloppe riche en lipides (40 à 60 % de la masse sèche, contre 5 % chez d'autres bactéries Gram+ ou 10 % chez les Gram-). Cette caractéristique, propre au genre *Mycobacterium*, leur confère une imperméabilité aux agents antimicrobiens ainsi qu'une forte résistance aux stress environnementaux, tels que les acides et les bases fortes. Par conséquent, ces bactéries sont identifiées par la coloration de Ziehl-Neelsen, qui utilise la fuchsine pour colorer les bacilles acido-alcool-résistants capables de retenir ce pigment (Bishop et al. 1970).

On peut différencier les espèces du genre *Mycobacterium* d'après la classification des mycobactéries proposée par E. H. Runyon en 1954. Les critères de cette classification sont la vitesse de croissance sur milieux solides ou la pathogénicité chez l'homme, ces deux caractéristiques étant étroitement liées. Les mycobactéries à croissance lente (MCL) regroupent la majorité des espèces pathogènes, possèdent un temps de génération supérieur à 20 heures et nécessitent environ sept jours pour former des colonies visibles. Les mycobactéries à croissance rapide (MCR) forment des colonies en quelques jours et présentent un temps de génération souvent inférieur à 6 heures, elles sont généralement saprophytes et rarement pathogènes (Falkinham 2002).

Concernant la pathogénicité, on distingue les souches non pathogènes saprophytes, les pathogènes opportunistes non tuberculeux (MNT) et les pathogènes stricts appartenant au complexe *M. tuberculosis* (MTBC). Parmi les MTBC, en dehors de *Mycobacterium tuberculosis*, il existe 6 autres espèces mycobactériennes, différenciées principalement par leur hôte : *M. africanum* et *M. canettii* ont également l'homme pour hôte, *M. bovis* infecte la



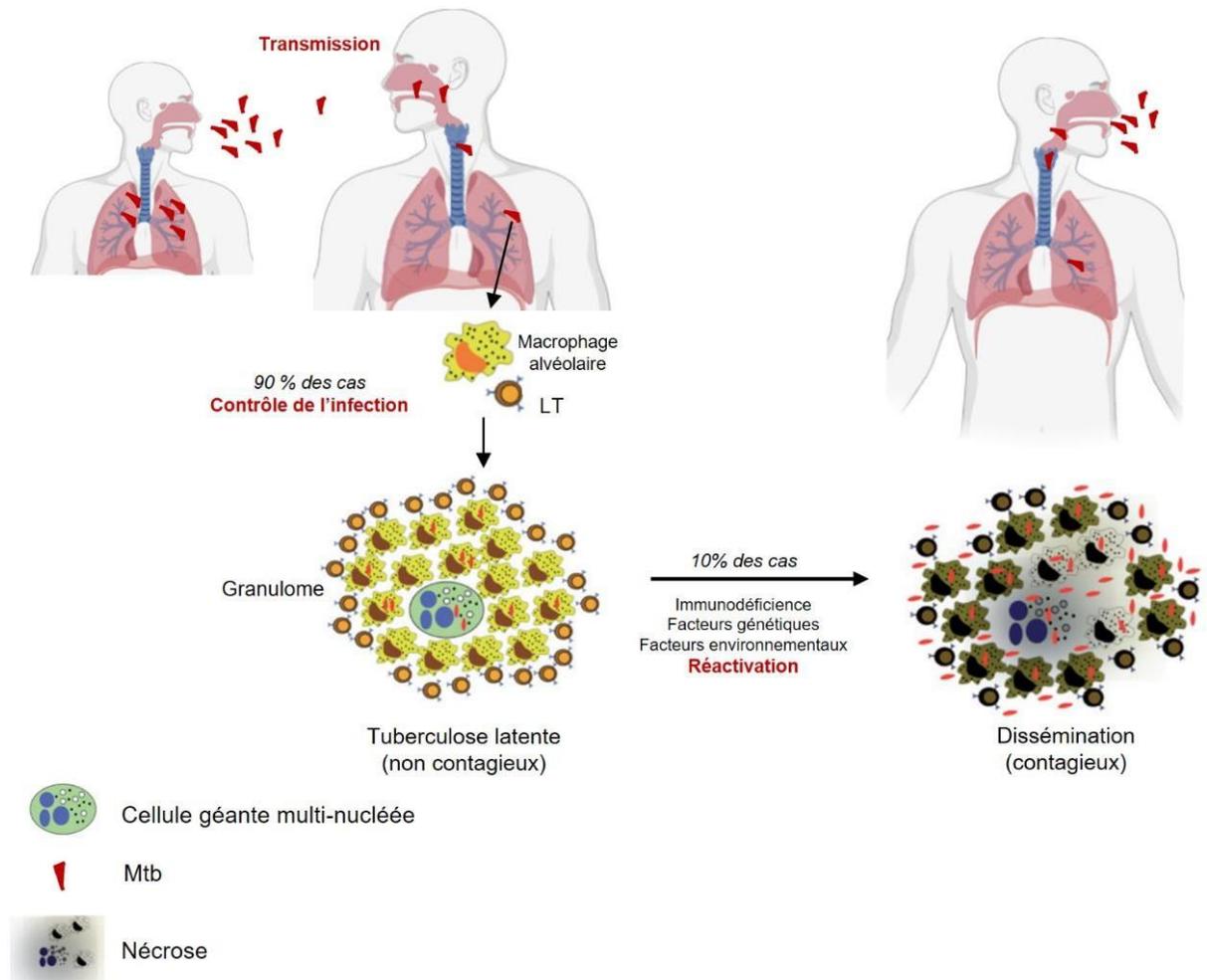
**Figure 1 : Carte des pays où l'incidence de la tuberculose était supérieure à 100 000 en 2022 (OMS, rapport de 2023).** Les huit pays classés par ordre décroissant en termes de nombre de cas, et qui ont représenté environ deux tiers des cas mondiaux en 2022, sont l'Inde, l'Indonésie, la Chine, les Philippines, le Pakistan, le Nigeria, le Bangladesh et la République démocratique du Congo.

vache, *M. pinnipedii*, les mammifères marins, *M. microti*, les rongeurs et *M. caprae*, la chèvre.

La classification des mycobactéries se fait en fonction de la séquence du gène très conservé codant pour l'ARN 16S de la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes, les rares régions hypervariables permettant de différencier les espèces (Tortoli 2003). Cette méthode ne permet cependant pas de différencier les espèces très proches en raison de leur fortesimilarité de séquence, en particulier entre les espèces du complexe MTBC. Dans ce complexe, on observe 99,95% de similitude au niveau de leur séquence d'ADN, dont 100% de similitude dans leurs séquences codant pour l'ARNr 16S (Böddinghaus et al. 1990; Brosch et al. 2002). De ce fait, d'autres cibles génomiques ont été identifiées, telles que *hsp65* ou *rpoB*. Ces gènes permettent de mieux classifier les mycobactéries et même de caractériser de nouvelles espèces (Joao et al. 2014). De nos jours, les techniques d'analyse du génome complet, telles que le Multilocus Sequence Typing (MLST) et le MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units Variable Number of Tandem Repeats), ont permis d'apprécier la variabilité des espèces mycobactériennes avec une plus grande précision (Sun et al. 2004; Rajwani et al. 2018).

## 2) La tuberculose

Mtb, connu également sous le nom du bacille de Koch d'après le médecin allemand qui l'a découvert en 1882, est l'agent responsable de la tuberculose (Tb), une maladie ancestrale qui demeure un défi majeur pour la santé publique aujourd'hui. La Tb se manifeste principalement sous forme d'infection pulmonaire, dont les symptômes comprennent une toux persistante accompagnée d'expectorations teintées de sang, des douleurs thoraciques, une faiblesse générale, de la fièvre, des sueurs nocturnes et une perte de poids notable (OMS). Il existe également des formes moins fréquentes, telles que les formes osseuses, méningées et ganglionnaires. En 2022, la Tb était la deuxième cause de décès par un pathogène après le virus SARS-CoV-2, causant environ 10,6 millions de cas et 1,3 million de décès dans le monde, selon le rapport de l'OMS de 2023 (OMS). Les régions du monde les plus affectées sont l'Asie du Sud-Est (46%), l'Afrique (23%), et la région OMS du Pacifique-Ouest (18%) (**figure 1**). Les personnes co-infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont particulièrement vulnérables. On estime qu'environ un quart de la population mondiale est infecté par Mtb, bien que cette estimation commence à être revue à la baisse (Behr et al. 2024).



**Figure 2 : Mécanismes de survenue de l'infection pulmonaire par *Mtb* et transmission.**

La transmission de l'agent infectieux se fait par inhalation de gouttelettes contenant les bacilles. Les acteurs de la réponse immunitaire se regroupent au niveau des macrophages infectés, formant le granulome, une structure qui permet un équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et le bacille tuberculeux. Cette phase est appelée Tb latente, elle est asymptomatique et non infectieuse et peut durer pendant toute la vie de l'individu infecté. Dans 10% des cas, la réactivation de *Mtb* se caractérise par une dégradation progressive des granulomes entraînant ainsi la dissémination du bacille. Cette réactivation induit une forme pulmonaire contagieuse de Tb qui consiste en une dégradation progressive des poumons. L'individu devient ainsi contagieux.

La persistance de la Tb dans diverses régions du globe est due à des lacunes en matière de vaccination, d'accès aux soins de santé, ainsi qu'à l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et la résurgence chez les populations VIH-positives. En réponse, l'OMS a déclaré la Tb comme une urgence de santé publique mondiale en 1993, motivant la mise en place de programmes ayant pour but d'améliorer l'accès aux vaccins et aux traitements, ainsi que de promouvoir la recherche de nouvelles approches thérapeutiques. Diverses stratégies de lutte ont été mises en place, telles que la DOTS (« Directly observed treatment, short-course ») en 1995, "STOP TB" en 2006, et "The End TB Strategy" en 2015, visant à réduire drastiquement la mortalité et l'incidence de la Tb d'ici 2035.

La transmission de cet agent pathogène est interhumaine et se fait principalement par voie aérienne (**figure 2**). Les bactéries contenues dans les microgouttelettes sont inhalées par l'individu receveur, et l'inhalation d'un seul bacille suffit pour initier une infection (Bloom 1994). Cette caractéristique classe *Mtb* comme un agent hautement infectieux.

Les bactéries suivent le tractus respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires où, dans 90-95% des cas, le système immunitaire de l'individu immunocompétent déclenche une réponse coordonnée de plusieurs types de cellules immunitaires, formant ainsi une structure nommée granulome. Il est composé entre autres, de macrophages et de cellules dendritiques (CD) en son centre, entourés d'un anneau de LT en périphérie (Ulrichs et Kaufmann 2006). À ce stade, on parle de Tb latente, et l'individu infecté est asymptomatique et non contagieux. La forme latente de l'infection peut persister pendant des décennies, voire toute la vie (Ulrichs et Kaufmann 2006; Hanekom et al. 2007).

Cependant, dans 5 à 10% des cas, l'équilibre entre le système immunitaire et la bactérie peut être rompu en faveur du bacille, en raison d'une immunosuppression due au VIH, à des traitements immunosuppresseurs, au diabète ou au tabagisme. Cela peut entraîner une prolifération bactérienne au sein des macrophages et la rupture du granulome. A ce stade, on parle de Tb active, car les symptômes se manifestent. Les bactéries se disséminent alors dans l'organisme et atteignent d'autres organes. L'individu devient contagieux car les bactéries sont expulsées dans les microgouttelettes par les voies respiratoires lors de l'expectoration (Chan et al. 2004).

### 3) Les approches actuelles de prévention de la tuberculose et leurs limitations

#### a) L'antibiothérapie

Le traitement antibiotique antituberculeux de première ligne préconisé par l'OMS consiste en une combinaison de quatre antibiotiques : l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), le pyrazinamide (PZA) et l'éthambutol (EMB). Le traitement dure de 6 à 9 mois et est constitué des quatre antibiotiques pendant deux mois, puis de RIF et d'INH uniquement pendant les quatre mois qui suivent (Mitchison 2005). Ces quatre drogues ont un effet bactéricide ou bactériostatique. L'INH et l'EMB inhibent la synthèse de composants de l'enveloppe bactérienne (Bernstein et al. 1952 ; Maggi et al. 1966), la RIF agit sur la synthèse de l'ARN bactérien (Thomas et al. 1961), et le PZA impacte négativement le métabolisme des acides gras bactériens à pH acide (Zimhony et al. 2000).

La longueur de ce traitement couplée aux effets secondaires entraîne une mauvaise observance, qui mène finalement à l'émergence de souches résistantes à un ou plusieurs de ces antibiotiques. Les *Mtb* multirésistantes (MDR, pour « Multi Drug Resistant ») sont des souches contre lesquelles l'INH et la RIF ne sont plus efficaces. Contre ces souches, il est nécessaire d'utiliser les antibiotiques de deuxième ligne.

L'OMS, dans ses lignes directrices sur le traitement de la tuberculose résistante de 2019, classe en trois groupes ces médicaments de deuxième ligne (OMS, 2019) : Le groupe A est composé des fluoroquinolones (levofloxacin et moxifloxacin), de la bedaquiline et du linezolid. Ces composés sont considérés comme efficaces et sont recommandés sauf en cas de contre-indication. Le groupe B contient la clofazimine et la cyclosérine (ou térizidone), qui ont été conditionnellement recommandés comme agents de deuxième choix. Le groupe C inclut les autres médicaments qui peuvent être utilisés lorsque l'on ne peut pas utiliser les agents des groupes A et B uniquement. Ce groupe inclut des drogues injectables, comme l'amikacine et la streptomycine. Enfin, d'autres médicaments, non inclus dans ces trois groupes, peuvent également être administrés. Parmi eux, la kanamycine et la capréomycine, par exemple, étaient associées à de moins bons résultats et ne sont donc plus recommandées pour les régimes MDR-TB.

Toutefois, l'ajout de ces nouveaux types de traitement mène à l'émergence des *Mtb* XDR (Extensively Drug Resistant), qui correspondent à des souches MDR avec une résistance supplémentaire aux fluoroquinolones et à un des agents injectables. La course

entre *Mtb* et le développement de nouveaux antibiotiques met donc en évidence la nécessité urgente d'innovations thérapeutiques face à l'émergence de souches résistantes.

De plus, les antibiotiques restent coûteux et accompagnés d'effets secondaires ; ainsi, ils ne constituent pas la seule voie explorée dans la lutte contre la TB. La recherche s'oriente également vers la création de vaccins efficaces, misant sur une stratégie préventive pour protéger la population.

## **b) Le vaccin BCG**

Le vaccin contre la Tb est le BCG (Bacille Calmette et Guérin), qui a été développé il y a plus de cent ans, en 1921, par deux chercheurs de l'institut Pasteur, Albert Calmette et Camille Guérin. Ce vaccin a été obtenu après près de vingt ans de cultures successives du bacille virulent *Mycobacterium bovis* sur des pommes de terre imprégnées de bile de bœuf glycéinée. Au fur et à mesure des passages, la virulence s'est atténuée, le bacille a perdu sa capacité à provoquer la maladie chez le bovin et a acquis un effet protecteur contre une réinfection par la souche nonatténuée.

Le vaccin a ensuite été distribué et cultivé dans différents instituts à travers le monde, ce qui a conduit à l'existence de diverses souches vaccinales telles que BCG-Pasteur, BCG-Japan, BCG-Danish et BCG-Glaxo (Bottai et al. 2016). Ces différentes méthodes de culture ont mené à des variations génétiques influant sur l'efficacité des vaccins. La revue d'Elton et al. détaille ces différences et montre que les souches anciennes, comme BCG-Pasteur et BCG-Glaxo possèdent des mutations associées à une réponse immunitaire accrue par rapport aux souches plus récentes, telles que BCG-Japan et BCG-Danish (Elton et al. 2023).

Aujourd'hui, le BCG est le vaccin le plus utilisé dans le monde, et le seul vaccin antituberculeux distribué. Il offre une protection contre la lèpre et les formes graves de la Tb (miliaires et méningées) lorsqu'il est administré rapidement après la naissance. Chez les nourrissons, il est efficace entre 75 % et 80 %, mais cette protection ne dure que pendant les dix premières années de vie et fonctionne mal contre la forme pulmonaire chez l'adulte et l'adolescent, puisque l'efficacité n'est que de 50 % à 70 %. Ce manque d'efficacité empêche

Vaccin	Candidat	Souche bactérienne	Modifications	Phase d'essai clinique
Vivant atténué	VPM1002	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG-Prague	Addition du gène de la listériolysine, délétion du gène de l'uréase	3
	MTBVAC	<i>M. tuberculosis</i>	Délétion des gènes <i>phoP</i> et <i>fad26</i>	3
	BCG	BCG (Tokyo 172)		3
	BCG	BCG AJVaccines (Danish 1331)		2b
Vivant inactivé	V7	<i>Mycobacterium vaccae</i>	Tuée par la chaleur	3 complétée
	RUTI	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	Tuée par la chaleur	2b
	MIP	<i>Mycobacterium obuense</i>	Tuée par la chaleur	3
	DAR-901	<i>Mycobacterium kyogaense sp. nov.</i>	Tuée par la chaleur	2b

Vaccin	Candidat	Antigène	Vecteur	Phase d'essai clinique
Sous unitaire	M72/AS01E	<i>Rv1196, Rv0125</i>	AS01	2b
	H56:IC31	<i>Ag85A, ESAT6, Rv2660c</i>	IC31	2b
	ID93+GLA-SE	<i>Rv1813, Rv2608, Rv3619, Rv3620</i>	GLA-SE	2a
	GamTBvac	<i>Ag85A, ESAT6, CFP10</i>	CpG ODN	3
	AEC/BC02	<i>Ag85A, ESAT6, CFP10</i>	BC02	2a
Vecteurs viraux	AdHuAg85A	<i>Ag85A</i>	Ad5	1
	TB/Flu-05E	<i>NS1, TB10.4, HspX</i>	Flu/THSP	1
	ChAdOx185A+ MVA85A	<i>Ag85A</i>	ChAdOx1, MVA	2a

**Tableau 1 : Récapitulatif des vaccins vivants atténués, inactivés, sous-unitaires et à vecteurs viraux en différentes phases d'essai clinique.**

Traduit de Zhou et al. 2023.

de mettre fin à la dissémination de l'agent pathogène (Whittaker et al. 2018). En raison de cette diminution de l'efficacité à l'âge adulte et du fait que la vaccination par voie intradermique peut entraîner des effets indésirables (ulcération, adénopathie, BCGite) plus ou moins graves, la vaccination des enfants par le BCG n'est plus obligatoire en France depuis 2007, mais reste recommandée.

### c) **Les vaccins de nouvelle génération**

Les défis liés au développement de nouveaux vaccins antituberculeux sont nombreux. En plus du manque de financements pour la recherche sur la Tb, la réponse immunitaire contre ce pathogène n'est pas encore totalement comprise. De surcroît, les tests sur des modèles murins et même simiens ne permettent pas de prédire la protection chez l'homme. Malgré ces obstacles, une vingtaine de candidats sont actuellement en essai clinique (**tableau 1**). Ces vaccins peuvent être classés en trois types : les vaccins vivants atténués, inactivés et sous-unitaires (viraux et moléculaires) (Principi et al. 2015; Fletcher et al. 2016). Enfin, les vaccins à ARN messagers sont également en plein essor, mais restent plus appropriés pour les infections virales en raison de la plus grande simplicité de leurs génomes.

#### Les vaccins vivants atténués

Ces vaccins correspondent à une forme atténuée du pathogène vivant, ce qui a l'avantage de produire une réponse immunitaire similaire à celle provoquée lors d'une infection naturelle. Ils possèdent un plus grand nombre d'antigènes que les vaccins sous-unitaires ou à base de vecteurs viraux, mais ne peuvent pas être administrés aux personnes immunodéprimées. Le BCG est un des meilleurs exemples de vaccin atténué, et grâce aux avancées dans la manipulation du génome bactérien, de nombreux essais ont été réalisés pour augmenter son immunogénicité et son efficacité.

Le vaccin VPM1002 en est un exemple et est actuellement en phase 3 des essais cliniques. Cette souche vaccinale est une souche de BCG à laquelle a été ajouté le gène codant pour la listériolysine O de *Listeria monocytogenes*, une toxine capable de perturber les membranes des phagosomes. De plus, le gène codant pour l'uréase C, impliquée dans la neutralisation du phagosome contenant le bacille, a été supprimé. Ainsi, le pH des phagosomes est modifié de telle sorte que la listériolysine O soit active, permettant le

relargage des bactéries dans le cytosol, et augmentant l'apoptose, l'autophagie, et l'activation de l'inflammasome. Ces modifications permettent une meilleure réponse des lymphocytes T (LT) CD4 et CD8 (Cotton et al. 2022).

Une autre stratégie consiste à développer des vaccins à partir de souches atténuées de *Mtb*, en s'appuyant sur l'hypothèse que certains antigènes clés de *Mtb* pourraient être absents de la souche BCG. La souche MTBVAC, atténuée par délétion des gènes de virulence *phoP* et *fadD26* (codant respectivement pour un facteur de transcription clé pour la croissance de *Mtb* en condition de stress acide et pour la synthèse des phthiocérol dimycocérosates (DIM), l'un des principaux facteurs de virulence mycobactériens), est actuellement en phase 3 des essais cliniques (Arbues et al. 2013). Le candidat MTBVAC montre chez la souris une efficacité comparable à celle du BCG (Aguilo et al. 2017).

### Les vaccins inactivés

Les vaccins inactivés, comme les vaccins atténués, permettent de présenter l'organisme entier au système immunitaire. Cependant, comme le pathogène a été tué, ces vaccins ne présentent pas de risque d'induire le développement la maladie. Un exemple de vaccin inactivé est le DAR-901, obtenu après inactivation par la chaleur de la souche environnementale nommée *Mycobacterium obuense*. Ce vaccin peut être utilisé pour renforcer la protection offerte par le BCG. En effet, l'injection de DAR-901 chez la souris après une première vaccination par le BCG protège mieux contre une infection par *Mtb* qu'un rappel par le BCG (Lahey et al. 2016). Cependant, l'administration de ce vaccin à des adolescents vaccinés par BCG lors d'une étude en Tanzanie en 2020 n'a pas montré de protection particulière (Munseri et al. 2020).

D'autres vaccins inactivés, tels que le RUTI, dérivé de fragments de *Mtb* insérés dans des liposomes (Cardona 2006) et ayant complété la phase 2b des essais cliniques (Nell et al. 2014), et le V7, un vaccin oral dérivé de *Mycobacterium vaccae*, ayant complété la phase 3 des essais cliniques (Bourinbaiar et al. 2020), permettent de protéger les individus et n'induisent pas d'hépatotoxicité.

### Les vaccins sous-unitaires moléculaires :

Les vaccins sous-unitaires moléculaires sont composés uniquement de protéines purifiées spécifiques de l'agent pathogène, qui sont choisies pour induire une réponse

immunitaire chez la majorité des individus. Ce qui en fait le type de vaccin le plus sûr pour les personnes immunodéprimées. Il est important de souligner que le choix des adjuvants est crucial dans le développement de ce type de vaccins.

En effet, les vaccins sous-unitaires ne possèdent pas les PAMP (« *Pathogen-Associated Molecular Patterns* » ou Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes) permettant une activation de la réponse immunitaire innée, ils nécessitent donc de forts adjuvants (Lee et al. 2015). Pendant des décennies, les sels d'alun étaient les seuls adjuvants dont l'utilisation était autorisée pour la production de vaccins humains. Cependant, cet adjuvant n'est pas idéal pour les antigènes intracellulaires tels que *Mtb* car ils n'induisent pas de fortes réponses allant dans le sens d'une immunité Th1. Ainsi, des nouveaux adjuvants ont été développés à base d'émulsion ou de liposomes. Ils interagissent principalement avec les TLRs (« Toll Like Receptors ») et cette interaction facilite leur entrée dans les CD et oriente la réponse immunitaire adaptative vers des réponses Th1, Th2 ou Th17 (Zhang et al. 2023). De plus, les adjuvants permettent une réponse T prolongée dans le temps et favorisent la mise en place d'une immunité mémoire (Pasquale et al. 2015).

Par exemple, le vaccin M72/AS01E, produit par GlaxoSmithKline, est composé d'une protéine de fusion dérivée de deux antigènes mycobactériens, Mtb32A et Mtb39A, et de l'adjuvant AS01E formulé avec des liposomes. Ce vaccin a montré une protection efficace lorsqu'il est administré par voie intramusculaire à des souris et des cochons d'Inde infectés par *Mtb* (Skeiky et al. 2004). De plus, il a offert une meilleure protection à long terme chez les cochons d'Inde et les macaques cynomolgus lorsqu'il est utilisé comme booster du BCG (Reed et al. 2009). En 2018, la phase 2b de l'essai clinique en Afrique a montré que la vaccination par M72/AS01E ne présentait pas d'effets indésirables et était efficace à 54 %, induisant une réponse CD4+ et une réponse humorale spécifiques à M72 (Van Der Meeren et al. 2018). Ces résultats ont été confirmés un an plus tard, après une étude de trois ans menée auprès d'individus résidant en Afrique. Cette fois, l'efficacité était de 49,7 %, et aucun effet secondaire n'a été observé (Tait et al. 2019). Cependant, l'efficacité de ce vaccin a été remise en cause en 2020, et il a été suggéré que le vaccin soit testé sur un échantillon de population plus diversifié, incluant l'Asie et l'Europe, ainsi que sur des personnes appartenant à des groupes d'âge plus variés (Ottenhoff 2020).

Un autre exemple de vaccin sous-unitaire moléculaire en phase 2b d'essai clinique est le ID93+GLA-SE. Il est composé de quatre antigènes mycobactériens (Rv2608, Rv3619,

Rv3620, et Rv1813) et de l'adjuvant GLA-SE, qui est un agoniste du TLR4 (Penn-Nicholson et al. 2018). Ce vaccin, d'abord testé sur les cochons d'Inde, a permis de protéger les animaux contre la souche virulente de laboratoire *Mtb* H37Rv et contre la souche TN5904, qui est une souche MDR (Baldwin et al. 2012). La phase 2a d'essai clinique sur des patients sud-africains a montré que ce vaccin ne comporte pas d'effets indésirables, et qu'il permet d'induire une réponse humorale et cellulaire forte (Day et al. 2021).

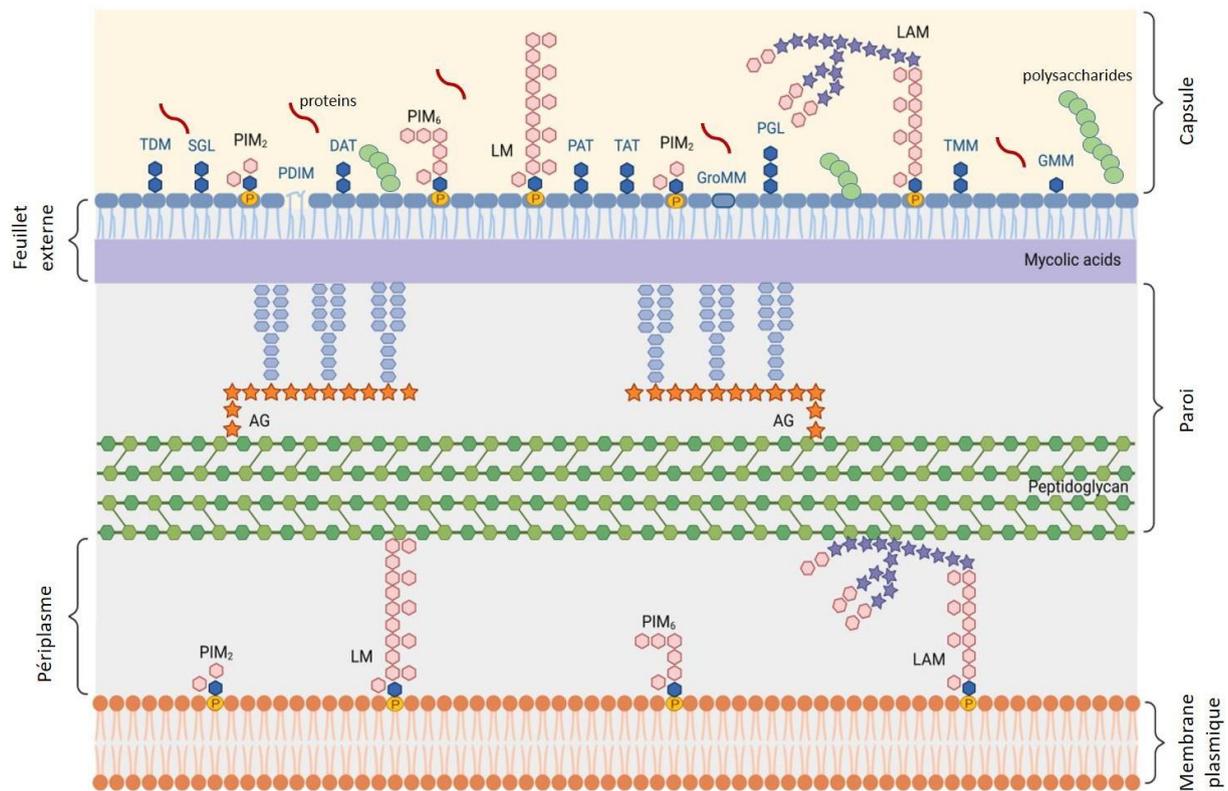
#### Les vaccins sous-unitaires viraux :

Les vaccins sous-unitaires viraux représentent un compromis entre les vaccins constitués d'organismes entiers et les vaccins sous-unitaires moléculaires. En effet, les particules virales, grâce à leurs protéines de surface, sont par nature capables d'être reconnues et internalisées par les cellules humaines. Ces virus sont modifiés génétiquement pour exprimer des antigènes de *Mtb*, et peuvent infecter les cellules de l'individu vacciné afin que ces dernières expriment les protéines de *Mtb* pour induire une forte réponse immunitaire.

Le vaccin MVA85A est un virus de la vaccine modifié qui exprime Ag85, une mycoloyl-transférase produite par *Mtb* développée en 2001 à Oxford. Après des études encourageantes sur les effets de l'immunisation par voie intradermique ou intramusculaire sur modèle murin (Goonetilleke et al. 2003), il a été confirmé que ce vaccin se montre efficace chez le cochon d'Inde (Williams et al. 2005) et le macaque rhésus (Verreck et al. 2009). Le vaccin MVA85A a également passé la phase 1 des essais cliniques et son administration à des enfants et adolescents a été montrée fiable en 2010 (Scriba et al. 2010). Cependant, des études menées en 2013 ont révélé que la réponse immunitaire induite par ce vaccin était trop faible pour permettre une protection des individus, et fut donc considéré comme un échec (Tameris et al. 2013). Des mises au point concernant le nombre et la fréquence de doses à administrer, ainsi que la voie la plus efficace d'administration sont encore en cours. Récemment, il a été montré que MVA85A serait plus efficace en tant que booster en combinaison avec le vaccin Chadox185A, qui exprime également l'antigène 85A dans un vecteur adénovirus simien, actuellement en phase 2 d'essai clinique (Wilkie et al. 2020).

Une approche novatrice explore l'utilisation des lipides de l'enveloppe mycobactérienne en tant que vaccin ou adjuvant. Cette stratégie vaccinale, qui repose sur la

réponse immunitaire adaptative ciblant les lipides mycobactériens, sera détaillée à la fin de l'introduction dans la partie V. Ainsi, certains lipides de l'enveloppe mycobactérienne, qui font la particularité de ce bacille, pourraient permettre le développement de traitements efficaces contre ce dernier.



**Figure 3 : Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne.** Adapté de Correia-Neves et al, Front. Immunol 2022.

Cette enveloppe est composée d'une membrane plasmique séparée de la paroi par le périplasme, ainsi que d'une capsule. La membrane plasmique est une bicouche phospholipidique dans laquelle sont ancrés des lipoglycanes. La paroi est constituée d'un complexe de macromolécules liées de manière covalente : le peptidoglycane et l'arabinogalactane estérifié par des acides mycoliques. Les acides mycoliques forment avec les lipides libres extractibles aux solvants organiques une seconde membrane, appelée feuillet externe, contenant également des lipoglycanes. La paroi est surmontée d'une capsule majoritairement composée de saccharides tels que le glucane. (Chatterjee, 1997 ; Daffe and Draper, 1998; Daffe and Etienne, 1999; Hoffmann et al., 2008; Sani et al., 2010; Zuber et al., 2008).

## II) *Mtb*, une bactérie riche en lipides

### 1) Structure et composition lipidique de l'enveloppe mycobactérienne

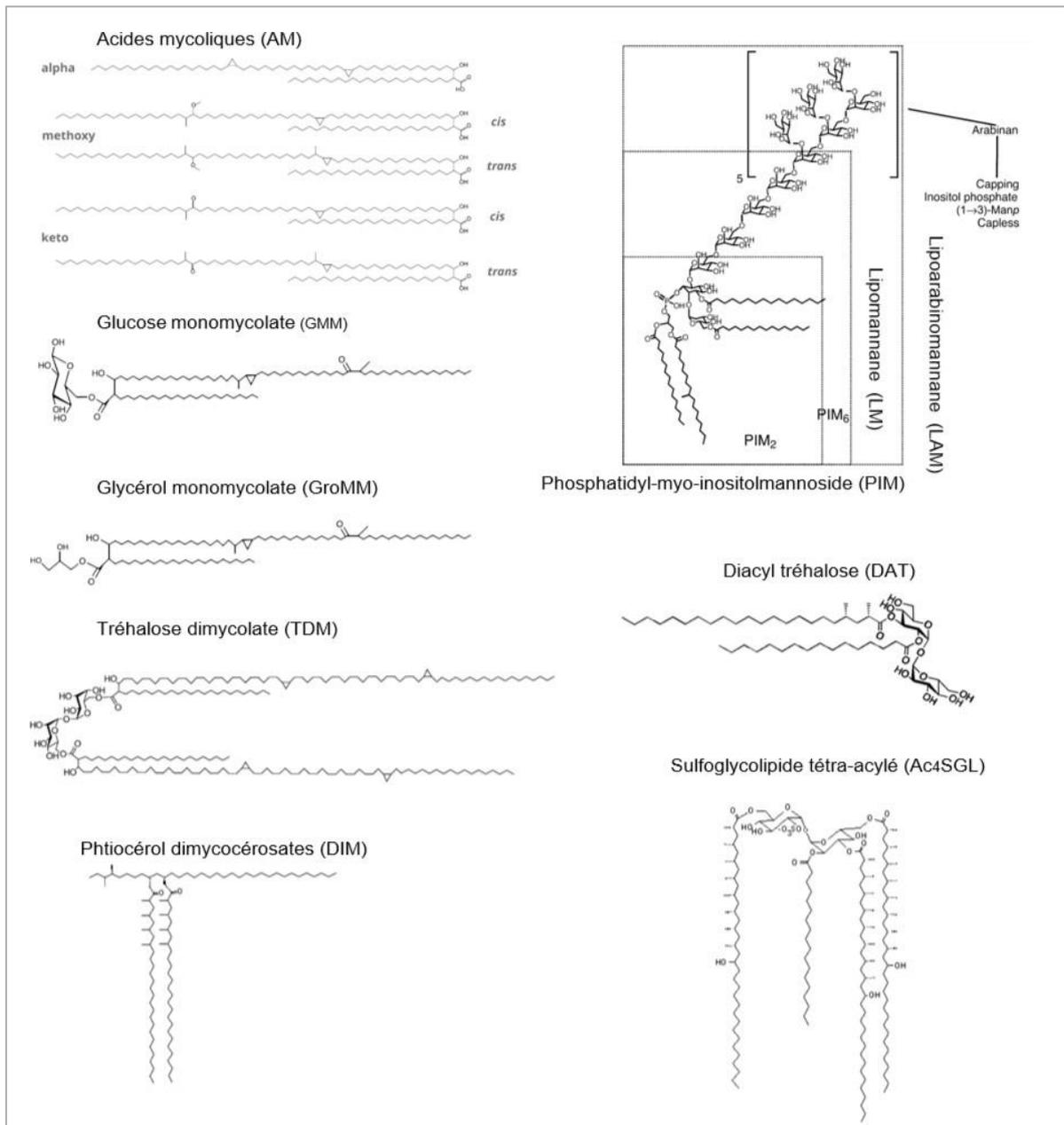
Les mycobactéries possèdent une enveloppe complexe et unique, riche en lipides. Les analyses génomiques montrent que 30 % des gènes exprimés dans la souche *Mtb* H37Rv sont dédiés à la biosynthèse ou au métabolisme des lipides (Cole et al. 1998).

Cette enveloppe comprend plusieurs couches : la membrane plasmique entourant le cytosol, puis une couche de peptidoglycane lié à des molécules d'arabinogalactane estérifiées par des acides mycoliques, formant le feuillet interne d'une bicouche lipidique appelée mycomembrane, et enfin une capsule (**figure 3**). L'enveloppe mycobactérienne joue un rôle essentiel dans l'infection, formant l'interface principale entre la mycobactérie et l'hôte.

#### a) Composition lipidique de la membrane plasmique

La membrane plasmique est une bicouche phospholipidique épaisse d'environ 7 nm, contenant notamment le phosphatidylglycérol (PG) et la phosphatidyléthanolamine (PE), les cardiolipides (CL) et le phosphatidyl-*myo*-inositol (PI) (Rezwan et al. 2007).

Cette couche de l'enveloppe contient également des dérivés du PI, les phosphatidyl *myo*-inositol mannosides (PIM), qui sont présents dans la membrane plasmique comme dans le feuillet externe de l'enveloppe. Il s'agit de lipides mono à tétra-acylés et possédant un à six résidus mannose sur l'inositol (Gilleron et al. 2001; 2003; 2006). Chez *Mtb* et *M. smegmatis*, les PIM les plus communs sont ceux comportant deux et six mannoses, appelés respectivement PIM2 et PIM6. Le lipomannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM) sont deux molécules dérivées des PIMs, ancrées à la membrane plasmique. Le LM est un PIM contenant une chaîne polymannosylée supplémentaire composée de 7 à 35 résidus mannoses (Gilleron et al. 1999). Enfin, le LAM est un LM avec un domaine arabinane. Le LAM peut contenir différentes coiffes osidiques à l'extrémité de l'arabinane selon la souche bactérienne (Venisse et al. 1993; Gilleron et al. 2000 ;Nigou et al. 2003). En effet, chez *Mtb* et *M. avium*, la coiffe est composée d'un à trois mannoses, d'où l'appellation de LAM mannosylé (ManLAM) (Chatterjee et al. 1992). De manière différente, les LAM des souches de mycobactéries à croissance rapide comme *M. smegmatis* portent des coiffes phospho-*myo*-



**Figure 4 : Structures de certains lipides présents dans le feuillet externe de l'enveloppe mycobactérienne.**

L'ensemble des lipides extractibles de l'enveloppe présente une grande diversité de structure. Le GMM, GroMM et TDM, sont des dérivés des acides mycoliques (AM). Les DAT sont des tréhaloses di-acylés par des acides gras de courte chaîne. Les Ac4SGL sont des SGL tétra-acylés. Le LAM et le LM sont des dérivés des PIMs. DIM : phtiocérol dimycocérosates.

inositol (PILAM) et celui de *M. chelonae* ne porte pas de coiffe (AraLAM). D'autres composés sont présents dans la membrane plasmique mycobactérienne. Parmi eux, les phosphopolyprénols sont impliqués dans la biosynthèse des polymères saccharidiques, et les caroténoïdes, présents en quantité variable selon les espèces mycobactériennes, sont à l'origine de la pigmentation des mycobactéries photochromogènes. La membrane contient également des ménaquinones et diverses protéines.

## **b) Composition lipidique de la paroi**

La paroi de *Mtb* est composée du complexe mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycane (mAGP), qui est un assemblage de trois molécules liées par des liaisons covalentes : le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques (AM).

Le peptidoglycane est un hétéropolymère complexe et insoluble dans l'eau constitué d'unités répétées de N-acétylglucosamine et d'acide muramique modifié. Cette structure assure la protection mécanique des mycobactéries contre la pression osmotique (Crick et al. 2001). Le peptidoglycane est lié à l'arabinogalactane par un lien phosphodiester (McNeil et al. 1990). L'arabinogalactane est un polysaccharide complexe, composé d'un domaine galactane relié à trois domaines arabinane chez *Mtb* (Besra et al. 1995 ; McNeil et al. 1990). Les extrémités non réductrices des arabinanes sont estérifiées par les AM, et forment le feuillet interne de la membrane externe. Les AM sont caractéristiques du genre *Mycobacterium* (Besra et al. 1995). Ils sont  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés, leur longueur variant selon l'espèce bactérienne. Par exemple, les AM de *Corynebacterium glutamicum* contiennent entre 22 et 36 atomes de carbone, tandis que ceux de *Mtb* sont beaucoup plus longs, variant de 60 à 90 atomes de carbone (Marrakchi et al. 2014). La chaîne principale, nommée chaîne méromycolique, est composée d'environ cinquante atomes de carbone. Cette chaîne est décorée par divers groupements fonctionnels en position proximale et distale par rapport à la fonction acide carboxylique (**figure 4**). Ces groupements peuvent être des insaturations, des cyclopropanes, des cétones, des alcools ou des éthers, avec les motifs oxygénés présents uniquement au-delà de 35 atomes de carbone de distance avec l'acide carboxylique.

## **c) Composition lipidique du feuillet externe**

Le feuillet externe de la mycomembrane contient une grande variété de lipides. Ces lipides sont dits extractibles, car ils peuvent l'être facilement par des solvants organiques.

Certains de ces lipides sont ubiquitaires au genre *Mycobacterium*, et d'autres propres à certaines espèces. Ainsi, l'analyse biochimique de la composition lipidique d'une souche mycobactérienne peut permettre de caractériser son espèce (Luquin et al. 1991).

Les dérivés des AM, tels que les tréhalose mono- et di-mycolate (TMM et TDM), le glucose monomycolate (GMM) et le glycérol monomycolate (GroMM) sont par exemple présents dans toutes les espèces mycobactériennes. Le TDM correspond à une unité de tréhalose estérifiée en position 6 et 6' par des AM. Le TMM et le GMM portent un seul AM en position 6 du glucose. Les lipo-oligosaccharides (LOS), les mannosyl-phosphomycokétides (MPM) et les PIMs, LM et LAM, sont également présents dans ce feuillet de manière ubiquitaire, sauf pour les LOS, uniquement retrouvé à ce jour chez *M. canettii*.

Le feuillet externe contient aussi les dérivés de mycocérosates : les phthiocérols dimycosérosates (DIM) et les glycolipides phénoliques (PGL). Ces lipides, produits par un nombre restreint de mycobactéries, sont structurellement très proches, et possèdent une longue chaîne de  $\beta$ -diol ou phthiocérol, sur laquelle sont estérifiés deux acides gras méthylbranchés de 27 à 35 carbones appelés acides mycocérosiques, possédant soit une fonction méthoxyle (DIM A), soit une fonction cétone (DIM B). Les PGL partagent avec les DIM le corps lipidique, mais auquel est greffé un groupement phénol glycosylé. Ce dernier est composé de 1 à 5 sucres dont la composition varie selon les espèces mycobactériennes (Puzo et al. 1990).

La famille de lipides contenant du tréhalose est composée par les TMM et TDM déjà présentés, ainsi que les diacyltréhaloses (DAT), les triacyltréhaloses (TAT) et les poly- ou pentaacyltréhaloses (PAT). Les DAT, TAT et PAT sont constitués d'un tréhalose acylé par un acide palmitique ou stéarique en position 2 préférentiellement, et par un acide gras saturé diméthyle ramifié (acide mycosanoïque), ou tri-méthyle ramifié contenant une insaturation (acide phtiénoïque) ou un groupement hydroxyl (acide mycolipanolique) sur les autres positions (Minnikin et al. 1985). Ces lipides ne sont retrouvés que chez les mycobactéries du complexe MTBC.

Enfin, les sulfoglycolipides (SGL) constituent une famille de glycolipides spécifiques de *Mtb*. Ce sont des lipides contenant un tréhalose multiacylé (Ac1SGL à Ac4SGL) et sulfaté en position 2'. Ils sont estérifiés par un acide palmitique ou stéarique en position 2, et par un à trois acides gras particuliers, nommés acides phthiocéranoniques et hydroxyphthiocéranoniques en position 3, 6 et 6'. L'enveloppe de *Mtb* contient majoritairement des Ac4SGL (Layre et al. 2011).

#### **d) Composition de la capsule :**

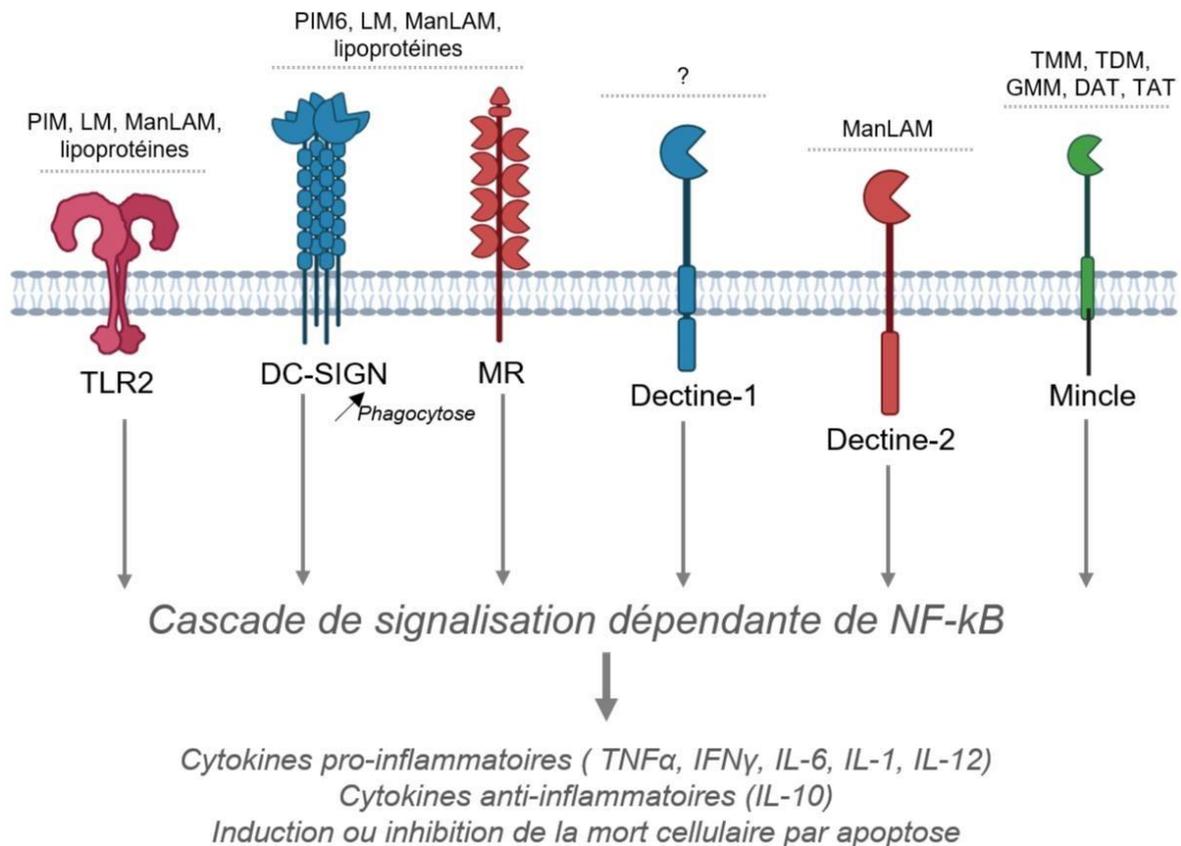
La capsule des mycobactéries, d'une épaisseur variant de 30 à 40 nm (Sani et al. 2010), est principalement constituée de polysaccharides tels que les polymères d' $\alpha$ -glucane, de mannane et d'arabinomannane, ainsi que de protéines et de lipoprotéines, avec une proportion moindre de lipides (Daffé et al. 1999). Les lipides présents dans la capsule proviennent principalement de la partie hydrophile des lipides extractibles de la membrane externe (Ortalo-Magné et al. 1996). Ces polysaccharides jouent un rôle crucial dans les premières étapes de l'infection en régulant la phagocytose et en modulant la réponse immunitaire de l'hôte.

Les lipides de l'enveloppe mycobactérienne constituent une caractéristique majeure de ce genre bactérien. Ils jouent un rôle crucial dans sa virulence, son échappement à la réponse immunitaire et sa reconnaissance par ce système. Leur complexité et leur diversité structurale permettent à *Mtb* d'interagir avec l'hôte, et la compréhension de ces mécanismes est essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales contre la Tb.

#### **2) Rôle des lipides mycobactériens dans la virulence**

Les macrophages alvéolaires sont les principales cellules ciblées par *Mtb*. Ils représentent plus de 90 % des cellules intra-alvéolaires et jouent un rôle crucial dans les défenses anti-infectieuses grâce à leur synthèse de peptides antimicrobiens et leur activité de phagocytose. Certains lipides de l'enveloppe mycobactérienne contribuent à la pathologie induite par l'infection, car ils peuvent déjouer les stratégies antimicrobiennes de ces macrophages. De nombreuses études ont été publiées sur ce sujet, mais ne s'agissant pas du thème de ma thèse, certains exemples seulement sont présentés dans ce paragraphe et cette liste n'est pas exhaustive.

Le TDM est par exemple responsable de la survie intracellulaire de *Mtb*, en inhibant la fusion du phagosome avec le lysosome (Spargo et al. 1991), ce qui empêche les macrophages de se débarrasser du pathogène complètement. De la même façon, les DIM permettent également d'inhiber la formation du phagolysosome (Pethe et al. 2004) et confèrent une protection à la bactérie contre les réactifs bactéricides produits par les macrophages, permettant la survie et la croissance de la bactérie dans le phagocyte (Rousseau et al. 2004). De plus, les DIM s'insèrent dans les membranes des cellules hôtes, et en perturbent l'organisation, ce qui conduit à une meilleure efficacité d'endocytose des



**Figure 5 : Quelques Pattern Recognition Receptor ( PRR ) à la surface des CPA impliqués dans l'interaction avec les lipides mycobactériens.**

Les PRR sont des récepteurs de l'immunité innée capables de reconnaître des motifs conservés chez les micro-organismes. Plusieurs de ces récepteurs sont capables de lier les composés lipidiques mycobactériens, ce qui conduit à l'internalisation du pathogène (c'est le cas pour la molécule DC-SIGN et le RM) , ainsi qu'à la sécrétion de cytokines et chimiokines qui signalent aux cellules voisines la présence du pathogène.

bacilles dans ces cellules (Astarie-Dequeker et al. 2009). Les SGL sont également impliqués dans la pathologie mycobactérienne. *In vitro*, ils sont capables eux-aussi de bloquer la formation du phagolysosome des macrophages (Pabst et al. 1988). De plus, lorsque la protéine MmpL8, responsable de l'étape finale de la biosynthèse des SGL est mutée, la virulence de *Mtb* est atténuée chez la souris (Converse et al. 2003). *Mtb*, en produisant du ManLAM, peut agir également sur la fusion du phagolysosome. Le ManLAM agit en modulant la concentration de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), ce qui permet d'inhiber le recrutement de la protéine EEA1, responsable du remplacement de la protéine Rab5 par Rab7, ce remplacement étant une étape clé de la fusion phagolysosomale (Vergne et al. 2004).

Ces lipides de l'enveloppe, en partie responsables de la survie du pathogène dans les macrophages alvéolaires, sont également reconnus par le système immunitaire inné, ce qui permet à la fois leur internalisation, mais aussi l'activation de voies de contrôle de la prolifération bactérienne au sein de ces cellules.

### **3) Reconnaissance des lipides mycobactériens par le système immunitaire inné**

Certains lipides présents dans l'enveloppe mycobactérienne sont reconnus par le système immunitaire inné et peuvent le moduler, en jouant un rôle agoniste ou antagoniste sur les PRR. Ces récepteurs sont essentiels pour identifier les PAMP, des motifs moléculaires conservés présents sur une large gamme de microbes tels que les bactéries, virus, champignons et parasites. En détectant ces motifs, les PRRs déclenchent des cascades de signalisation intracellulaires qui aboutissent à l'activation de réponses immunitaires innées, notamment la production de cytokines pro-inflammatoires et l'induction de la phagocytose. Parmi les principaux types de PRR figurent notamment les TLR et les lectines de type C (CLR). D'autres PRR, comme les NOD-like-receptors (NLR) et les « RIG-like receptors » (RLR) sont également capables de reconnaître des composés de l'enveloppe mycobactérienne, mais ne seront pas évoqués dans ce manuscrit. Chaque famille de PRR reconnaît des PAMP spécifiques, permettant ainsi une réponse immunitaire diversifiée et adaptée à une variété de pathogènes. En somme, les PRR, via la reconnaissance des PAMP, forment une interface cruciale entre le système immunitaire inné et les agents pathogènes, assurant une reconnaissance rapide et une réponse efficace pour contenir et éliminer les infections (**figure 5**).

### a) Les “Toll-like receptor” (TLR)

Les TLR sont des PRR localisés au niveau des membranes plasmiques et endosomales des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ils sont stimulés par la détection d'une large gamme de PAMP, et cela déclenche des voies de signalisation dépendante de NF- $\kappa$ B («Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells») et de IRF (facteur régulateur de l'IFN), ce qui permet l'activation d'une réponse pro-inflammatoire, avec sécrétion de TNF- $\alpha$  («Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ») et IL-12 (Kawasaki et al. 2014). Les TLRs impliqués dans la reconnaissance des lipides de *Mtb* sont le TLR2 majoritairement, mais également le TLR4. TLR9 ne reconnaît pas de lipides mais reconnaît l'ADN riche en motifs CpG non méthylés présents dans les bactéries, y compris *Mtb*.

Les agonistes d'origine mycobactérienne de TLR2 sont des lipoprotéines et des lipoglycanes, à savoir les PIM et leurs dérivés LM et LAM. Les TLR sont présents à l'état de dimères, et le TLR2 fonctionne en hétérodimère avec les TLR1 ou TLR6, ces deux hétérodimères reconnaissent différentes acylformes des ligands. Ceci a été démontré dans le cas des lipoprotéines. En effet, celles qui sont triacylées sont principalement reconnues par les dimères TLR2 / TLR1, alors que les lipoprotéines diacylées sont ligands des dimères TLR2 / TLR6 (Ozinsky et al. 2000). Les lipoglycanes PIM, LM et LAM possèdent un motif conservé, à savoir le mannosyl-phosphatidyl-*myo*-inositol (ancrage MPI) qui contient une tête polaire saccharidique ainsi que quatre sites d'acylation potentiels. Les parties polaires et apolaires sont impliquées dans la reconnaissance par le TLR2. En effet, seules les formes tri- et tétra-acylés sont ligands du dimère TLR2/TLR1, et contrairement aux lipoprotéines, les lipoglycanes mono- et di-acylés ne sont pas des ligands de TLR2, même en dimère avec TLR6 (Gilleron et al. 2006). Une hypothèse pouvant expliquer cela est que la structure de l'ancrage MPI provoque un encombrement stérique trop important pour permettre la dimérisation entre TLR2 et un autre TLR (Ray et al. 2013). La partie saccharidique joue également un rôle, et l'activation des voies dépendantes de TLR2 dépend de la longueur de la chaîne mannane (Pitarque et al. 2008). Ainsi, les LM sont de plus puissants agonistes du TLR2 que les PIM, mais les LAM sont les agonistes les plus faibles du fait de la gêne stérique causée par sa partie polaire importante (Vignat et al. 2003). La liaison de ces ligands induit la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- $\alpha$ . Cette réponse permet d'une part l'activation des macrophages, et d'autre part d'orienter les LT vers un phénotype cytotoxique (Salgame et al. 2005; Stenger et al. 2002).

Le TLR4 reconnaît le LPS des bactéries Gram-, qui n'est pas présent chez les

mycobactéries, dont aucun lipide n'a été identifié comme ligand du TLR4. Les protéines secrétées par la majorité des mycobactéries nommées « heat shock protein » (hsp) 60 et hsp65 sont en revanche des ligands connus de TLR4 (Bulut et al. 2005). L'implication de ce récepteur dans la reconnaissance du bacille par les macrophages a été étudiée dans le modèle murin. Ce TLR semble nécessaire pour permettre une protection contre l'infection par *Mtb* via la régulation négative de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, ainsi que le recrutement des neutrophiles pendant l'infection, cela a été observé en comparant des souris déficientes en TLR4 à des souris WT (Park et al. 2020).

## **b) Les récepteurs lectiniques de type C**

Les CLR sont des récepteurs qui reconnaissent de manière dépendante du calcium les unités mono ou oligosaccharidiques des ligands glycosylés. Les glycolipides mycobactériens sont reconnus par plusieurs CLR en surface des CPA. Les récepteurs DC-SIGN (« Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin »), le récepteur au mannose (RM), les Dectines-1 et -2 (« dendritic cell-associated C-type lectin »), et Mincle (Macrophage inducible Ca<sup>2+</sup> -dependent (C-type) lectin) sont des exemples.

Les récepteurs DC-SIGN, présent sur les CD et RM, présent sur les CD et macrophages, reconnaissent les coiffes mannosyles des glycolipides mycobactériens, dont principalement le ManLAM, mais également le LM et les PIM6 (Maeda et al. 2003; Schlesinger et al. 1994; Venisse et al. 1995). La reconnaissance des lipoglycannes de *Mtb* par ces deux récepteurs conduit à la phagocytose de la bactérie et constitue donc une voie d'entrée principale pour le pathogène dans les macrophages (Tailleux et al. 2003). En plus de favoriser l'internalisation de la bactérie, la liaison du ManLAM aux récepteurs DC-SIGN et RM régule l'activation des voies de signalisation induites par les TLR et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-12 et le TNF- $\alpha$ , tout en augmentant la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Nigou et al. 2001). La reconnaissance du ManLAM par ces récepteurs a également pour conséquence de limiter l'activation des macrophages et d'éviter l'apoptose et la production de radicaux oxygénés, ce qui favorise la survie intracellulaire de *Mtb* (Nigou et al. 2002; Rojas et al. 2000).

L'organisation des ligands en domaines paraît cruciale pour la reconnaissance par DC-SIGN. En effet, alors que les ligands glycoconjugués de DC-SIGN sont omniprésents parmi les espèces mycobactériennes, le récepteur se lie sélectivement aux espèces pathogènes du complexe MTBC (Pitarque et al. 2005). Une étude publiée en 2023 par l'équipe montre que



le mécanisme moléculaire derrière cette spécificité de reconnaissance pourrait s'expliquer par l'organisation spatiale des ligands en surface des bactéries. En effet, la distribution des ligands de DC-SIGN diffère entre *M. bovis* BCG, espèce modèle du MTBC, et *M. smegmatis*. Les ligands sont concentrés en nanodomains denses sur *M. bovis* BCG, ce qui fait que lors de l'adhésion des bactéries aux cellules hôtes, les nanodomains de ligands induisent le recrutement et l'agrégation de DC-SIGN (Viljoen et al. 2023).

Les CLR Dectine-1 et Dectine-2 sont exprimés en surface des macrophages, des CD et des neutrophiles. A ce jour, le ligand mycobactérien de Dectine-1 reste inconnu (Wagener et al. 2018), bien que son implication dans la reconnaissance des mycobactéries ait été établie en 2007 par Rothfuchs et al., démontrant que l'inhibition de Dectine-1 menait à une diminution de production d'IL-12 (Rothfuchs et al. 2007). Dectine-2 a pour seul ligand le ManLAM (Decout et al. 2018), cette liaison induit la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et anti-inflammatoires, comme l'IL-10 (Yonekawa et al. 2014).

Quant à Mincle, il est exprimé majoritairement en surface des macrophages. Il reconnaît le TDM, le glycolipide le plus abondant de la paroi mycobactérienne (Ishikawa et al. 2009; Lang et al. 2013), mais également les glycolipides TMM, GMM, DAT et TAT (Hattori et al. 2014 ; Decout et al. 2017). La reconnaissance du TDM induit une réponse pro-inflammatoire via la voie NF- $\kappa$ B *in vitro* (Ishikawa et al. 2009; Schoenen et al. 2010). Pour le moment, le rôle de ce récepteur dans l'infection *in vivo* reste à déterminer.

Les lipides mycobactériens jouent un rôle crucial dans l'interaction avec le système immunitaire. En effet, ils ne sont pas seulement reconnus par le système immunitaire inné, mais ils activent également le système immunitaire adaptatif. Cette reconnaissance est médiée par la présentation des antigènes lipidiques par les molécules du « Cluster of Differentiation 1 » (CD1) aux cellules T. Ce mécanisme de présentation antigénique permet d'élargir l'efficacité de la réponse immunitaire, rendant la vaccination par lipides mycobactériens une stratégie prometteuse pour le développement de nouveaux vaccins.

	CD1a	CD1b	CD1c	CD1d	CD1e
Humain	1	1	1	1	1
Singe Rhésus	1	1	1	1	1
Cochon d'Inde	1	5	4	1	1
Souris				2	
Bovin	1	5		2	1
Cochon	1	5	4	1	1
Cheval	5	2	1	1	2
Chien	6	1	1	1	1
Lapin	2	1	1	1	1

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes copies des isoformes CD1 présentes chez les mammifères.** L'homme possède une seule copie de chaque isoforme, tandis que le modèle murin ne possède que deux copies de l'isoforme CD1d, ce qui fait du cochon d'Inde le modèle animal le plus approprié. Ce rongeur présente un plus grand nombre de copies des isoformes CD1b et CD1c.

### **III) Présentation des antigènes lipidiques par les protéines CD1**

#### **1) Les protéines CD1**

La grande majorité des études portant sur le rôle des LT dans la réponse immunitaire se concentrent sur la réponse aux antigènes peptidiques présentés par les molécules du CMH de classe 1 et 2. En 1989, Porcelli et al. identifient pour la première fois un clone de LT CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (DN) activé par les protéines CD1. La nature de l'antigène responsable de cette activation est alors inconnue (Porcelli et al. 1989). La nature lipidique de ces antigènes est découverte en 1994 (Beckman et al. 1994).

#### **a) La famille de gènes CD1**

Le génome humain possède sur le chromosome 1 une famille de cinq gènes CD1 (CD1A-E), codant pour les protéines CD1a, CD1b, CD1c, CD1d et CD1e (Calabi et al. 1986). Ces protéines sont classées en trois groupes selon leurs homologies de séquence. Le groupe 1 est composé des protéines CD1a, CD1b, et CD1c, le groupe 2 contient la protéine CD1d et la protéine CD1e représente le groupe 3 (Dascher et al. 2003). Ces trois groupes de protéines ont également des profils d'expression et des fonctions distinctes.

Les gènes CD1 sont conservés chez tous les mammifères, où des orthologues ont été identifiés, mais en différentes copies pour chaque isoforme (**tableau 2**). La souris ne possède que deux gènes CD1, qui expriment les protéines CD1d.1 et CD1d.2, deux protéines s'apparentant à la protéine CD1d humaine (Dascher et al. 2003). Le cochon d'Inde exprime quatre homologues de la protéine CD1b humaine, trois homologues de la protéine CD1c, et un homologue de la protéine CD1e, et représente donc le meilleur modèle animal pour l'étude des protéines du groupe 1 (Dascher et al. 1999; Hiromatsu et al. 2002).

Contrairement aux protéines du CMH, les protéines CD1 ne sont pas polymorphes. Bien que des variations ponctuelles (SNP) aient été identifiées pour les protéines CD1a et CD1b humaines, celles-ci n'affectent pas leurs capacités à charger ou présenter des antigènes lipidiques (Han et al. 1999). Cependant, pour CD1e, certaines mutations rares naturellement présentes dans la population confèrent des propriétés différentes aux variants, compromettant ainsi leur fonction et menant à une réponse immunitaire altérée (Tourne et al. 2008).

#### **b) Les cellules humaines exprimant les protéines CD1**

L'isoforme CD1d est exprimée à la surface de l'ensemble des cellules hématopoïétiques (lymphocytes B, LT, monocytes, macrophages, CD) ainsi qu'au sein de nombreux épithéliums, comme l'épithélium gastro-intestinal (Van De Wal et al. 2003). Les protéines CD1 du groupe 1 sont exclusivement exprimées par les CPA, à savoir les CD, les lymphocytes B et les cellules de Langerhans. Parmi ces différentes CPA, les CD sont les seules cellules qui expriment les cinq isoformes de CD1 chez l'homme.

Lorsque les monocytes sont traités avec de l'IL-4 et du GM-CSF, cytokines permettant la différenciation en CD myéloïdes, les protéines CD1 du groupe 1 sont exprimées à la surface (Kasinrerk et al. 1993; Porcelli et al. 1992; Sieling et al. 1999). Les cellules de Langerhans, qui sont des CPA de la peau, expriment CD1c mais surtout CD1a (Peña-Cruz et al. 2003). La protéine CD1c est également exprimée par certains lymphocytes B (Small et al. 1987). La protéine CD1b, longtemps décrite comme présente uniquement sur les CD, a également été reportée comme exprimée sur les macrophages alvéolaires (Ween et al. 2021). L'isoforme CD1e est exclusive aux CD (Angénieux et al. 2005).

### c) **Impact du métabolisme cellulaire sur l'expression des protéines CD1**

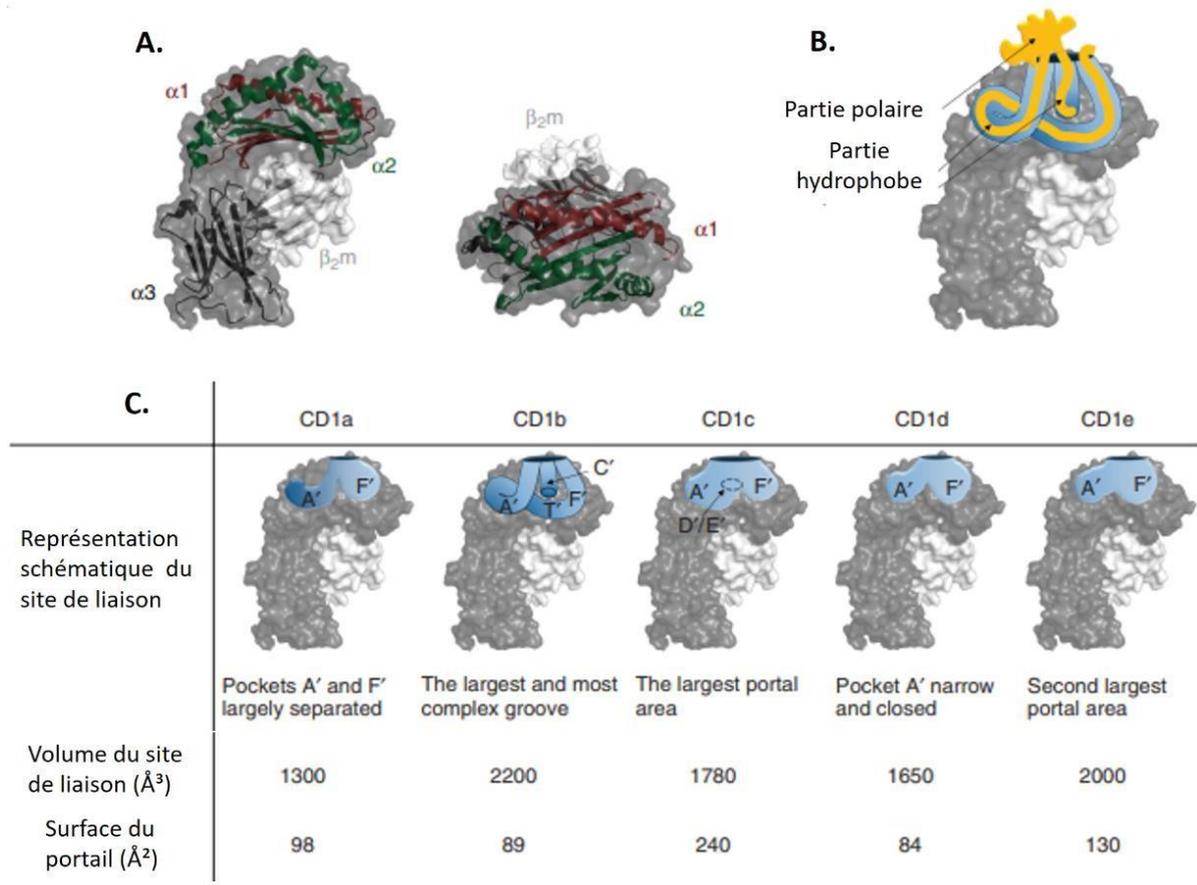
Certains acteurs du métabolisme des CPA ont été identifiés comme jouant un rôle important dans l'expression des protéines du CD1.

Un de ces acteurs dans les CD est la protéine PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), un récepteur nucléaire qui contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Keller et al. 1993). Lorsque les monocytes humains sont différenciés en CD *in vitro*, PPAR $\gamma$  est fortement induit quelques heures après la différenciation, ce qui permet d'augmenter l'internalisation des lipides exogènes. PPAR $\gamma$  permet l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse du rétinol, ce qui induit une augmentation de la quantité d'acide rétinoïque dans la cellule. Ceci a pour conséquence l'activation du facteur de transcription RAR $\alpha$  (retinoic-acid receptor  $\alpha$ ), qui induit l'expression de gènes, dont CD1d et l'inhibition de l'expression des protéines CD1 du groupe 1 (Szatmari et al. 2004; 2006). L'idée selon laquelle les lipides de l'environnement cellulaire influent sur l'expression des protéines CD1 a été également étudiée en 2008 par Leslie et ses collaborateurs (Leslie et al. 2008). En effet, les lipides du sérum acide lysophosphatidique et cardiolipine, permettent également l'activation de PPAR $\gamma$ , et permettent donc une régulation négative de l'expression des protéines CD1 du groupe 1, et une augmentation de l'expression de CD1d. La régulation de l'expression des

protéines CD1 par PPAR $\gamma$  est également observée dans les LB. Ces cellules expriment CD1c et CD1d et l'expression des deux protéines est inhibée par le CD40-ligand seul (CD40L), car cette molécule induit une réduction de l'expression des gènes de réponse au RAR $\alpha$ , réduisant l'expression des protéines CD1 (Allan et al. 2011).

La protéine AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) permet également la régulation de l'expression des protéines CD1. Cette protéine augmente les voies d'oxydation des acides gras lorsque les cellules nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP (Herzig et al. 2018). Webb et ses collaborateurs ont montré que le traitement des CPA avec un activateur de l'AMPK permet de contrer l'inhibition de l'expression de CD1d suite à l'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (Webb et al. 2016). Ces découvertes suggèrent que le métabolisme des cellules influe sur la présentation des antigènes lipidiques, et que ces mécanismes sont perturbés lors d'infections virales.

Le stress cellulaire localisé dans le réticulum endoplasmique (RE) influe également sur la présentation de lipides endogènes par les protéines CD1 en surface des CPA. Cela se produit par un mécanisme dépendant de la protéine PERK (PKR-like ER kinase), localisée dans la membrane du RE qui permet la réduction de la traduction des ARNm lors de l'accumulation de protéines mal repliées. Le mécanisme exact n'est pas encore bien décrit, mais l'impact du stress du RE sur le cytosquelette pourrait permettre d'augmenter la présentation de CD1d à la surface (Bedard et al. 2019). Ces découvertes ont été précisées un an plus tard par Govindarajan et al, qui ont montré que la présentation de lipides endogènes est augmentée lors du stress du RE dans un mécanisme dépendant de deux protéines de l'UPR (UPR : Unfolded protein response) : la PERK, mais aussi l'inositol-requiring enzyme-1a (IRE1a). En effet, lors de stress, ces deux protéines permettent la régulation de la biosynthèse des lipides des membranes du RE et de la cellule. Elles favorisent donc la production de lipides neutres et jouent donc sur la disponibilité des lipides immunogènes (Govindarajan et al. 2020).



**Figure 6 : Caractéristiques des protéines CD1 humaines.**

**A)** Structure en vue latérale (gauche) et supérieure (droite) de CD1b, composée des trois domaines extracellulaires  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$ , lié non covalentement à la  $\beta 2m$  et reposant sur des feuillets  $\beta$  en noir. Les domaines impliqués dans la liaison aux antigènes lipidiques sont colorés en rouge et vert. **B)** Représentation schématique du mode de liaison des molécules amphiphiles sur CD1b. **C)** Tableau bilan des différentes structures des protéines CD1.

Figure de Layre et al. 2015.

#### d) Structure des protéines CD1

La structure des protéines CD1 est similaire à celle du CMH 1. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans la **figure 6**. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires d'environ 45 kDa, constituées d'une chaîne lourde organisée en trois domaines extracellulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , à l'instar de ceux du CMH 1, sont formés de deux hélices  $\alpha$  antiparallèles situées au-dessus d'un feuillet  $\beta$  comportant six brins. Le domaine  $\alpha 3$ , le plus proche du domaine transmembranaire, interagit de manière non covalente avec la  $\beta 2$ -microglobuline ( $\beta 2m$ ), une protéine de 12 kDa (Ly et Moody 2014). Cette sous-unité est essentielle pour l'expression en surface des isoformes CD1a, CD1b et CD1c (Bauer et al. 1997). Cependant, il a été observé que CD1d peut être exprimée à la surface des cellules sans se lier à la  $\beta 2m$  (Kim et al. 1999). La principale différence entre les protéines du CMH 1 et les protéines du CD1 réside dans les sillons destinés à accueillir les antigènes, qui sont dans la majorité des cas, des lipides amphiphiles. Les protéines CD1 possèdent des sillons profonds composés d'acides aminés hydrophobes au niveau des domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , qui permettent la prise en charge de la partie lipidique de ces glycolipides. La partie polaire est ainsi exposée à la surface et joue un rôle majeur dans la reconnaissance par les LT. Les protéines du CD1 possèdent des sillons qui varient en taille, forme et nombre (Moody et Cotton 2017), mais toutes possèdent au minimum deux poches hydrophobes appelées A' et F'.

L'isoforme CD1a possède la cavité la plus étroite, mesurant  $1300 \text{ \AA}^3$ . Elle est dotée des deux sillons A' et F'. La poche A' est fermée en une extrémité et fusionne avec la poche F' à l'autre extrémité. La poche F' a une conformation semi-ouverte, peu profonde et large (Zajonc et al. 2003). Cette structure facilite l'échange de lipides à la surface cellulaire sans nécessiter de protéines assurant le transfert lipidique ou un pH faible (Salio et al. 2014). La structure cristallographique de CD1a chargée avec le lipide endogène sulfatide révèle que la poche A' de CD1a semble tronquée par rapport aux autres isoformes et ne peut contenir

Isoforme	Antigène	Origine	Référence
CD1a	Didésoxymycobactine (DDM)	<i>Mycobacterium</i>	Moody et al., 2004
	Sulfatides	Endogène	Shamshiev et al., 2002
CD1b	Acides mycoliques (AM)	<i>Mycobacterium</i>	Beckman et al., 1994
	Glucose monomycolate (GMM)	<i>Mycobacterium</i>	Moody et al., 1997
	Glycérol monomycolate (GroMM)	<i>Mycobacterium</i>	Layre et al., 2009
	Sulfoglycolipides di-acylés (Ac2SGL)	<i>Mycobacterium</i>	Gilleron et al., 2004
	Lipoarabinomannane (LAM) Lipomannane (LM)	<i>Mycobacterium</i>	Sieling et al., 1995
	Phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIM)	<i>Mycobacterium</i>	Sieling et al., 1995;
	Diacyltréhaloses (DAT)	<i>Mycobacterium</i>	Reijneveld et al., 2021
	BbGL-II	<i>Borrelia</i>	Reinink et al., 2009
	Sulfatides	Endogène	Shamshiev et al., 2002
	Gangliosides : GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, sphingomyéline	Endogène	Shamshiev et al., 1999 Shamshiev et al., 2000
	Phospholipides (PC, PE, PI, PS, PG)	Endogène	Huang et al., 2011 Shahine et al., 2017
CD1c	Mannosyl-β-1-phosphomycokétides (MPM) Phosphomycokétide (PM)	<i>Mycobacterium</i>	Moody et al., 2000 Ly et al., 2013
	Sulfatides	Endogène	Shamshiev et al., 2002
CD1d	α-glucuronylcéramide	<i>Sphingomonas</i>	Kinjo et al., 2005; Mattner et al., 2005
	α-galactosyl-diacylglycérol	<i>Borrelia</i>	Kinjo et al., 2006
	α-glucosyl-diacylglycérol	<i>Streptococcus</i>	Girardi et al., 2012
	α-Galactosylcéramide (α-GalCer)	<i>Agelas mauritanus</i>	Kawano et al., 1997
	Lipophosphoglycane	<i>Leishmania</i>	Amprey et al., 2004
	Sulfatides	Endogène	Zhou et al., 2004
	Gangliosides iGb3/iGb4, GD3	Endogène	Wu et al., 2003 Zhou et al., 2004
	Phospholipides (PC, PE, PI, PS, PG, LysoPC)	Endogène	Yuan et al., 2009 Brennan et al., 2017 Fox et al., 2009

**Tableau 3 : Liste des lipides présentés par les différentes isoformes CD1.**

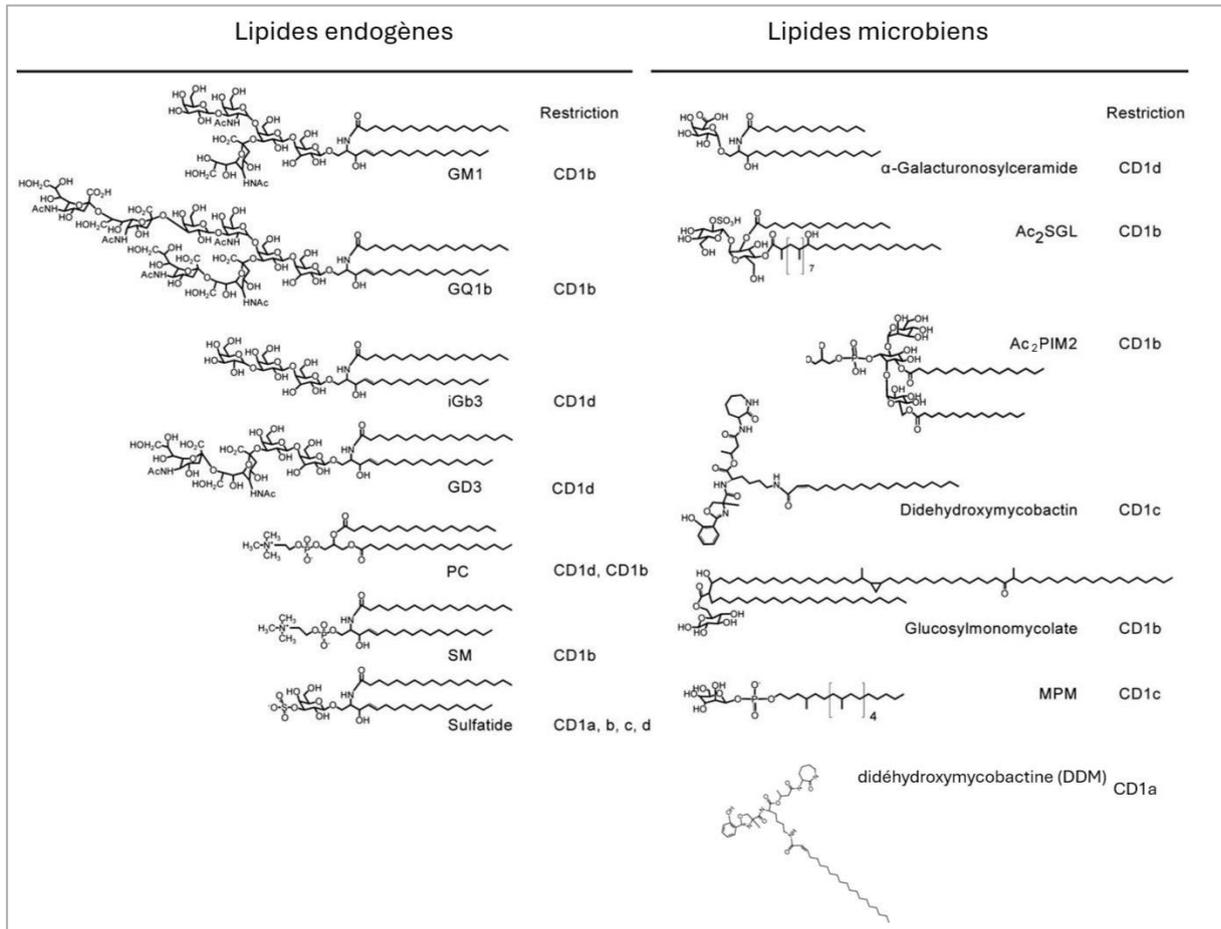
Les antigènes sont soit d'origine endogène (propre à l'hôte), soit d'origine exogène (en cas d'infection). Les isoformes présentatrices sont indiquées pour chaque antigène.

que des chaînes d'acides gras de 18 à 23 atomes de carbone. CD1a peut également présenter des lipopeptides, comme la didésoxymycobactine (DDM), un lipopeptide mycobactérien pourvu d'une seule chaîne lipidique. Dans ce cas, la chaîne carbonée s'insère dans le canal A', tandis que les deux branches peptidiques se logent dans la cavité F' de manière plus flexible (Zajonc et al. 2005). Les études structurales de l'isoforme CD1b effectuées en 2002 par Gadola et al. montrent que son site de liaison aux lipides est le plus volumineux et profond, mesurant 2200 Å<sup>3</sup> (Gadola et al. 2002). En plus des poches A' et F', elle comporte une troisième poche, C', capable de charger des chaînes lipidiques de 25 carbones, ainsi qu'un tunnel T' reliant les poches A' et F'. Cette isoforme peut présenter des lipides de tailles variées. Comme les autres isoformes, elle prend en charge les lipides endogènes à chaînes courtes, tels que le GM2 et le PI. Cependant, pour assurer la stabilité de la protéine et garantir une présentation efficace de ces lipides aux LT, la présence de lipides « espaceurs » est nécessaire pour occuper le tunnel T'. Dans le cas du chargement d'Ac<sub>2</sub>SGL, il a été montré que ces lipides espaceurs se déplacent, menant à un réarrangement de la structure de CD1b : le portail F' se ferme et permet une insertion partielle du SGL dans les canaux hydrophobes (Garcia-Alles et al. 2006; 2011).

Lorsque CD1b présente le GMM, son canal C' peut prendre en charge la chaîne acylée de 22 à 26 atomes de carbone, et la longue chaîne méromycolique de 50 à 56 atomes de carbone peut être logée dans le tunnel A'-T'-F' (Batuwangala et al. 2004). Dans ce cas, il n'y a pas de lipide espaceur dans les sillons de CD1b, car le lipide occupe la totalité des sillons.

La structure de CD1c en complexe avec son ligand MPM, ne possédant qu'une seule chaîne d'acide gras, a été résolue en 2010 (Scharf et al. 2010). CD1c possède une poche A' similaire à un tunnel circulaire qui tourne autour d'un coude conservé et s'ouvre à la surface par un portail nommé D'. La chaîne du MPM est logée dans le tunnel A' et peut ressortir par le portail D', permettant d'accommoder des MPM de différentes longueurs (C30-C34). La poche F' est occupée par une molécule de détergent de 12 atomes de carbone. Bien que principalement hydrophobe, cette poche est ouverte vers le solvant, ce qui explique la capacité de CD1c à lier divers ligands, y compris des lipopeptides plus polaires avec 12 acides aminés (Van Rhijn et al. 2009). Une autre caractéristique de CD1c est que l'extrémité de la poche F' fusionne avec le portail D', créant ainsi un pseudo-portail E'.

La première structure de protéine CD1 à avoir été identifiée par cristallographie est celle de CD1d murine, en 1997 (Zeng et al. 1997). CD1d était alors chargée avec des lipides endogènes non identifiés, mais cette étude a permis de révéler que cette protéine possédait



**Figure 7 : Exemples de structures de lipides endogène et exogènes présentés par les protéines CD1.**  
Adaptée de De Libero et al. 2011.

un large site de liaison aux antigènes hydrophobes, composé de deux poches A' et F'. La structure de ses sillons ressemble davantage à celle de CD1a, mais avec un volume plus élevé de 1650 Å<sup>3</sup> (Zajonc et al. 2005). La structure de CD1d a ensuite été élucidée en complexe avec les lipides endogènes PC et iGb3 (Giabbai et al. 2005; Zajonc et al. 2008). Ces recherches montrent que la PC établit des contacts étroits avec la poche A', qui peut accueillir 26 atomes de carbone, et que la poche F' est entièrement remplie par la chaîne lipidique saturée de 16 carbones. La poche F' de cette isoforme est plus tubulaire, ce qui permet d'y loger des chaînes d'acides gras linéaires et saturées (De Libero et Mori 2010). La structure de CD1d en complexe avec le ligand exogène  $\alpha$ -galactosyl-céramide ( $\alpha$ GalCer) a également été résolue et montre que les chaînes de ce lipide occupent pleinement les canaux hydrophobes de la protéine (Koch et al. 2005).

Enfin, la structure 3D de CD1e, élucidée en 2011 par Garcia-Alles (Garcia-Alles et al. 2011), révèle que cette isoforme possède une poche large (2000 Å<sup>3</sup>), formée par la liaison des poches hydrophobes A' et F', permettant de lier et d'effectuer l'échange d'un large panel de lipides dont des lipides tri acylés (Pam3CSK4 et HemiBMP). La poche A' permet d'accommoder des chaînes lipidiques allant jusqu'à 30 carbones de manière stable, alors que l'entrée du côté du portail F' est plus souple. Cette structure coïncide avec son rôle de protéine de transfert lipidique (LTP) impliquée dans la présentation des lipides par CD1b. Ce rôle sera détaillé ultérieurement.

Ces différentes structures, en plus du fait que les isoformes ne sont pas exprimées par les mêmes types cellulaires et ne sont pas internalisées dans les mêmes compartiments cellulaires, font que chaque isoforme possède un rôle distinct dans la présentation de lipides antigéniques.

## 2) Nature des lipides présentés par les protéines CD1

Malgré leur faible polymorphisme, les protéines CD1 présentent une grande diversité de lipides, tels que des glycolipides, des lipopeptides, des lipoglycanes, des sphingolipides et des phospholipides. De la même manière que les molécules du CMH, les protéines CD1 présentent des molécules étrangères au soi aux LT ainsi que des lipides du soi, ou lipides endogènes, ces lipides sont recensés dans le **tableau 3** et certaines structures sont présentées dans la **figure 7**.



## a) **Lipides d'origine endogène**

Les protéines CD1 sont toujours chargées avec des lipides endogènes au niveau du RE au cours de leur voie de biosynthèse. Les lipides microbiens déplacent les endogènes pour prendre leurs places dans les poches hydrophobes, mais les deux types de lipides peuvent être présentés en surface de CPA. Principalement, les phosphoglycérides, tels que l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylinositol (PI), le PE, la phosphatidylcholine (PC), le PG et la phosphatidylsérine (PS), ainsi que leurs dérivés lyso sont insérés dans les sillons des protéines CD1 lors de leur biosynthèse au niveau du RE (Gumperz et al. 2000).

Les lipides endogènes qui sont présentés à la surface des cellules par les protéines CD1 sont principalement des glycosphingolipides (GSL) ou des phosphoglycérides. Parmi les GSL, le sulfatide, majoritairement présent dans la gaine de myéline, est présenté par toutes les isoformes mais forme un complexe plus stable avec CD1a (Jahng et al. 2004; Shamshiev et al. 2002). En effet, la poche étroite de CD1a permet de lier la chaîne de 18 carbones de la base sphingosine du sulfatide, pendant que le groupement polaire dépasse à la surface de la poche A'. Les gangliosides (des GSL possédant un ou plusieurs acides sialiques) GM1, GD1a, GD1b, GT1b et GQ1b sont présentés par CD1b, alors que CD1d présente le ganglioside iGb3 de manière spécifique (Mattner et al. 2005).

La protéine CD1a présente les lipides présents sur la peau. Les lipides du sébum, à savoir les esters de cire, les triacylglycérides (TAG), le squalène, et les acides gras libres en sont des exemples (De Jong et al. 2010; 2014).

En 2006, Garcia-Allès a observé pour la première fois la présence de lipides espaceurs dans les canaux hydrophobes de CD1b, démontrant que la PC était présentée en présence d'un autre long ligand inconnu de 16 à 40 carbones logé plus profondément dans ces sillons (Garcia-Alles et al. 2006). Ensuite, en 2011, des recherches indépendantes menées par Huang et Garcia-Alles ont identifié ces ligands. Huang et al. ont montré que les diacylglycérols et les désoxycéramides pouvaient agir comme lipides espaceurs (Huang et al. 2011), tandis que Garcia-Alles et al. ont démontré que les diradyglycérols pouvaient aussi occuper cette fonction (Garcia-Alles et al. 2011).

Plus récemment, en 2023, Huang et ses collègues ont approfondi ces découvertes en analysant le lipidome présenté par les quatre isoformes de CD1, révélant des préférences spécifiques de capture et des mécanismes de chargement différents selon la taille du sillon hydrophobe et celle des chaînes lipidiques des ligands (Huang et al. 2023). Cette étude a utilisé des cellules K562 et 293T, modifiées pour permettre le clivage des protéines CD1 en

surface grâce à l'insertion d'un motif de troncation au niveau du domaine transmembranaire. La purification des complexes en surface, suivie de l'extraction des lipides et de leur analyse par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol quadripolaire (HPLC-QToF-MS), a permis une analyse globale des lipides présentés par les protéines CD1. Les résultats ont montré que la taille des lipides endogènes chargés dans les sillons de chaque isoforme n'était pas nécessairement proportionnelle à la taille de ces sillons. CD1b, malgré ses canaux hydrophobes profonds, présente des lipides à chaînes courtes en surface, parce que deux lipides peuvent généralement se loger dans ses canaux, l'un étant un lipide espaceur ancré de manière plus distale et l'autre plus proche de la surface.

## **b) Lipides d'origine microbienne**

Etant donné que les protéines CD1 ont des structures et des localisations cellulaires principales propres à chaque isoforme, elles ne présentent pas les mêmes lipides microbiens. Les lipides spécifiques produits par *Mtb* constituent la majorité des lipides microbiens identifiés comme étant présentés par les protéines du CD1 du groupe 1 et capables de déclencher une réponse lymphocytaire.

L'isoforme CD1a présente aux LT la didésoxymycobactine (DDM), un lipopeptide mycobactérien intermédiaire de biosynthèse de la mycobactine, sidérophore qui permet aux mycobactéries d'utiliser les stocks en fer de la cellule hôte (Moody et al. 2004). Il s'agit d'un composé pourvu d'une seule chaîne d'acide gras de 18 à 20 carbones de long, dont la partie peptidique du DDM est nécessaire à l'activation des LT spécifiques du complexe (Young et al. 2009).

Les lipides mycobactériens sont principalement pris en charge par CD1b, qui possède les sillons hydrophobes les plus profonds, et dont le trafic cellulaire mène aux lysosomes, où ils rencontrent les lipides phagocytés. Le premier lipide antigénique de *Mtb*, découvert en 1994, est l'AM (Beckman et al. 1994). Cette découverte complète l'étude de Porcelli et al. datant de deux années plus tôt, identifiant un clone lymphocytaire nommé DN1, activé par un antigène mycobactérien de nature inconnue présenté par CD1b (Porcelli et al. 1992).

Depuis, des dérivés de l'AM : le GMM (Moody et al. 1997) et le GroMM (Layre et al. 2009), ont également été identifiés comme antigéniques et présentés par CD1b. CD1b lie également les PIM et leurs dérivés, le LM et le LAM (De La Salle et al. 2005; P. A. Sieling et al. 1995).

Les SGL, plus particulièrement di-acylés sont présentés par CD1b et permettent l'activation de clones T spécifiques (Gilleron et al. 2004). La découverte de cet antigène a également permis d'identifier une nouvelle acylforme de SL. De plus, l'utilisation d'anticorps dirigé contre chaque isoforme de CD1 a montré que les LT activés par la présentation de cet antigène sont majoritairement spécifiques de CD1b mais également de CD1c dans une moindre mesure. L'activation de ces clones est spécifique de l'acylforme Ac<sub>2</sub>SGL, et n'a pas lieu lorsque les CPA sont pulsées par les acylformes Ac<sub>3</sub>SGL et Ac<sub>4</sub>SGL. Cette spécificité pour la forme di-acylée conforte l'hypothèse que seuls deux chaînes acylées peuvent être accommodées dans les sillons de CD1b.

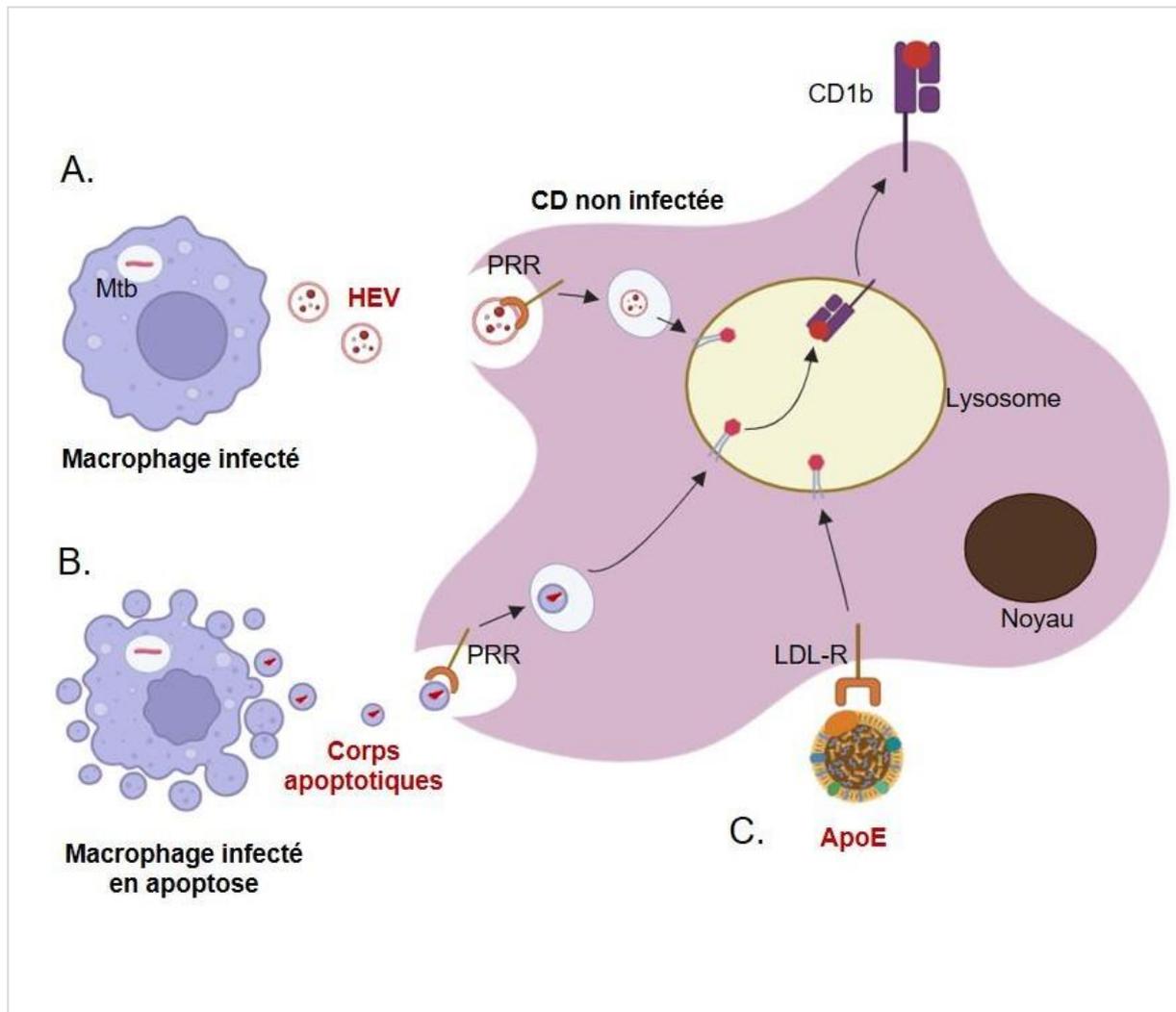
En 2021, il a été découvert que le complexe CD1b-DAT pouvait également activer les LT (Reijneveld et al. 2021). Les lipides DAT correspondent à un tréhalose acylé en positions 2 et 3. Il existe trois types de DAT (DAT1, DAT2 et DAT3), qui diffèrent par la nature spécifique des acides gras en position 3-O-acyl. Des analogues synthétiques de DAT1 et DAT2, mais pas DAT3, ont été reconnus par des LT provenant de sang de donneurs sains.

De plus, des LT spécifiques au BbGL-II (1-oléoyl-2-palmitoyl-3-( $\alpha$ -D-galactosyl)-sn-glycérol), un lipide majeur de la bactérie *Borrelia burgdorferi* responsable de la maladie de Lyme, ont été isolées à partir de contrôles sains et de patients atteints de cette maladie. Cette étude a permis d'identifier des cellules T autoréactives spécifiques à CD1b en complexe avec le DAG, un lipide du soi dont la structure est similaire à celle du BbGL-II (Reinink et al. 2019).

L'isoforme CD1c présente le mannosyl- $\beta$ -1-phosphomycoketide (MPM) et sa forme digérée phosphomycoketide (PM), caractérisé par une seule chaîne d'acide gras (Beckman et al. 1996; Ly et al. 2013). Ces ligands sont également d'origine mycobactérienne. Plus récemment, il a été montré que les protéines CD1c humaines et simiennes sont également capables de charger le GMM (Layton et al. 2021).

A ce jour, aucun lipide mycobactérien n'a été identifié lié à CD1d. Cette isoforme présente d'autres lipides provenant de bactéries, tels que l' $\alpha$ -galacturonosylcéramide et l' $\alpha$ -glucuronosylcéramide des bactéries du genre *Sphingomonas*, ainsi que l' $\alpha$ -galactosyldiacylglycérol de *Borrelia burgdorferi* (Kinjo et al. 2005; 2006; Mattner et al. 2005).

CD1d lie également une molécule isolée d'une éponge marine nommée  $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer) (Kawano et al. 1997). Cet antigène, qui a été le premier ligand découvert de cette isoforme, permet d'étudier extensivement les mécanismes de présentation par CD1d.



**Figure 8 : Mécanismes de capture du matériel par les cellules infectées permettant aux CD non infectées de présenter les lipides antigènes.**

**A)** Les macrophages viables infectés par *Mtb* sécrètent des vésicules appelées HEVs qui prennent naissance au sein des MVB, la CD les intercepte via ses PRR et internalise ainsi le matériel antigénique. **B)** Certains macrophages infectés induisent leur apoptose, et sécrètent ainsi des vésicules contenant des débris cellulaires et mycobactériens dans le milieu. **C)** Les CD expriment le récepteur LDL-R qui leur permet de capturer des lipoprotéines, telles que celles contenant l'ApoE, présentes dans l'environnement extracellulaire et transportant les lipides de *Mtb*.

### c) Capture des antigènes lipidiques microbiens

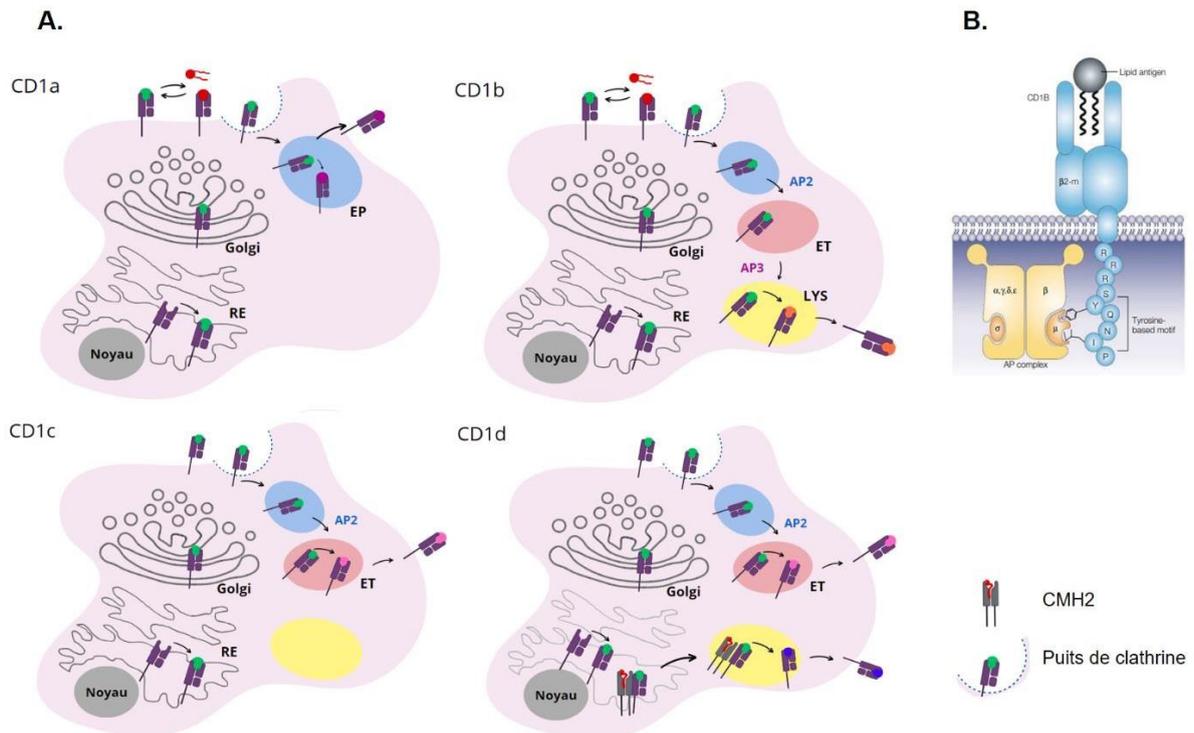
Une étape clé dans le processus de présentation des lipides exogènes par les protéines CD1 est l'entrée de ces lipides dans les CD. Les CLR DC-SIGN et RM participent à la phagocytose de la bactérie, mais il existe d'autres stratégies, permettant aux CD de capturer les lipides sans pour autant phagocyter la bactérie entière. Ces mécanismes d'internalisation des lipides antigéniques sont présentés dans la **figure 8**.

Les CD peuvent internaliser les antigènes mycobactériens en phagocytant des vésicules appelées HEV (« Host Extracellular Vesicles »). Ces vésicules se forment lorsque les corps multivésiculaires (MVB), des structures sphériques composées de la fusion d'endosomes précoces et tardifs, fusionnent avec la membrane plasmique. Les MVB, sécrétées par des macrophages non apoptotiques, libèrent les PAMP du pathogène intracellulaire dans l'environnement extracellulaire (Russell et al. 2006; Schorey et al. 2015).

Ainsi, les macrophages infectés par *Mtb* relarguent ces vésicules contenant des lipides mycobactériens tels que le LAM, les PIM, ainsi que des lipoprotéines (LpqH) et des protéines du complexe Ag85 (Kruh-Garcia et al. 2015).

Les CD sont les seules cellules à exprimer toutes les isoformes de CD1, mais elles ne sont pas les cibles principales de tous les pathogènes. Un des mécanismes utilisés par les CD pour internaliser les lipides exogènes est la phagocytose de corps apoptotiques provenant de cellules infectées, un mécanisme appelé "cross presentation" (Schaible et al. 2003). Dans le contexte de l'infection par *Mtb*, les cellules hôtes principales sont les macrophages, qui expriment peu ou pas de CD1. Schaible et ses collaborateurs ont montré que, lors de l'infection par *Mtb*, les vésicules apoptotiques des macrophages infectés contiennent des antigènes lipidiques. Ces vésicules sont ensuite internalisées par les CD non infectées exprimant CD1, permettant ainsi la présentation de ces lipides aux LT. L'apoptose des macrophages infectés est une étape clé dans la présentation des antigènes lipidiques, car son inhibition réduit l'activation des lymphocytes CD8 spécifiques de CD1 (Winau et al. 2006).

Les lipides présents dans le sérum sont associés à des lipoprotéines pour être transportés (Willnow et al. 1999). Les Apo sont des composants essentiels de ces lipoprotéines. Différentes Apo sont associées aux différents types de lipoprotéines, qui se divisent en cinq classes selon leur densité : les chylomicrons, les HDL (*high-density lipoprotein*), les IDL (*intermediate-density lipoprotein*), les LDL (*low-density lipoprotein*) et les VLDL (*very low-density lipoprotein*). La reconnaissance de ces lipoprotéines par des



**Figure 9 : Trafic intracellulaire des protéines CD1 humaines.**

A) Les protéines CD1 sont synthétisées dans le RE où elles sont chargées en lipides endogènes (en vert) puis sont adressées à la membrane plasmique. CD1b, CD1c et CD1d sont internalisées vers la voie endosomale vers les compartiments plus ou moins tardifs grâce aux complexes AP, alors que CD1a est internalisée dans les endosomes précoces par un processus indépendant. C'est dans ces compartiments que les protéines CD1 échangent le lipide endogène avec un lipide antigénique qui sera présenté aux LT. CD1d est capable de gagner le lysosome dès sa sortie du RE en interagissant avec les complexes CMH-II/Ii (en rouge). RE : réticulum endoplasmique, EP : endosome précoce ou de recyclage, ET : endosome tardif, LYS : Lysosome. B) La sous-unité  $\mu$  du complexe protéique AP interagit avec les motifs tyrosine des domaines cytoplasmiques des protéines CD1b, CD1c et CD1d via deux domaines (Moody and Porcelli, 2003).

Isoforme	Domaine cytoplasmique	Liaison à AP-2	Liaison à AP-3	Localisations principales
CD1a	RKRCFC	Non	Non	Surface cellulaire, endosomes de recyclage
CD1b	<b>RRRSYQNIP</b>	Oui	Oui	Surface cellulaire, endosomes tardifs, lysosomes
CD1c	<b>KKHCSYQDIL</b>	Oui	Non	Surface cellulaire, endosomes précoces
CD1d	<b>KRQTSYQGVL</b>	Oui	Non	Surface cellulaire, endosomes tardifs

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des domaines cytoplasmiques des isoformes CD1a-CD1d.**

Les motifs Tyrosine reconnus par les complexes AP sont indiqués en gras, des protéines AP qui peuvent lier ces isoformes, et de leurs principales localisations cellulaires.

récepteurs d'endocytose spécifiques, tels que le LDL-R (*Low Density Lipoprotein Receptor*), conduit à leur internalisation dans les compartiments endosomaux. Elles jouent un rôle crucial dans le métabolisme des lipides ainsi que dans la circulation des lipides exogènes, cela a été démontré par Van den Elzen et al en 2005 (Van den Elzen et al. 2005). Cette étude montre également que l'ajout d'ApoE dans le milieu des CD augmente la présentation des lipides GMM, MPM et  $\alpha$ -GalCer, suggérant que les lipides présentés par CD1b, CD1c et CD1d peuvent être pris en charge par ApoE. De plus, les CD sont capables de sécréter et de re-capturer rapidement ApoE, ce qui constitue un moyen pour ces cellules de sonder le milieu extracellulaire.

#### **IV) Rencontre des lipides mycobactériens et des protéines CD1 dans le réseau endosomal**

##### **1) Trafic intracellulaire des protéines du CD1**

Les protéines CD1 nouvellement traduites sont assemblées et N-glycosylées dans le réticulum endoplasmique (RE), où elles sont repliées ainsi que liées de manière non-covalente à la  $\beta$ 2m (Kang et al. 2002). Le bon assemblage de ces protéines est assuré par de nombreuses protéines chaperonnes du RE, dont la calréticuline, la calnexine et la protéine thiol oxydoréductase Erp57, qui sont également impliquées dans l'assemblage des protéines du CMH de classe 1 (Sugita et al. 1997 ; Hüttinger et al. 1999). Lors de cet assemblage, les sillons hydrophobes de chaque isoforme sont chargés en lipides endogènes, ce qui stabilise leur structure. Après leur assemblage, les protéines CD1, à l'exception de CD1e, empruntent la voie sécrétoire pour atteindre la membrane plasmique (**figure 9**). Certains lipides exogènes, ne nécessitant pas l'intervention de cofacteurs cellulaires, peuvent être directement capturés et présentés par les protéines CD1 lors de cette étape (Shamshiev et al. 1999 ; Gumperz et al. 2000 ; Manolova et al. 2006). Cette première exposition en surface est suivie d'une internalisation qui permet aux différentes isoformes d'atteindre différents compartiments cellulaires.

En effet, les isoformes CD1b, CD1c et CD1d contiennent dans leur domaine cytoplasmique un motif d'acides aminés YXXZ (Y étant une tyrosine, X un acide aminé quelconque et Z un acide aminé hydrophobe) (**tableau 4**). Ce motif est reconnu par les protéines du complexe AP (« *adaptator protein complex* »). Il s'agit de protéines

hétérotétramériques jouant un rôle dans l'internalisation de protéines au niveau des différents types d'endosomes en fonction de motifs d'acides aminés localisés au niveau de la queue cytoplasmique des protéines partenaires. Dans le cas de l'internalisation des protéines CD1, c'est principalement la protéine AP-2, qui permet l'internalisation des protéines CD1 via des puits de clathrine (Sugita et al. 2000; Briken 2002). L'importance du signal de la queue cytoplasmique a été démontrée par des expériences de troncature, qui ont révélé que la suppression de ce motif empêche l'internalisation de CD1b et CD1d dans les endosomes tardifs et réduit la présentation d'antigènes aux cellules NK par CD1d (Sugita et al. 1996; Chiu et al. 2002). La protéine CD1b humaine est la seule isoforme capable de se lier à la protéine AP-3 (Sugita et al. 2002), ce qui est nécessaire à son internalisation jusqu'aux lysosomes, et permet la présentation de certains antigènes par CD1b. Les protéines CD1c et CD1d humaines sont principalement localisées au niveau des endosomes précoces (**figure 9**). Cependant, un faible pourcentage des protéines CD1c est également localisé au niveau des lysosomes, mais rejoint ces organites d'une manière indépendante de AP-3. Dans les lysosomes des CPA, CD1c et CD1b ne co-localisent pas, CD1b étant au niveau de la membrane externe, et CD1c au niveau de la membrane interne (Van Der Wel et al. 2003), ce qui peut expliquer la différence de lipides présentés par les deux isoformes, en plus des différences structurales déjà présentées.

Deux études datant de 2001 et 2002 ont révélé l'existence de mécanismes de trafic alternatif pour les protéines CD1d murines et humaines, à travers leur association, respectivement, avec la chaîne invariante associée au CMH de classe 2 (Ii) et avec les molécules du CMH 2 elles-mêmes (Jayawardena-Wolf et al. 2001; Kang et al. 2002). Jayawardena-Wolf et al. ont démontré qu'une fraction du CD1d murin co-précipite avec Ii et lorsque le signal tyrosine de la queue cytoplasmique de CD1d est muté, la transfection de Ii permet la redistribution du CD1d mutant de la surface cellulaire vers les endosomes tardifs et les lysosomes. Kang et al ont identifié un rôle très similaire des molécules de CMH 2 dans le trafic du CD1d humain. Ensemble, ces études identifient une voie alternative suivie par les molécules de CD1d pour accéder aux lysosomes et aux endosomes tardifs, ne passant pas par la surface cellulaire mais provenant directement du RE. Dans les lysosomes, CD1d est libéré à la surface cellulaire après dégradation de Ii par la cathepsine S et apparemment encore en association avec les molécules du CMH 2. En accord avec ce modèle, le trafic de CD1d murin est altéré dans les cellules déficientes en cathepsine S, incapables de dégrader normalement Ii, avec accumulation des molécules de CD1d dans les compartiments endosomaux où elles co-localisent avec le CMH 2 et Ii (Riese et al. 2001). Bien que les

études publiées actuellement aient examiné l'association de Ii uniquement pour CD1d, il est envisageable qu'une voie de trafic alternative similaire, entraînant un transport direct du Golgi vers les endosomes tardifs, existe pour au moins certaines protéines CD1 du groupe 1 (CD1b ou CD1c).

Enfin, seule l'isoforme CD1a fait exception et est internalisée selon un mécanisme dépendant des protéines Rab22a et ARF6 (Barral et al. 2008).

Dans ces divers organites, les CD1 sont chargées avec des lipides endogènes ou exogènes. Cette étape de chargement n'est pas extensivement décrite, mais semble nécessiter des acteurs cellulaires qui seront décrits ultérieurement. Les complexes CD1-lipides formés sont ensuite à nouveau transférés à la membrane plasmique où ils sont reconnus par les LT. Les mécanismes responsables de l'adressage à la membrane plasmique ne sont à ce jour pas bien compris.

## **2) Le trafic intracellulaire des lipides exogènes**

Une fois les lipides exogènes internalisés par les CPA via les mécanismes décrits précédemment et via la reconnaissance par les CLR, ils sont délivrés dans la voie endosomale, et co-localisent donc avec les protéines CD1. La longueur des chaînes carbonées de ces lipides a un impact sur leur localisation. Effectivement, une étude par Mukherjee et al datant de 1999 a montré que différents dérivés du lipide fluorescent DiI, variant uniquement par la composition de leurs chaînes alkyles, présentent des trajectoires de trafic différentes après leur internalisation. Le dérivé de DiI avec des chaînes longues et saturées est préférentiellement dans la voie endocytaire tardive, tandis que les dérivés avec des chaînes plus courtes ou insaturées sont acheminés vers les endosomes précoces ou de recyclage (Mukherjee et al. 1999).

La longueur des chaînes carbonées du GMM contrôle également la localisation du lipide et de ce fait la présentation des antigènes par les cellules exprimant CD1b. Les chercheurs ont utilisé des analogues de GMM avec différentes longueurs de chaînes carbonées (C32 et C80) pour étudier leur présentation par les protéines CD1b. Le C32 GMM a été rapidement reconnu par les cellules T spécifiques, car il est chargé directement sur les protéines CD1b à la surface cellulaire sans nécessiter de traitement intracellulaire. En revanche, le C80 GMM a nécessité plusieurs heures d'incubation avec les APC et ne pouvait pas être chargé sur les cellules fixées, soulignant l'importance du traitement endosomal pour les antigènes à longues chaînes (Moody et al. 2002).

### 3) Importance de l'environnement lysosomal

Le pH lysosomal est acide, variant de 4,5 à 5,5 dans les CD. L'hypothèse principale à ce jour est que le pH acide est nécessaire au chargement des lipides à longues chaînes carbonées, mais pas à celui des lipides à courtes chaînes carbonées.

En effet, les lipides du soi (sulfatide et ganglioside GM1) ou bien des analogues du GMM possédant des chaînes lipidiques de 12 carbones, sont présentés en surface des CPA par les différentes isoformes, même lorsque l'internalisation des lipides est inhibée (Shamshiev et al. 2002). L'analogue de l' $\alpha$ -GalCer comportant 20 atomes de carbone est également chargé directement sur CD1d à la membrane plasmique (Zajonc et al. 2005).

En revanche, plusieurs études ont montré que le passage des lipides antigéniques à chaîne longue par les lysosomes est indispensable pour leur chargement dans les sillons de CD1b (Porcelli et al. 1992; Sieling et al. 1995; Chiu et al. 1999). L'utilisation d'inhibiteurs d'acidification des endosomes lors des études sur la présentation des SGL diacylés (C32 à C50) (Gilleron et al. 2004) et du GMM mycobactérien (Moody et al. 1999) a permis de démontrer que le pH acide du lysosome est essentiel pour leur association avec CD1b *in vivo*. Le chargement du GMM sur CD1b en fonction du pH a été détaillé *in vitro* en 1998 par Ernst et ses collaborateurs (Ernst et al. 1998). Cette étude a montré par des analyses de dichroïsme circulaire, qu'un pH de 4, caractéristique des lysosomes permet une relaxation réversible des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de CD1b, révélant les sites de liaison aux lipides. Plus précisément, le pH a une action sur l'acide glutamique en position 62 (E62) et l'acide aspartique en position 60 (D60) des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  (Relloso et al. 2008). A pH neutre, l'acide aminé E62 est totalement ionisé, et lie l'arginine 168 (R168), ce qui induit un rapprochement des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , au niveau du toit A', qui correspond à l'entrée de la poche A'. Ainsi, à pH neutre, l'accès au sillon A' est bloqué par cette interaction. De plus, l'interaction entre l'acide aminé D60 et la lysine 55 (K55), lie le centre de la boucle constituée par les acides aminés 50 à 60, correspondant à la paroi de la poche A'. Ce pont ionique induit une rigidité qui empêche aux longues chaînes lipidiques de s'insérer dans le canal A'. Dans les endosomes tardifs et lysosomes, le pH acide mène à une neutralisation partielle des résidus R62 et D60, conduisant à une déstructuration de l'hélice  $\alpha 2$  de CD1b, et donc à l'accessibilité à la poche A' pour les lipides de *Mtb* à longue chaîne, tels que le GMM.

De plus, le lysosome constitue un environnement propice à l'activité de nombreuses hydrolases et protéines de transfert lipidique (LTP) nécessaires au chargement des lipides sur les protéines CD1, ces protéines sont présentées dans la partie VI.

## **V) Réponse adaptative dépendante des protéines CD1**

Les lymphocytes spécifiques des complexes CD1-lipides sont considérés non conventionnels, en opposition aux LT reconnaissant les peptides présentés par les protéines du CMH. Ces LT non conventionnels présentent une grande variabilité de « T Cell Receptor » (TCR), qui peut être de type  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ , ainsi qu'accompagné des corécepteurs CD4, CD8, ou aucun (DN). La diversité de ces cellules et les critères structuraux nécessaires à la reconnaissance spécifique des complexes CD1-lipides seront traités dans cette partie.

### **1) Les LT spécifiques du groupe 2**

Ma thèse se concentre sur la présentation des antigènes mycobactériens par CD1b, qui appartient au groupe 1. Ainsi, malgré le grand nombre d'études réalisées sur les cellules NKT (Natural Killer T), restreintes par l'isoforme du groupe 2, CD1d, les particularités et fonctions de ces cellules ne seront pas détaillées dans ce manuscrit et ne seront que brièvement abordées dans cette partie.

#### **a) Les cellules NKT**

Etant donné que le modèle murin n'exprime que les protéines CD1 du groupe 2, la reconnaissance des antigènes lipidiques présentés par CD1d a été la plus largement étudiée. Ces cellules NKT possèdent à la fois des marqueurs des LT cytotoxiques, tels que le complexe de signalisation CD3 et un récepteur TCR  $\alpha\beta$  et des marqueurs des cellules NK, comme la molécule d'adhésion CD56 et le récepteur CD161 (NK1.1 pour l'homologue souris) (Pereira et al. 2016).

Elles se trouvent à l'interface des systèmes immunitaires innés et adaptatifs, et sont de ce fait capables de répondre rapidement et avec spécificité en aval de la reconnaissance de l'antigène lipidique. Les lymphocytes NKT spécifiques de CD1d peuvent être divisés en deux types, selon la chaîne  $\alpha$  de leur TCR. Les cellules de type 1 sont appelées les NKT invariants (iNKT) car la chaîne  $\alpha$  est conservée : V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 chez la souris et V $\alpha$ 10J $\alpha$ 18 chez l'homme (Lantz et al. 1994; Porcelli et al. 2014).



La chaîne  $\beta$  présente également une variabilité limitée, avec un biais pour le TR $\beta$ V25-1. Le second type de cellules NKT possède un répertoire de TCR plus diversifié. Les cellules iNKT sont fortement activées par la présentation de l' $\alpha$ -GalCer (Kawano et al. 1997; Morita et al. 1995), alors que les cellules NKT de type II ne reconnaissent pas l' $\alpha$ -GalCer et l'antigène le plus étudié reconnu par ces cellules est le sulfatide, présent principalement dans le cerveau.

## **b) Rôle des cellules NKT dans l'immunité anti-bactérienne**

Les cellules NKT jouent un rôle dans de nombreuses infections par des pathogènes. Lors de l'infection par *Borrelia burgdorferi*, les souris délétées pour CD1d présentent une charge bactérienne supérieure aux souris témoins (Wang et al. 2010). Cela suggère un rôle protecteur des cellules NKT lors de l'infection par ce pathogène. De la même manière, ces LT protègent également les souris infectées par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Nieuwenhuis et al. 2002). Les cellules iNKT du foie expriment le marqueur d'activation CD69 après stimulation par le cholestéryl 6'-O-acyl  $\alpha$ -glucoside (ChAcaG) de *Helicobacter pylori*. La production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 dépend de l'activation des cellules iNKT via CD1d et est réduite par la déficience en Mincle sur les CPA (Shimamura et al. 2023).

Bien qu'aucun antigène de *Mtb* n'ait été identifié comme présenté par CD1d à ce jour, certaines études ont montré que les cellules iNKT jouent un rôle dans l'immunité anti-mycobactérienne. Des souris infectées par *Mtb* présentent une charge bactérienne pulmonaire moins importante lorsque les cellules iNKT sont activées par l' $\alpha$ -GalCer, ce qui permet une meilleure survie des animaux (Chackerian et al. 2002). De plus, des études *in vitro* sur cellules humaines montrent que les lymphocytes iNKT CD8<sup>+</sup> activés par l' $\alpha$ -GalCer sont capables de tuer directement *Mtb* par la sécrétion de granules cytotoxiques (Gansert et al. 2003). Rothchild et al. ont également montré qu'*in vitro*, les iNKT contrôlent la croissance du bacille via la production de GM-CSF et de TNF- $\alpha$ , de façon dépendante de CD1d (Rothchild et al. 2014).

## **2) Lymphocytes spécifiques des protéines CD1 du groupe 1**

Historiquement, des clones de LT humains restreints par les protéines CD1 du groupe 1 ont été recherchés à partir du sang de patients atteints de Tb ou de volontaires sains (Porcelli et al. 1992; Moody et al. 2004).

	<b>GEM</b>	<b>LDN5</b>	<b>iNKT</b>	<b>TCR conventionnels</b>
<b>Isoforme</b>	CD1b	CD1b	CD1d	CMH
<b>Antigène</b>	GMM	GMM	$\alpha$ -GalCer et autres	Peptides
<b>Chaîne <math>\alpha</math> du TCR</b>	TRAV1-2 TRAJ9	Biais pour TRAV17	TRAV10 TRAJ18	Variable
<b>Chaîne <math>\beta</math> du TCR</b>	Biais pour TRBV6-2	Biais pour TRBV4-1	Biais pour TRBV25-1	Variable
<b>Conservation entre les individus</b>	Forte	Forte	Forte	Faible

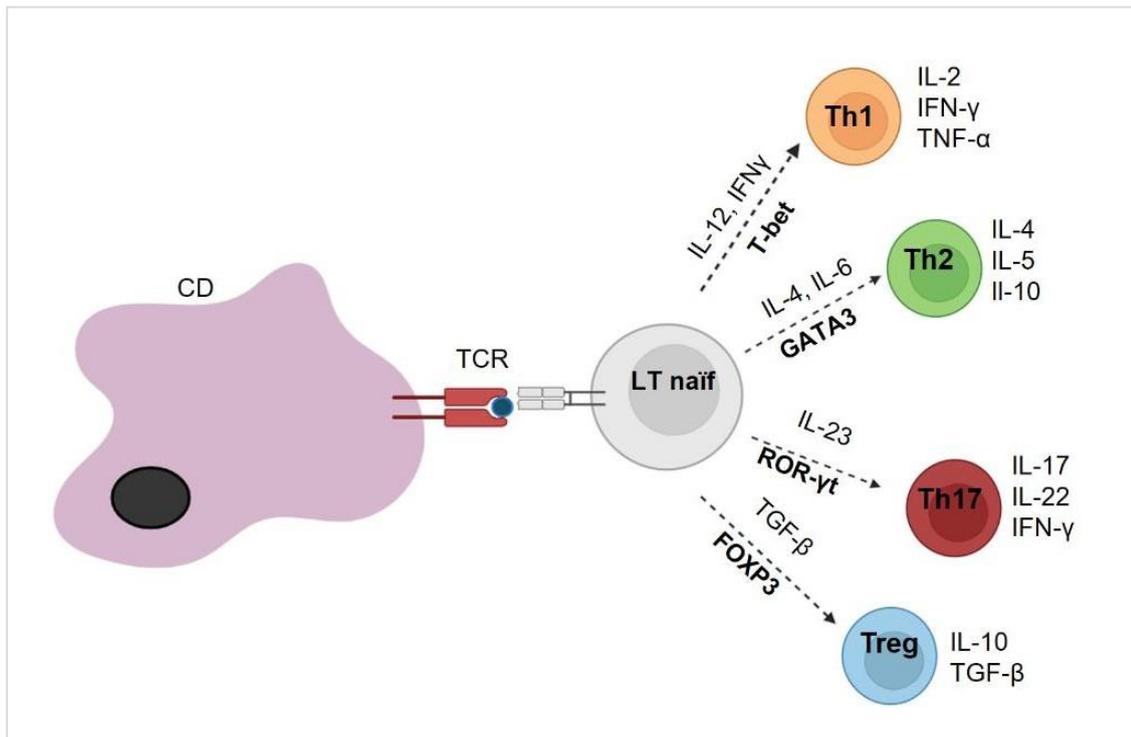
**Tableau 5 : TCR conservés entre individus reconnaissant certains antigènes présentés par les protéines CD1.**

Ces LT sont exposés à un antigène spécifique ou à une préparation lipidique, et leur activation ainsi que leur prolifération sont évaluées par la mesure de cytokines caractéristiques telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2. De nos jours, les tétramères constituent un outil de plus en plus exploité pour identifier ces LT. Il s'agit de complexes constitués de quatre molécules de CD1 chargées avec un antigène précis, utilisés pour identifier et isoler des cellules T spécifiques en les marquant par fluorescence pour les analyses en cytométrie en flux. Ces outils permettent l'identification directe des LT spécifiques sans besoin de stimulation préalable, ce qui évite les biais introduits par une stimulation *in vitro*. Dans cette partie, les différents LT spécifiques des CD1 du groupe 1 seront présentés

#### a) **Diversité des TCR des cellules T restreintes par les protéines CD1 du groupe 1**

Contrairement aux cellules iNKT spécifiques de CD1d, les LT spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 présentent une plus grande variété de TCR, et expriment pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  différents gènes des régions variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) sans présenter de motifs particuliers (De Lalla et al. 2011). Cette variété observée pour les TCR spécifiques des CD1 du groupe 1 pourrait néanmoins provenir du fait que jusque récemment, les clones lymphocytaires spécifiques de protéines CD1 du groupe 1 étaient identifiés dans différents laboratoires lors d'études indépendantes, et que le nombre de découvertes de ces LT reste trop faible pour déterminer des biais dans les TCR. L'utilisation plus récente des tétramères a permis l'identification de deux sous-groupes de LT spécifiques du complexe CD1b-GMM, sur la base de leur TCR.

Le premier groupe constitue les cellules "LDN5-like" (Van Rhijn et al. 2014), car le TCR est proche du premier clone spécifique de CD1b-GMM découvert, nommé LDN5, et possède donc un biais pour le TRAV17 de la chaîne  $\alpha$  et le TRBV4-1 de la chaîne  $\beta$  (Moody et al. 1997). Les « LDN5-like » lient le tétramère CD1b-GMM avec une affinité plus faible que le second groupe de LT, nommé GEM (« Germline-encoded T cells »), dont le TCR est plus fortement conservé (TRAV1-2, TRBV6-2) (Van Rhijn et al. 2013) (**tableau 5**).



**Figure 10 : Activation et différenciation des LT CD4+ en LT effecteurs.**

Les LT exprimant le corécepteur CD4 sont nommés les LT helpers (Th) et sont divisés en quatre majeurs sous populations : Th1, Th2, Th17 et Treg, dont la différenciation est sous le contrôle d'un facteur de transcription principal : T-bet, GATA3, ROR-Yt et FOXP3 respectivement et de leur environnement en cytokines.

Bien que l'existence de sous-groupes de LT avec des TCRs plus ou moins conservés a été démontrée, DeWitt et al en 2018 soutiennent que les TCR spécifiques du GMM sont en majorité variables d'un individu à l'autre (DeWitt et al. 2018), et c'est ce qui est observé pour les TCR spécifiques des autres lipides présentés par les CD1 du groupe 1 à ce jour.

La majorité des clones caractérisés possèdent des TCR  $\alpha\beta$ , mais les LT  $\gamma\delta$ , découverts il y a bientôt quarante ans (Hayday et al. 1985), sont également activés par les protéines CD1. Ce type de LT ne représente que 5% des LT circulants humains et sont relativement rares dans le sang périphérique, mais présents en plus grande proportion dans les épithéliums et muqueuses des systèmes digestifs et respiratoires (Hayday et al. 2000). Les cellules T  $\gamma\delta$  restreintes par CD1b et CD1c reconnaissent majoritairement les protéines CD1 de manière indépendante de l'antigène (Roy et al. 2016; Reijneveld et al. 2020). Les cellules T  $\gamma\delta$  spécifiques de CD1d en complexe avec le sulfatide possèdent un biais pour le TCR V $\delta$ 1 (Luoma et al. 2014).

#### **b) Diversité du corécepteur :**

L'exemple le plus étudié de présentation des antigènes aux LT est celui des protéines du CMH de classe 1 et 2, reconnus par des LT exprimant les corécepteurs CD8 et CD4 respectivement. Ces corécepteurs permettent une sélection positive et influent sur la fonction effectrice des lymphocytes. La classification des LT conventionnels est très vaste et complexe du fait de la plasticité conférée à ces cellules, mais de manière générale, les LT exprimant le corécepteur CD4 sont nommés les LT helpers (Th) et peuvent être divisés en quatre sous-populations majeures : Th1, Th2, Th17 et Treg, dont la différenciation est sous le contrôle d'un facteur de transcription principal : T-bet, GATA3, ROR- $\gamma$ t et FOXP3, respectivement (**figure 10**). Les LT qui expriment CD8 sont nommés les LT cytotoxiques, car ils secrètent des molécules effectrices cytotoxiques, telles que les granzymes et les perforines, qui lysent les cellules infectées par des pathogènes.

Les corécepteurs ont également un rôle dans la fonction effectrice des LT non conventionnels. Cette diversité dans l'expression des corécepteurs est en effet observée dans les LT polyclonaux spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 provenant de souris humanisées exprimant les protéines CD1 (ou hCD1Tg) infectées par *Mtb*, où des populations de cellules T CD4+, CD8+ et DN sont identifiées (Felio et al. 2009). De même, les LT spécifiques du GMM restreints par CD1c chez les primates non humains vaccinés par le BCG peuvent exprimer CD4, CD8 ou être DN (Layton et al. 2021).

En 2022, James et al. ont identifié que ces corécepteurs possédaient un impact sur

l'avidité des LT pour les glycolipides mycobactériens présentés par CD1b (James et al. 2022). Ils montrent que les LT spécifiques des SGL analysés *ex vivo* expriment en prédominance CD4. Cette étude démontre que l'avidité des LT pour les tétramères chargés en SGL est la plus forte chez les LT CD4, puis chez les LT CD8 et enfin, elle est plus faible concernant les LT DN. Bien qu'il reste à étudier ce biais en faveur d'un corécepteur précis dans le cas de la reconnaissance par d'autres lipides antigéniques, ce biais vers CD4 semble être également vrai pour les cellules T auto-réactives restreintes par CD1a (De Jong et al. 2010; Cotton et al. 2021). Il est donc important de considérer l'expression des corécepteurs par les LT restreints par CD1b lors du développement des vaccins lipidiques, car les cellules T CD4 semblent plus susceptibles d'être activées en contexte d'infection en raison de leur avidité importante.

### **3) Reconnaissance des complexes CD1-lipides par les LT spécifiques du groupe 1**

#### **a) Importance de la partie polaire**

Les clones identifiés à ce jour restreints par les protéines CD1 du groupe 1 sont plus ou moins spécifiques d'un groupement lipidique. Le clone LDN5 est spécifique du GMM, et ne présente pas de réactivité croisée pour les AM et le GroMM (Chancellor et al. 2017). En effet, le remplacement du glucose par un glycérol ou par un épimère du glucose empêche totalement la reconnaissance de ce clone (Moody et al. 1997), cette spécificité s'explique par l'importance du glucose dans la formation du complexe ternaire CD1b-GMM-TCR, ce qui a été montré par cristallographie en 2016 par Gras et al. (Gras et al. 2016). Le clone spécifique du GroMM, nommé Z5B71 et identifié par Layre et al. en 2009, reconnaît un épitope partagé par deux espèces lipidiques, et est également activé lors de la présentation par le GMM, mais pas par le TMM ni le TDM (Layre et al. 2009). Deux clones spécifiques du LAM : le clone LDN4 isolé à partir du sang d'un patient atteint de la lèpre, et le clone BDN2 provenant du sang d'un donneur sain se distinguent par leur stringence pour ce lipoglycane. Le clone LDN4 reconnaît principalement le LAM et est légèrement activé par le LM, alors que le clone BDN2 reconnaît de la même manière les LAM, LM et PIM6. Cela s'explique par la discrimination faite par le TCR sur le degré de mannosylation et sur la présence d'unités  $\alpha(1\rightarrow2)\text{Manp}$  (Sieling et al. 1995). En revanche, le clone Z5B11, isolé par de la Salle et al. en 2005, est activé uniquement par les PIM (De La Salle et al. 2005).

Le clone lymphocytaire Z4B27, qui reconnaît l'Ac2SGL, nécessite le groupe sulfate afin d'être activé par ce lipide. En effet, la désulfatation de ce lipide annule complètement l'activation du clone (Gilleron et al. 2004).

Il est également important de considérer la partie lipidique des glycolipides antigéniques, car de nombreuses recherches montrent que cette partie est déterminante pour l'activation des clones lymphocytaires.

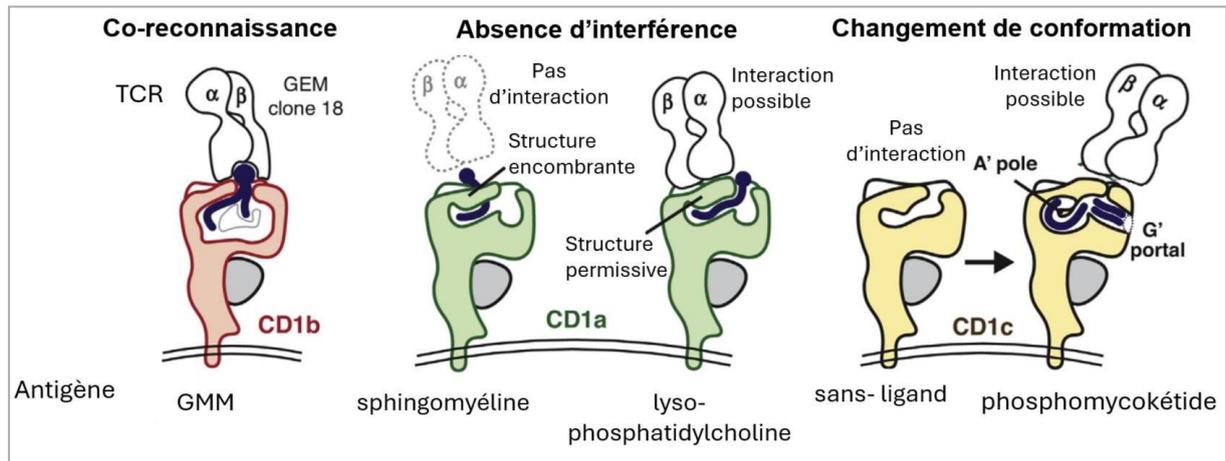
## **b) Importance de la partie lipidique**

Bien que la partie polaire de l'épitope soit considérée comme un déterminant majeur de la reconnaissance par le TCR, et donc de l'activation des LT, de nombreuses études montrent que les parties lipidiques, enfouies dans les sillons des protéines CD1, peuvent également influencer ces interactions.

En 2002, il a été démontré pour la première fois que la partie lipidique des AM influençait l'activation du clone spécifique DN1. Bien que cet effet soit moins prononcé que les modifications de la partie polaire, la nature  $\alpha$ , céto ou méthoxy affecte leur reconnaissance par le TCR (Grant et al. 2002). Plus récemment, l'utilisation des tétramères de CD1b chargés avec des AM céto ou méthoxy ont également permis à Van Rhijn et al. d'identifier deux populations de LT différentes dans le sang de donneurs reconnaissant spécifiquement ces deux AM sans réactivité croisée (Van Rhijn et al. 2017).

L'étude de Guiard et al. en 2009 a permis également d'identifier l'importance de la longueur et de la structure des chaînes d'acide gras pour la reconnaissance du Ac<sub>2</sub>SGL par les LT issus de sang de donneurs sains Z4B27 et Z4A26 (Gilleron et al. 2004). Les groupements méthyles sur l'acide hydroxyphthiocéranolique, ainsi que la longueur de 16 carbones de l'acide palmitique, sont des paramètres importants pour l'activation de ces clones (Guiard et al. 2009). En 2018, James et ses collaborateurs ont montré que d'autres lignées cellulaires spécifiques de l'Ac<sub>2</sub>SGL naturel, nommées A01 et A05, montrent une réactivité variable en fonction de la présentation de différents Ac<sub>2</sub>SGL synthétiques, dont seule la partie lipidique diffère. De plus, lors de cette étude, d'autres lignées de LT isolées via tétramères sur la base de la reconnaissance d'un analogue synthétique du Ac<sub>2</sub>SGL, dont l'acide hydroxyphthiocéranolique est remplacé par un acide gras long insaturé tétraméthylé, sont incapables de reconnaître l'Ac<sub>2</sub>SGL naturel, indiquant une spécificité particulière pour la partie lipidique (James et al. 2018).

L'importance de la structure de la partie lipidique du GMM a été mise en évidence également lors d'une étude sur plusieurs clones possédant un TCR GEM. En étudiant une quinzaine de lipides avec différentes décorations sur les chaînes alkyles, Chancellor et al. ont montré que certains de ces TCRs possédaient un mécanisme de reconnaissance plus



**Figure 11 : Représentation schématique des trois modèles de reconnaissances des complexes CD1-lipides par les TCR.** Le modèle de co-reconnaissance classique ou “modèle de la pince à épiler” repose sur l’interaction du TCR avec à la fois l’épitope lipidique et la protéine CD1. Deux modèles de reconnaissance ont été proposés à la suite de l’analyse des structures cristallographiques des complexes CD1-lipides-TCR. Le modèle d’absence d’interférence montre que l’interaction du TCR est autorisée par la présence de la lyso-PC alors que la sphingomyéline empêche cette interaction. Enfin, un autre modèle de reconnaissance a été proposé pour CD1c, où la liaison de ligand lipidique favorise le repliement du toit de la protéine, qui devient une surface de contact possible avec le TCR, c’est le modèle changement de conformation. Adaptée de Moody et al. Current Opinion in Immunology 2017.

discriminant pour les chaînes d'acide gras que d'autres, qui montrent une reconnaissance plus flexible de la partie AM (Chancellor et al. 2017).

Concernant l'activation des clones spécifiques de CD1c-MPM, la première étude détaillée de la structure-fonction des antigènes présentés par CD1c, effectuée en 2007 par de Jong et al., propose que CD1c lie sélectivement des lipides dont la longueur varie entre 30 et 40 carbones, avec des ramifications méthylées, plutôt que les antigènes lipidiques plus courts et non ramifiés. De plus l'utilisation de MPM estérifié par des mycokétides méthylés sur différentes positions a une influence l'activation du clone (De Jong et al. 2007).

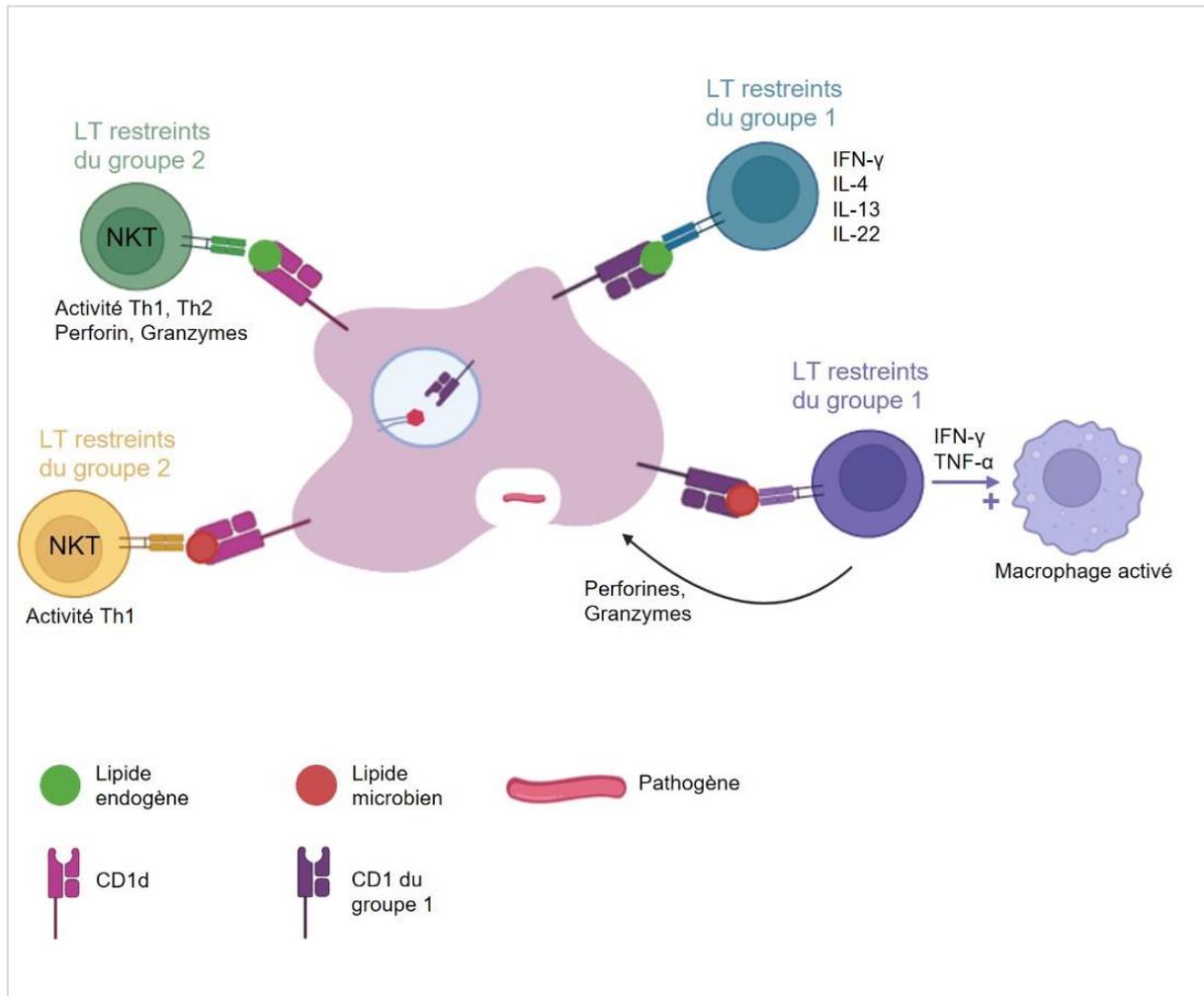
### **c) Mécanismes de reconnaissance des complexes CD1-lipides par les TCR spécifiques des protéines CD1 du groupe 1**

Le rôle des protéines CD1 dans la réponse immunitaire est principalement compris via l'identification des différents antigènes présentés. Cela explique pourquoi la compréhension moléculaire du mécanisme de reconnaissance des antigènes lipidiques dépasse la connaissance en termes de rôles des LT réactifs aux CD1 dans les maladies. Ce déséquilibre de connaissance s'explique également par l'absence de modèles animaux disponibles.

Plusieurs modèles de reconnaissance des complexes ont été identifiés, les structures cristallographiques de CD1b-GMM-TCR, ou de CD1d- $\alpha$ -GalCer-TCR ont permis d'identifier le mode de co-reconnaissance, retrouvé dans le cas de la reconnaissance des épitopes présentés par les protéines du CMH. Deux autres modèles ont été mis en évidence ensuite, ils sont décrits ci-dessous et présentés schématiquement dans la **figure 11**.

#### Modèle de co-reconnaissance ou reconnaissance du groupe polaire du ligand lipidique :

Dans ce modèle, le TCR reconnaît la partie polaire, mais pas ou très peu la partie lipidique. Il s'agit probablement du cas de figure le plus classique (Shahine et al. 2017). Ce modèle a été mis en évidence assez tôt pour les isoformes CD1b et CD1d (Moody et al. 2004; 1997; Kawano et al. 1997). Par la suite, ces résultats ont été confirmés par études cristallographiques, montrant que les TCR des LT restreints par CD1b et CD1d lient directement ce groupe polaire qui dépasse de la structure de CD1 (Gras et al. 2016; Borg et al. 2007). Dans le cas de la reconnaissance du GMM, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR entourent le résidu de glucose comme une « pince à épiler », en établissant des interactions avec la surface de CD1b, comme ce qui est observé pour les interactions TCR-CMH.



**Figure 12 : Fonctions effectrices des LT restreints par CD1 du groupe 1 et 2.** Adapté de Layre et al,2015.

Les LT restreints par CD1 contribuent aux réponses immunitaires en produisant des cytokines et/ou exerçant une cytotoxicité induite par la libération de perforine et de granzymes. Les LT restreints par CD1 des groupes 1 et 2 comprennent des LT auto-réactifs et des LT reconnaissant spécifiquement les lipides microbiens. Les cellules iNKT, qui constituent une population majeure LT restreints par CD1d, sont des LT innés, capables d'être activés au cours d'une infection microbienne.

#### Modèle d'absence d'interférence avec le ligand :

La reconnaissance de CD1a présentant du squalène a remis en question le modèle de la co-reconnaissance pour certains cas, et mis en évidence le modèle d'absence d'interférence. En effet, le squalène est un lipide ne possédant pas de partie polaire, et un clone lymphocytaire nommé BC2 est capable de reconnaître cet antigène, ainsi que d'autres dépourvus de partie hydrophile, comme les cires d'ester et acides gras libres (De Jong et al. 2014). L'étude de Birkinshaw et al. a montré par cristallographie que certains TCR se lient en effet au toit A' de CD1a sans contact direct avec les ligands permissifs. Les ligands non permissifs, possédant une partie polaire plus imposante, tels que la sphingomyéline, perturbent la surface de la protéine et empêchent le TCR d'interagir (Birkinshaw et al. 2015). Ce modèle n'a été observé que pour CD1a à ce jour.

#### Modèle du changement de conformation de CD1 :

Ce modèle a été mis en évidence dans le cas de formation de complexe TCR-CD1c. Une étude de Mansour et al. a montré que la liaison de CD1c avec des esters de cholestérol du soi induisait une réorganisation des sillons de cette protéine, où la poche F' se ferme et le portail G' s'ouvre. Cette structure permet de dévoiler un épitope protéique à la surface de CD1c qui est la cible reconnue par le TCR (Mansour et al. 2016). D'autres études sur les interactions entre le TCR de LT  $\alpha\beta$  et  $\delta\gamma$  et CD1c confirment l'existence de ce modèle de reconnaissance, où l'épitope reconnu est donc sur CD1c (Roy et al. 2014; 2016). Dans ce modèle, comme dans le modèle d'absence d'interférence, le TCR reconnaît la protéine CD1 plutôt que les lipides qu'elle présente, suggérant un autre rôle important de la partie hydrophobe des ligands lipidiques, celui de permettre des changements de conformation aux protéines CD1.

#### **4) Fonctions effectrices et rôle dans la réponse immunitaire des LT spécifiques des protéines CD1 du groupe 1**

Nous venons de voir que, selon le modèle de reconnaissance, la présentation des antigènes lipidiques par les protéines CD1 peut soit permettre la reconnaissance du complexe CD1- lipide par un TCR spécifique aux lipides étrangers ou du soi, soit empêcher la reconnaissance de CD1 par le TCR auto-réactif dans le cas de ligands non permissifs. De la même manière que les LT restreints par les protéines du CMH, l'activation de ces LT permet la production de cytokines de type Th1, Th2, Th17 ainsi qu'une activité cytotoxique, et ces LT jouent un rôle dans les infections, les cancers, et les maladies auto-immunes (**figure 12**).

### **a) Importance des LT spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 dans l'auto-immunité**

Les cellules T autoréactives restreintes par CD1a représentent 0,02 à 0,4 % des cellules T mémoire dans le sang (De Lalla et al. 2011). Étant donné que CD1a est exprimé par les cellules de Langerhans, ces cellules T sont courantes dans la peau et dans le sang périphérique. Des clones autoréactifs de ces cellules ont été isolés du sang de donneurs, et il a été démontré qu'ils produisent de l'IL-22, mais pas d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-17, ce qui suggère qu'ils ont un phénotype Th22. Les résultats ont été confirmés par extraction de LT restreints par CD1a de la peau qui montraient un phénotype similaire (De Jong et al. 2010).

Les cellules T restreintes par CD1a ont été identifiées comme impliquées dans des maladies de la peau, comme le psoriasis et l'eczéma. Ces processus impliquent également l'enzyme PLA2, qui permet de générer de nouveaux antigènes. Cheung et al. ont montré que les néolipides générés par PLA2 pouvaient être trouvés dans les exosomes des plaques psoriasiques et activer les LT restreints par CD1a, induisant ainsi la production d'IFN- $\gamma$  dans la peau lésée, mais pas dans les tissus (Cheung et al. 2016). Il a été découvert également que les cellules T restreintes par CD1a jouent un rôle dans l'eczéma en produisant plusieurs cytokines inflammatoires, y compris IFN- $\gamma$ , IL-13 et GM-CSF en réponse à des néoantigènes créés par PLA2 à partir de l'acarien présent dans la peau (Jarrett et al. 2016). De plus, la PLA2 dans le venin d'abeille conduit également à la production d'acides gras libres, conduisant à l'activation des LT spécifiques de CD1a (Bourgeois et al. 2015). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de ces LT dans des maladies comme l'eczéma et le psoriasis, ainsi que l'impact de leur inhibition sur la progression de ces maladies.

Wun et al. ont utilisé des tétramères CD1c chargés de lipides endogènes pour trier les cellules T autoréactives restreintes par cette isoforme chez des humains sains. Ils ont identifié deux clones, CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>, se liant au tétramère CD1c chargé de monoacylglycérol (MAG), tandis que des lipides avec des groupes polaires plus grands, comme la PC bloquaient la liaison. De la même manière que pour les LT restreints par CD1a, il semblerait que les grands groupes polaires interfèrent dans certains cas avec la liaison correcte du TCR à CD1c (Wun et al. 2018). Les LT auto-réactifs restreints par CD1c seraient également impliqués dans la production d'auto-anticorps dans le contexte du lupus érythémateux systémique (LES). Ces LT produisent de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$ , tandis que LT

spécifiques de CD1c provenant de témoins sains ne produisent que de l'IFN- $\gamma$ . De plus, lorsque les cellules T restreintes par CD1c provenant de patients atteints de LES sont co-cultivées avec des LB CD1c+, elles permettent la production d'IgG, ce qui pourrait favoriser les réponses auto-anticorps dans le LES (Sieling et al. 2000).

Des cellules T cytotoxiques autoréactives restreintes par CD1a et CD1c ont également été identifiées dans des échantillons de biopsies de patients atteints de thyroïdites auto-immunes, suggérant qu'elles pourraient contribuer aux maladies de Grave et de Hashimoto (Roura-Mir et al. 2005).

Bien que l'autoréactivité restreinte par CD1a et CD1c soit bien documentée, l'autoréactivité envers CD1b l'est moins. En 1996, CD1b a été trouvé exprimé dans les cellules inflammatoires périvasculaires de lésions de la sclérose en plaques, mais pas dans les contrôles sains (Battistini et al. 1996). De plus, il a été montré que l'expression de CD1b était augmentée sur les macrophages alvéolaires de fumeurs et que cela était corrélé avec la gravité de la maladie. Il a été supposé que la fumée de cigarette induit l'oxydation des lipides dans les cellules épithéliales bronchiques, et que les lipides oxydés pourraient potentiellement devenir des néo-antigènes présentés par CD1b (Ween et al. 2021). La lignée HJ1, spécifique de CD1b répond aux PG, PC, PE et PI, mais pas à la PS (Bagchi et al. 2016), et ces cellules montrent un phénotype activé (CD44hiCD69+CD122+) chez les souris naïves, indiquant une activité contre les lipides endogènes (Li et al. 2011).

## **b) Importance dans l'immunité anti-mycobactérienne**

L'identification des LT restreints par les protéines CD1 du groupe 1 chez les individus infectés par *Mtb* fournit des preuves de leur rôle dans la protection contre ce pathogène. En effet, des LT spécifiques d'Ac<sub>2</sub>SGL sont plus fréquemment retrouvés chez les individus PPD+ par rapport aux PPD- (répondant ou non au test d'intradermoréaction à la tuberculine), ce qui suggère que ces LT ont été amplifiés lors de l'infection par *Mtb* (Gilleron et al. 2004).

L'étude de Busch et al. a montré que l'activation des LT dépendants de CD1b contribue à la limitation de la croissance mycobactérienne dans les lavages broncho-alvéolaires des infections actives et latentes. Cette étude identifie le LAM comme un lipide immunogène. Un sous-ensemble de cellules T cytotoxiques CD8+ réactives au LAM, produisant de l'IFN- $\gamma$  et les molécules cytotoxiques perforine, granulysine et granzyme B, est présent chez les patients infectés de manière latente, mais pas active. Comme les patients infectés de manière latente ont une meilleure capacité à limiter la progression de la maladie

que ceux infectés de manière active, cette étude soutient le rôle protecteur des cellules T restreintes par CD1b dans la Tb humaine (Busch et al. 2016).

Dans un modèle de souris humanisées hCD1tg exprimant également des LT avec le TCRd'un clone spécifique des AM nommé DN1, une réduction de la charge bactérienne due à ces LT est observée *in vitro* et *in vivo* (Zhao et al. 2015). Ces LT produisent notamment de l'IFN- $\gamma$  du TNF- $\alpha$  et de l'IL-13, de manière restreinte par CD1b et peuvent lyser les BMDC infectées par *Mtb*. De la même manière que pour les clones restreints par CD1b, les LT reconnaissant CD1c sont plus nombreux dans le sang des individus infectées par *Mtb* (Ly et al. 2013).

### c) **Importance dans l'immunité contre d'autres pathogènes :**

En plus de *Mtb*, d'autres espèces bactériennes sont reconnues par les LT restreints par les protéines CD1 du groupe 1. En effet, des LT isolés et amplifiés à l'aide de tétramères de CD1b chargés avec des lipides totaux de *Staphylococcus aureus*, *Brucella melitensis* et *Salmonella Typhimurium*, se sont révélés être autoréactifs et reconnaître le PG (Van Rhijn et al. 2016), un lipide du soi également présent chez de nombreuses espèces bactériennes.

En accord avec ces découvertes, les LT autoréactifs restreints par le CD1b peuvent fournir une protection contre l'infection par *Listeria monocytogenes*. Le clone HJ1 autoréactif restreint par CD1b isolé chez l'homme, déjà présenté dans la partie sur l'autoimmunité, est capable de produire des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-17A, IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , et conduit à la lyse des cellules exprimant CD1b lors de l'infection par *L. monocytogenes* chez les souris hCD1tg (Li et al. 2011). Cette découverte suggère que les LT autoréactifs restreints par CD1b peuvent jouer un rôle dans la défense de l'hôte contre diverses infections, bien que le mécanisme de suppression de cette autoréactivité en l'absence d'infection ne soit pas encore élucidé.

Les LT spécifiques des protéines CD1 du groupe 1 semblent jouer un rôle important contre l'infection par *S. aureus*. Les souris hCD1Tg infectées par *S. aureus* présentent une pathologie rénale plus faible que les souris sauvages, et produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-17A et l'IFN- $\gamma$ . Cela est dû à la reconnaissance du PG de la bactérie par les LT restreints par les protéines CD1 du groupe 1. Chez ces souris, la cinétique d'activation des cellules T restreintes par le CD1 du groupe 1 ressemblait davantage à celle des cellules T conventionnelles plutôt qu'à celle des cellules NKT de type inné (Visvabharathy et al. 2020). Cette étude est importante, car elle suggère que les cellules T

restreintes par les protéines CD1 du groupe 1 permettent une protection dans une infection autre que la Tb.

#### **d) Propriétés des LT mémoire spécifiques des protéines CD1 du groupe 1**

Il n'est pas évident de définir un phénotype mémoire des LT spécifiques des CD1 du groupe 1. Cependant, il existe des preuves que des LT provenant de souris hCD1Tg vaccinées avec des AM présentent une cinétique d'activation se rapprochant de lymphocytes mémoires. La réponse maximale à la première immunisation avec des CD présentant l'AM de *Mtb* se produit 7 jours après l'immunisation, tandis que la réponse maximale à l'immunisation de rappel, administrée 4 semaines après la primo-immunisation, se produit 5 jours après l'immunisation avec une plus grande ampleur (Morgun et al. 2023). Un tel effet suggère que l'immunisation initiale a conduit à une expansion et à une différenciation des LT mémoire. Des données similaires ont été obtenues lors d'études chez l'homme. Montamat-Sicotte et al. ont montré que les LT spécifiques des AM pouvaient être détectés dans les PBMC des individus infectés par *Mtb* 1 à 2 ans après traitement de l'infection (Montamat-Sicotte et al. 2011). Ces cellules T, après une seconde stimulation par les AM, sont capables de se multiplier et de produire de l'IL-12 et de l'IFN- $\gamma$  de la même manière que les LT spécifiques de l'antigène protéique ESAT-6 (early secreted antigenic target 6 kDa), qui est un antigène mycobactérien connu. De plus, une étude utilisant des tétramères de CD1b couplés au GMM ou aux AM a montré l'existence de population de LT CD45RO<sup>+</sup> (CD45RO étant exprimé sur les LT mémoire) et CD45RO<sup>-</sup> dans des cohortes humaines ayant une Tb active ou latente, suggérant l'existence d'un phénotype mémoire (Lopez et al. 2020).

Ainsi, il semblerait que certaines cellules T spécifiques du groupe 1 peuvent se différencier en lymphocytes mémoires. Des recherches supplémentaires seraient nécessaires afin de s'assurer que ces cellules soient capables de fournir une protection contre les infections.

#### **e) Développement de vaccins de nouvelle génération à base de lipides mycobactériens**

Certains LT sont capables de reconnaître des lipides de l'enveloppe mycobactérienne, présentés par les protéines CD1, plus particulièrement CD1b. Cette reconnaissance non



conventionnelle a été étudiée, afin de savoir si elle pourrait induire une protection et donc constituer une nouvelle stratégie vaccinale. La vaccination par les lipides possède de nombreux avantages. Les molécules CD1 sont non polymorphiques, la réponse immunitaire pourrait ainsi être homogène dans la population. Les lipides sont présentés par les CD, ce qui permet un priming efficace des cellules T. De plus, l'activité adjuvante des lipides est médiée par DC-SIGN, les TLRs et Mincl, ce qui renforce encore l'efficacité de la réponse immunitaire.

La première étude démontrant que l'immunisation de cochons d'Inde par des lipides totaux de *Mtb* induisait une prolifération des LT dépendante des protéines CD1b et CD1d, et qu'elle était corrélée à une protection, a eu lieu en 2002 (Hiromatsu et al. 2002). En 2003, Dascher et al. ont réalisé des tests d'immunisation de cochons d'Inde avec un extrait lipidique total de *Mtb*, incorporé dans des liposomes et administré par aérosol. Les animaux vaccinés présentaient une charge bactérienne réduite dans les poumons et la rate, ainsi qu'une pathologie atténuée, caractérisée par des granulomes plus petits par rapport aux groupes témoins (Dascher et al. 2003). Des antigènes lipidiques de *Mtb* purifiés, Ac<sub>2</sub>SGL et PIM<sub>2</sub>, ont été utilisés sous forme de liposome, couplé à l'adjuvant diméthyl dioctadécyl ammonium bromide (DDA), pour immuniser les cochons d'Inde (Larrouy-Maumus et al. 2017). Cette étude a montré que l'immunisation des animaux avec ces deux lipides permettait de réduire la charge bactérienne et le nombre de lésions dans la rate et les poumons par rapport au groupe non vacciné. Plus récemment, en 2023, Eckhardt et ses collaborateurs ont utilisé du PIM6 purifié, présenté sous forme de liposome, pour vacciner le cochon d'Inde (Eckhardt et al. 2023). L'étude a révélé que la vaccination par PIM6 permettait de diminuer la charge bactérienne et la pathologie dans les ganglions et la rate des animaux, bien que la vaccination par BCG offre une protection plus grande.

Un autre animal modèle, le bovin, a été étudié en 2009. Cette étude a montré que lorsque des modèles bovins, exprimant les mêmes isoformes de CD1 que l'homme, sont immunisés avec du GMM purifié, ils répondent avec une réponse T aussi efficace que celle déclenchée par un vaccin protéique utilisant le même adjuvant (Nguyen et al. 2009).

Enfin, des études sur souris humanisées ont été réalisées en 2015 par Zhao et al. Ce modèle murin exprime les protéines CD1 humaines, ainsi que des LT spécifiques des AM. L'infection de ces souris par *Mtb* induit une activation rapide de ces LT au niveau des ganglions lymphatiques médiastinaux. Ils s'accumulent ensuite aux sites d'infection dans les poumons et permettent une protection contre l'infection, se traduisant par la sécrétion

LTP	Mode d'action	Rôle dans le métabolisme des lipides	Références	Rôle dans la présentation des lipides par CD1	Références
MTP	Perturbateur de membrane	Chargement de lipides sur ApoB	Raabe et al., 1999	Chargement de lipides endogènes du RE sur CD1d	Brozovic et al., 2004
NPC1 NPC2	Perturbateur de membrane	Transport du cholestérol	Ioannou et al., 2000 Liou et al., 2006	Traffic et chargement de lipides sur CD1d	Sagiv et al., 2006 Schantz et al., 2007
GM2A P	Perturbateur de membrane	Assiste la $\beta$ -hexosaminidase A	Conzelmann et Sandhoff 1979	Chargement de lipides sur CD1d	Zhou et al., 2004
Sap-A	Lifase	Assiste la $\beta$ -Galactosylceramidase	Morimoto et al., 1989	Inconnu	
Sap-B	Lifase	Assiste l'arylsulfatase A, l' $\alpha$ -galactosidase A et la galactosylceramide $\beta$ -galactosidase	Vogel, Schwarzmann, et Sandhoff 1991	Chargement de lipides sur CD1d et possiblement CD1b	Yuan et al., 2007
Sap-C	Perturbateur de membrane	Assiste la glucosylceramide- $\beta$ glucosidase	O'Brien et al., 1971	Chargement de lipides sur CD1d et CD1b	Winau et al., 2004
Sap-D	Perturbateur de membrane	Assiste la N-acylsphingosine amidohydrolase 1	Azuma et al., 1994	Inconnu	
CD1e	Perturbateur de membrane	Inconnu		Chargement des PIMs sur CD1b, présentation des PIMs à l' $\alpha$ -mannosidase	De la Salle et al., 2005 De Paepe et al., 2012

**Tableau 6 : Bilan des modes d'action des différentes protéines de transfert lipidique (LTP) identifiées à ce jour.** Ces protéines, connues pour leur implication dans le métabolisme des lipides, peuvent également intervenir dans le chargement d'antigènes sur les protéines CD1. Les LTP sont la protéine « microsomal triglycéride transfer » (MTP), les protéine Niemann-Pick C1 et C2 (NPC1 et NPC2), la protéine activatrice de GM2 (GM2AP), les saposines et CD1e.

d'IFN- $\gamma$ , de TNF $\alpha$ , d'IL-13 et IL-6 (Zhao et al. 2015). Cette réponse immunitaire, dépendante de la présentation des AM par CD1b, permet une réduction de la charge bactérienne dans les poumons, foie et rate des souris humanisées.

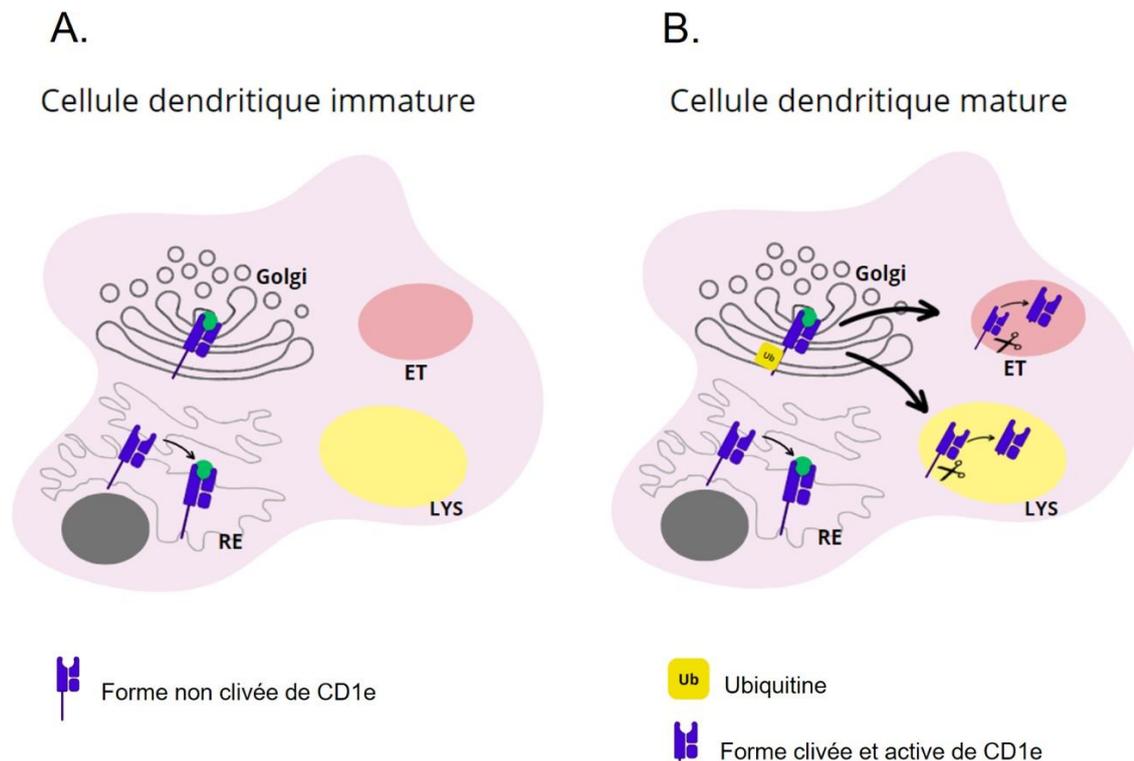
Afin d'induire cette réponse protectrice, les protéines CD1 en surface des CPA présentent certains antigènes lipidiques décrits précédemment. Ces lipides nécessitent un apprêtement particulier prenant place au niveau des endosomes tardifs et lysosomes. Cette étape représente le cœur de mon projet de thèse.

## **VI) Apprêtement des lipides pour leur présentation par les protéines CD1**

### **1) Rôle des protéines de transfert lipidique dans le chargement des antigènes sur CD1**

Au cours de cette introduction, nous avons vu que certains lipides, dont les chaînes d'acides gras sont courtes, peuvent directement être échangés à la surface de la cellule. En effet, lorsque des CPA sont fixées, des analogues synthétiques du GMM possédant des chaînes de C12 à C32 peuvent directement se charger sur CD1b sans passer par la voie endosomale. L'analogue de l' $\alpha$ -GalCer (C20) peut également se loger dans les sillons de CD1d en surface (Zajonc et al. 2005). Cependant, au niveau des endosomes, le chargement des protéines CD1 nécessite l'intervention de protéines capables de déloger ces molécules hydrophobes des membranes : les protéines de transport de lipides (LTP) (**tableau 6**).

Ces LTP sont physiologiquement impliquées dans des voies de biosynthèse lipidique. La perte de fonction de certaines de ces LTP entraîne des accumulations de substrats dans les cellules, causant des maladies lysosomales appelées troubles du stockage des lipides. Parmi les LTP lysosomales, on trouve CD1e, les quatre saposines (Sap-A, Sap-B, Sap-C et Sap-D), la protéine Niemann-Pick type 2 (NPC2) et la protéine ganglioside monosialic 2 activator (GM2AP). De plus, au niveau de l'assemblage des protéines CD1 dans le RE, la protéine du RE "microsomal triglyceride transfer" (MTP) a également été identifiée comme impliquée dans la biosynthèse de la protéine CD1d (Brozovic et al. 2004; Dougan et al. 2005). Le rôle connu de la protéine MTP est d'assurer le transfert des triacylglycérols et glycérophospholipides sur l'apolipoprotéine B (ApoB), ce qui est requis pour le bon assemblage et la sécrétion des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) dans le foie.



**Figure 13 : Trafic et localisation intracellulaire de CD1e dans les CD.**

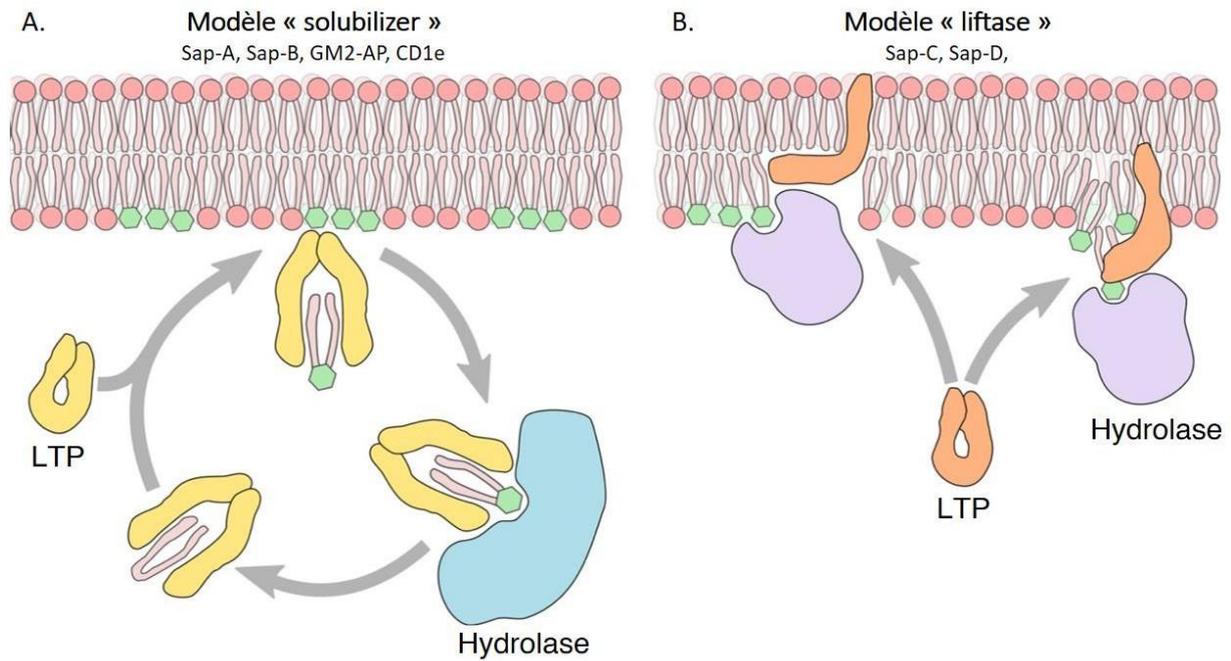
CD1e n'est jamais exprimée à la surface cellulaire des CD. Après sa biosynthèse sous forme membranaire au niveau du RE, CD1e est localisé dans l'appareil de Golgi des CD immatures (**A**). L'ubiquitinylation de résidus lysine localisés sur le domaine cytoplasmique permet à CD1e d'être directement adressée aux endosomes tardifs et au lysosome où la protéine est clivée en une forme soluble, active et stable, dans les CD matures (**B**).

### a) L'isoforme CD1e

L'isoforme CD1e est la seule à ne pas être exprimée à la surface des CPA (Angénieux et al. 2000). Sa localisation est strictement intracellulaire et son expression se limite aux CD. Dans les CD immatures, les protéines CD1e s'accumulent au niveau des membranes des compartiments de l'appareil de Golgi et du trans-Golgi. Lorsque les CD sont activées, par exemple par reconnaissance du LPS par le TLR4, ces protéines sont transportées vers les lysosomes. Le signal responsable de la migration de CD1e du Golgi vers les endosomes tardifs est une mono-ubiquitinylation de certaines lysines sur le domaine cytosolique de CD1e (Maître et al. 2008). Dans les lysosomes, CD1e est clivée et obtient ainsi sa forme soluble et active (Angénieux et al. 2005; Maître et al. 2009), exclusive aux CD activées (**figure 13**).

En 2005, de la Salle et al. ont démontré que CD1e assiste la digestion du phosphatidylmyoinositol hexa-mannosylé (PIM6) par l' $\alpha$ -mannosidase. CD1e est essentiel pour permettre à cette hydrolase de cliver quatre sous-unités  $\alpha$ -D-Manp, produisant ainsi le PIM2 di-mannosylé, permettant d'activer un clone spécifique du PIM2. Plus précisément, les travaux de Cala-de Paepe et ses collaborateurs en 2012 ont montré que CD1e permet le transfert des PIMs di-acylés entre les membranes et CD1b, sans induire de désorganisation de la membrane (Cala-De Paepe et al. 2012).

CD1e joue donc un rôle de LTP (lipid transfer protein) qui a également été étudié dans le cas du chargement de lipides sur CD1c et CD1d (Facciotti et al. 2011). Ces recherches ont permis de mettre en lumière la capacité de CD1e à favoriser le chargement ainsi que le déchargement des lipides sur CD1d. CD1e ne joue donc pas un rôle direct dans la présentation des lipides, mais contribue à l'élargissement du répertoire des antigènes lipidiques exposés à la surface des CD par CD1b. En se liant aux lipides dans les lysosomes, CD1e facilite la digestion des glycolipides plus complexes, rendant ainsi ces antigènes accessibles pour la présentation par les protéines du CD1. Cela est cohérent avec la structure de la protéine, présentée précédemment, compatible avec un rôle de transport de nombreux lipides.



**Figure 14 : Représentation schématique des deux modèles de fonctionnement des LTP.**

**A)** Dans le cas du modèle « perturbateur de membrane », La LTP (jaune), forme un complexe soluble avec le lipide pour le présenter à l'hydrolase (bleu) dans le lumen du lysosome. **B)** Dans le cas du modèle « liftase », La LTP (en orange), perturbe l'intégrité de la membrane afin de permettre à l'hydrolase (violet) d'accéder au lipide.

D'après Hill et al. 2018.

## b) Les saposines

Les quatre saposines (SAP pour « Small Activator Protein »), Sap-A, Sap-B, Sap-C et Sap-D sont des glycoprotéines de petite taille (8 à 11 kDa). Ces protéines proviennent du clivage lysosomal d'un précurseur commun : la prosaposine, une glycoprotéine de 70 kDa composée des domaines codant pour les quatre saposines en tandem (O'Brien et al. 1988). Des expériences d'inactivation de l'expression de la prosaposine chez des modèles murins ont révélé une grave altération de l'activation des lymphocytes NKT, spécifiques de CD1d (Zhou et al. 2004). Chez l'homme, la transduction de fibroblastes par les gènes codants pour CD1d et le gène codant pour la prosaposine, suivi de la stimulation par l' $\alpha$ -GalCer permet l'activation de clones NKT, montrant que les saposines sont indispensables au chargement de ce lipide sur CD1d et à la stimulation des NKT *in vitro* (Kang et al. 2004). Bien que toutes les saposines possèdent une structure similaire, incluant un site de glycosylation et un motif de six cystéines et des acides aminés prolines aux mêmes positions (Munford et al. 1995), elles semblent jouer différents rôles dans l'activation des hydrolases des sphingolipides chez l'homme (Darmoise et al. 2010; Kishimoto et al. 1992). Leurs dysfonctionnements sont liés à des pathologies chez l'homme, celui de la Sap-A induit une accumulation du  $\beta$ -GalCer dans les tissus des souris (Matsuda 2001) et la maladie de Krabbe chez l'homme (Spiegel et al. 2005), alors que les mutations dans les Sap-B et Sap-C induisent la maladie de Gaucher (Vaccaro et al. 2010).

Deux mécanismes de fonctionnement des saposines sont proposés (**figure 14**), le premier est le modèle de "solubilisant", où la LTP est capable d'extraire entièrement et de former un complexe stable avec le lipide afin de le présenter à l'hydrolase. Les Sap A et B jouent ce rôle et ce modèle de solubilisant est également celui proposé pour les LTP CD1e et GM2AP. Le second est le modèle de "liftase", où la LTP perturbe l'intégrité de la membrane pour permettre aux hydrolases d'avoir accès aux lipides, ce rôle est supposé pour les Sap C et D.

La Sap-A est essentielle pour l'hydrolyse du 4-méthylumbelliféryle  $\beta$ -glucoside et du glucocérebroside par la  $\beta$ -glucosylcéramidase, ainsi que celle du galactocérebroside par la  $\beta$ -galactosylcéramidase (GALC) (Morimoto et al. 1989). L'environnement du lysosome, à savoir un pH acide avec une faible concentration de cholestérol et une forte concentration de bis(monoacylglycerol) phosphate (BMP), favorise l'activité d'extraction lipidique de Sap-A (Locatelli-Hoops et al. 2006). La structure de Sap-A avec GALC a été élucidée en 2018 et montre que la présence de détergents dans sa cavité hydrophobe est nécessaire pour

que Sap-A adopte une conformation ouverte, nécessaire pour l'interaction avec l'hydrolase. Cette même étude de Hill et al. de 2018 révèle que Sap-A forme un hétérotétramère avec la GALC, et que ces interactions *in vivo* sont fortement spécifiques de la Sap-A (Hill et al. 2018). *In vitro*, cette LTP permet le transfert de phospholipides incorporé à des lysosomes sur CD1d (Zhou et al. 2004). Une approche informatique de simulation de dynamique moléculaire a montré que la Sap-A pourrait être impliquée dans le processus de chargement et d'échange des lipides avec CD1d dans des environnements acides (Cuevas-Zuviría et al. 2020). Pour le moment, il n'y a pas d'évidence que la Sap-A joue un rôle précis dans le chargement de lipides sur les protéines du CD1 *in vivo*.

Sap-B a été décrite pour la première fois en 1964 (Mehl et al. 1964). Cette saposine permet l'hydrolyse des sulfatides par l'arylsulfatase A (ARSA) (Vogel et al. 1991), des lipides Gb3 et Ga2Cer par l' $\alpha$ -galactosidase A (Fürst et al. 1992), et du LacCer par la galactosylceramide  $\beta$ -galactosidase (Sun et al. 2008). De plus, elle assiste la LTP GM2AP dans la dégradation des sphingolipides GM1 *in vitro* (Wilkening et al. 2000; Li et al. 1985), et stimule également l'hydrolyse de nombreux glycolipides par des glycosidases de plantes et d'animaux, démontrant une grande diversité de ligands. Sap-B est un homodimère avec une cavité hydrophobe permettant la prise en charge des lipides (Ahn et al. 2003).

Cet homodimère a deux conformations : la conformation ouverte, qui interagit directement avec la membrane en réorganisant les chaînes de lipides, et la conformation fermée, facilitant l'extraction des substrats, ce qui démontre que cette saposine a également le rôle de "liftase", comme Sap-A (Fischer et al. 1978). Cette saposine est capable d'extraire et de transférer une variété de lipides entre deux membranes, comme les PC et PI et les sulfolipides GM1, mais pas le cholestérol (Ciaffoni et al. 2006). Concernant le chargement des lipides sur les protéines du CD1, étant donné qu'elle forme des complexes solubles avec les lipides, elle ne peut transférer que les lipides à chaînes courtes, comme le GMM C32, mais pas le GMM C80 sur CD1b (León et al. 2012). L'étude de Yuan et al. a permis de déterminer que Sap-B était la saposine principale intervenant dans le chargement de l' $\alpha$ -GalCer sur CD1d, permettant l'activation des cellules NKT (Yuan et al. 2007). Cette étude révèle également que le pH optimal de Sap-B est de 6, ce qui suggère une action tout au long de la voie d'endocytose. En 2019, Shamin et al. ont tenté de déterminer comment Sap-B pourrait charger des lipides sur CD1d, en utilisant des versions recombinantes de CD1d et Sap-B dans le but d'observer des interactions directes, mais ces analyses n'ont pas pu démontrer d'interaction directe entre Sap-B et CD1d (Shamin et al. 2019).

La protéine Sap-C est un homodimère requis pour assister la dégradation du  $\beta$ -glucosylcéramide en céramide par la glucosylceramide- $\beta$ -glucosidase (O'Brien et al. 1971). Le mode de fonctionnement de Sap-C diffère de celui de Sap-A et Sap-B. En effet, elle ne forme pas de complexe soluble avec les lipides et joue plutôt le rôle de « liftase », en perturbant localement la bicouche lipidique (León et al. 2012; Wilkening et al. 1998). Une seule étude a montré un rôle de Sap-C dans le contexte du chargement de lipides sur CD1b : l'ajout de Sap-C recombinante, mais pas des autres saposines, dans des fibroblastes exprimant CD1b permet l'activation de LT spécifiques du GMM, LAM et AM (Winau et al. 2004).

Sap-D permet la dégradation des céramides en sphingosines par la céramidase acide ASAH1 (Azuma et al. 1994). Elle stimule également l'hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase acide *in vitro*, bien que cette dégradation ne semble pas requise *in vivo* (Linke et al. 2001). Sap-D agit sous forme de monomère ou d'homodimère et est capable de lier les vésicules contenant des lipides chargés négativement pour permettre leur solubilisation (Ciaffoni et al. 2001). A partir de la structure de Sap-D avec une céramide obtenue par cristallographie, il a été suggéré sa conformation, et donc probablement sa fonction, était proche de Sap-C, à savoir un perturbateur de membranes (Gebai et al. 2018). Aucun rôle direct de Sap-D dans le chargement des lipides sur les protéines du CD1 n'a été identifié à ce jour.

### c) **GM2AP**

La protéine GM2AP est une protéine de 20 kDa (Fürst et al. 1992). Elle assiste dans les lysosomes la  $\beta$ -hexosaminidase A dans la dégradation du ganglioside GM2, permettant la génération du GM3 par libération d'une N-acétylgalactosamine (Conzelmann et al. 1979). GM2AP forme des complexes solubles avec les glycosphingolipides, qui peuvent être accommodés dans sa cavité hydrophobe lorsque la LTP est en conformation ouverte. La formation du complexe permet à GM2AP d'entrer en conformation fermée, et de transférer le GM2 d'un liposome donneur à un liposome accepteur (Wright et al. 2003). Ainsi, cette protéine possède également un mode d'action de liftase. Les études de Zhou et al. et de Cuevas-Zuiviría et al. ont permis de déterminer que GM2AP permettait le chargement de lipides sur CD1d (Zhou et al. 2004; Cuevas-Zuiviría et al. 2020).

#### **d) NPC1 et NPC2**

Enfin, la LTP lysosomale NPC2, en association avec la protéine NPC1, est nécessaire à l'efflux de cholestérol hors du lysosome (Ioannou et al. 2000; Liou et al. 2006). Les rôles des protéines NPC1 et NPC2 dans le chargement des lipides sur les protéines CD1 ont été étudiés sur des modèles de souris KO. Dans les souris déficientes pour NPC1, la présentation d'antigènes lipidiques de *Sphingomonas* aux cellules NKT était négativement impactée, et ces lipides s'accumulent au niveau des endosomes tardifs. De plus, ces souris ne possèdent pas les cellules iNKT V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18, qui représentent la population majoritaire de cellules NKT chez les souris (Sagiv et al. 2006). À l'inverse de cette étude suggérant l'importance de NPC1 pour l'activation des cellules NKT chez la souris, l'étude de Speak et al. a montré que chez les patients déficients pour NPC1, la fréquence des cellules NKT ainsi que leur activation restent les mêmes que chez les individus sains (Speak et al. 2012).

Quant aux souris déficientes pour NPC2, elles présentent des défauts dans la présentation d'iGb3 et d' $\alpha$ -GalCer par CD1d aux NKT (Schrantz et al. 2007), qui se traduisent par une faible quantité d'IFN- $\gamma$  secrétées par ces cellules. Cette étude révèle également que NPC2, sous forme d'homodimère, de la même manière que les saposines, est capable de charger et décharger les lipides de CD1d.

#### **2) Apprêtement des lipides par les enzymes lysosomales**

Les potentielles étapes moléculaires rendant les lipides mycobactériens reconnaissables par les LT sont pour l'instant en grande partie non élucidées. Certains lipides nécessitent d'être dégradés en structures plus petites, soit sur la partie osidique soit sur la partie lipidique, pour être capables d'activer les LT. Au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes, certains acteurs responsables de l'apprêtement des parties polaires ou apolaires des antigènes lipidiques ont été identifiés et sont présentés dans cette partie.

##### **a) Modification des parties osidiques**

C'est en 2001 que Prigozy et al. ont mis en évidence pour la première fois la nécessité d'apporter un antigène lipidique pour sa présentation par les protéines CD1. La présentation du glycolipide synthétique Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)GalCer par CD1d nécessite un apprêtement dans le lysosome. En effet, des expériences de présentation sur des cellules exprimant CD1d délété de sa queue cytoplasmique empêchent son internalisation et ne permettent pas l'activation

des LT. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de l'acidification des endosomes empêche également la réponse lymphocytaire. Les auteurs ont identifié l'enzyme lysosomale  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A) comme responsable de la digestion de l'unité galactosyle terminale du Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)GalCer afin de produire l' $\alpha$ -GalCer, antigène qui induit l'activation des cellules iNKT (Prigozy et al. 2001).

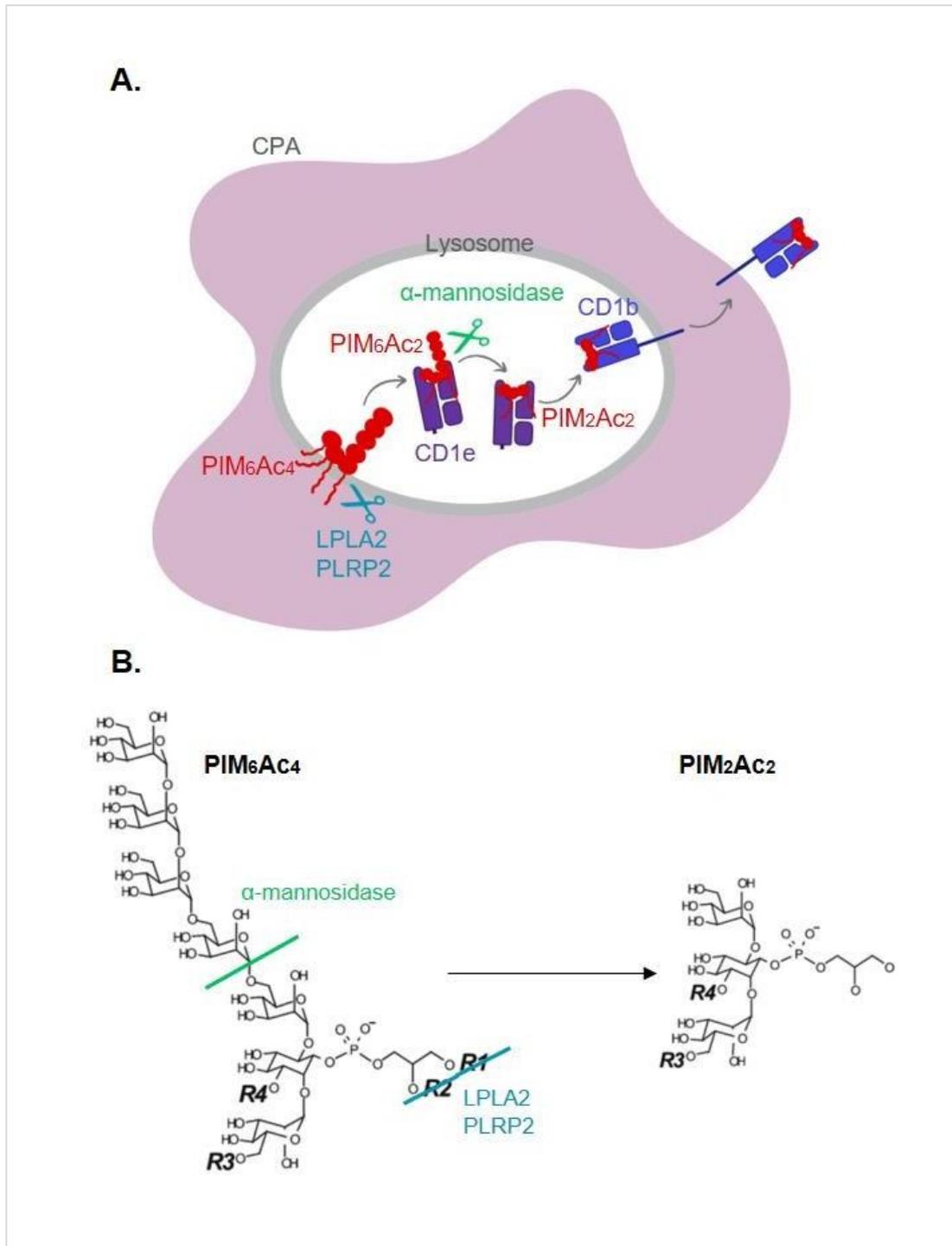
La  $\beta$ -hexosaminidase est également une hydrolase lysosomale jouant un rôle important dans la présentation de lipides aux cellules NKT. Une étude de Zhou et ses collaborateurs en 2004 montre en effet que des souris déficientes pour cette enzyme ne sont pas capables d'activer les iNKT spécifiques du ganglioside trisaccharidique endogène iGb3, qui est un puissant activateur des cellules NKT. En effet la  $\beta$ -hexosaminidase est impliquée dans le catabolisme de l'iGb4 en libérant la N-acétyl-galactosamine pour produire l'iGb3 (Zhou et al. 2004). L' $\alpha$ -Gal A transforme ensuite l'iGb3 en lactosylcéramide, permettant sa présentation aux cellules iNKT CD4<sup>+</sup> chez la souris, comme le montre l'étude de Macedo et al (Macedo et al. 2012). Des souris n'exprimant pas l'enzyme possèdent en effet un nombre réduit de lymphocytes, et une thérapie par remplacement d'enzyme avec l' $\alpha$ -Gal A permet de rétablir ce déficit dans la rate des animaux.

Concernant les lipides mycobactériens, deux exemples de digestion des parties osidiques ont été décrits à ce jour. La première concerne la forme hexamannosylée du PIM (PIM6), qui est apprêtée en PIM2 par l' $\alpha$ -mannosidase (De La Salle et al. 2005). Cette implication a été démontrée par l'utilisation de swainsonine, un inhibiteur spécifique de l' $\alpha$ -mannosidase, induisant une diminution de l'activation des clones lymphocytaires spécifiques des PIM6 mais pas de Ac<sub>2</sub>SGL. Dans la même étude, le rôle de l'enzyme est confirmé par stimulation de CD de donneurs atteints d' $\alpha$ -mannosidose avec du PIM6, résultant en une activation des clones spécifiques réduite de 50%. Cette digestion nécessite d'être assistée par l'isoforme CD1e.

Le second exemple de lipide mycobactérien subissant une digestion de sa partie osidique est le MPM, qui est quant à lui hydrolysé sous sa forme antigénique phosphomycokétide (PM) pour sa présentation par CD1c. L'enzyme responsable n'a pas encore été caractérisée (Lyet et al. 2013).

## **b) Modification des parties lipidiques**

Peu d'études montrent qu'une digestion de la partie lipidique est requise pour que les lipides soient chargés et présentés. En 2013 la phospholipase lysosomale A2 (LPLA2) a été



**Figure 15 : Digestion lysosomale des PIMs pour la présentation par CD1b.**

**A)** PIM6 Ac4 est dégradé par les phospholipases lysosomales (PLRP2 et LPLA2) en forme diacylée non naturelle, portant les 2 acides gras sur le mannose et l'inositol. Cette forme diacylée peut être prise en charge par CD1e qui présente alors le PIM à l' $\alpha$ -mannosidase afin qu'elle digère la partie osidique. Ce PIM2Ac2 est transféré sur CD1b pour être présenté aux LT. **B)** Structure des PIM6Ac4 et des PIM2Ac2 générés par apprêtement. R1 = R2= C16 ou C19, R3 = C16, R4 = C16, C18 ou C19.

montrée comme étant impliquée dans la génération d'antigènes lipidiques présentés par CD1d chez la souris. En effet, des souris délétées pour cette lipase présentent un défaut de la présentation des lipides endogènes par CD1d (Paduraru et al. 2013). Cette diminution de la présentation induit une diminution du nombre de cellules iNKT, pouvant s'expliquer par le fait que la présentation de lipides endogènes par CD1d permet également la sélection thymique de ces lymphocytes.

Il a été montré en 2016 par Gilleron et ses collaborateurs que les phospholipases lysosomales LPLA2 et PLRP2 (pancreatic lipase-related protein 2) sont capables de digérer les PIM tétra-acylés en PIM diacylés, afin qu'ils puissent être présentés par CD1b aux LT spécifiques. Ceci a été démontré par l'inactivation de l'expression de ces lipases, qui a eu pour effet d'empêcher la présentation de PIM lorsque les cellules sont mises en présence de PIMs tétra-acylés. Ces enzymes sont capables de digérer les deux chaînes d'acide gras localisées sur le glycérol de l'antigène, formant ainsi des PIM diacylés qui ne sont pas naturellement retrouvés chez les bactéries, et qui sont capables d'activer le clone lymphocytaire, contrairement aux formes naturelles de PIM2Ac2 (Gilleron et al. 2016) (**figure 15**).

Lors d'une récente étude structure-fonction des sulfatides qui stimulent généralement les cellules NKT de type II, Nishio et al. ont découvert que certaines modifications de lipides endogènes au niveau du lysosome pouvaient avoir un impact sur le type de lymphocytes stimulés. Certains analogues de ces lipides avec des chaînes de sphingosine C24 présentant aucune, une ou deux insaturations (C24 :0, C24 :1 et C24 :2) activent des populations de NKT différentes, selon qu'ils transitent ou non par les lysosomes. Les sulfatides avec C24:1 et C24:2 présentés par le monomère CD1d sur plaque ELISA (présentation *in vitro*) stimulent les NKT de type II et non de type I, ce qui est attendu. En revanche, de façon inattendue, lorsque le sulfatide avec C24:2 est présenté par des CD murines, la spécificité de stimulation des cellules NKT a été inversée vers le type I. Ainsi, le sulfatide avec C24:2 a été transformé dans les BMDC, passant d'un ligand stimulant les cellules NKT de type II à un ligand stimulant les cellules NKT de type I. Il s'agit de la première découverte montrant que l'apprêtement antigénique modifie la spécificité pour la cellule cible (Nishio et al. 2024).

## Présentation du projet

Les principales étapes de la présentation des antigènes lipidiques mycobactériens par CD1b sont connues. Cela inclut la biosynthèse de CD1b, son transport vers les lysosomes - où elle rencontre la majorité des lipides antigéniques mycobactériens - et l'interaction des complexes CD1b-lipides avec les TCR des LT, capables d'induire une réponse immunitaire spécifique et protectrice. Cependant, la formation du complexe CD1b-lipide dans les lysosomes reste mal comprise. Il est possible que certains antigènes nécessitent l'intervention de protéines cellulaires non identifiées à ce jour pour être chargés sur CD1. Actuellement, seuls les PIM et le MPM sont des lipides mycobactériens connus pour être apprêtés par des enzymes lysosomales. L'hydrolase responsable de la digestion du MPM en PM n'a pas encore été identifiée, mais la dégradation des PIM est mieux décrite. Les PIM6 sont clivés en PIM2 par l' $\alpha$ -mannosidase assistée par CD1e, et ces PIM2 tétra-acylés deviennent antigéniques seulement après hydrolyse de deux acides gras par les phospholipases PLRP2 et LPLA2. Ces études sur les PIM ont montré que les parties polaires et lipidiques des lipides mycobactériens pouvaient être digérées par des enzymes cellulaires.

Nous supposons donc que d'autres lipides mycobactériens pourraient également être digérés pour devenir immunogènes. En effet, jusqu'à présent, les lipides présentés par CD1b semblent tous posséder uniquement deux chaînes d'acides gras, ce qui est cohérent avec la structure des sillons hydrophobes de CD1b. Nous formulons ainsi l'hypothèse que certains lipides, comme le Ac4SGL, ou les TAT et PAT, pourraient être digérés par des lipases lysosomales pour produire des lipides à deux chaînes d'acides gras, aptes à être présentés par CD1b. De plus, des lipides comme le LAM et le LM, possèdent des parties polaires importantes, qui pourraient nécessiter un apprêtement afin de permettre la formation du complexe ternaire TCR-lipide-CD1b. Les principales LTP impliquées dans le chargement des lipides antigéniques sur CD1 ont été décrites dans le contexte de CD1d. Pour CD1b, seules Sap-C et CD1e sont connues à ce jour. Il a été montré que Sap-C permet le chargement de lipides sur CD1b, activant les LT spécifiques du GMM, LAM et AM, et CD1e permet la présentation des PIM. Il est possible qu'en fonction du type de lipide antigénique, d'autres LTP pourraient être nécessaires pour transporter ces lipides vers CD1b. De manière générale, il est envisageable que des partenaires protéiques de CD1b, impliqués dans sa stabilité dans les lysosomes et dans son transport vers les endosomes, puis vers la surface cellulaire, restent encore à découvrir.

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouveaux acteurs cellulaires, localisés dans le lysosome, impliqués dans les étapes d'apprêtement des lipides mycobactériens et leur chargement sur CD1b. Pour ce faire, nous avons donc cherché à établir une liste de protéines candidates pouvant avoir une fonction soit de LTP, soit enzymatique, capable de digérer les parties osidiques ou lipidiques de lipides mycobactériens. Ces protéines candidates ont été sélectionnées à partir des données d'analyses protéomiques de fractions lysosomales (FL) de CPA. Nous avons également tenté d'identifier de potentielles activités hydrolases sur des lipides mycobactériens *in vitro* afin d'avoir une idée des types d'hydrolases qui pourraient être contenues dans ces lysosomes. Enfin, nous avons mis en place une stratégie pour définir l'interactome de CD1b au sein du lysosome, par une stratégie de co-immunoprécipitation (co-IP). Ces différentes expériences ont donc pour objectif de nous permettre d'établir une liste de protéines candidates à inactiver pour évaluer leur rôle dans la présentation de lipides mycobactériens par CD1b. Cette inactivation sera envisagée dans un premier temps grâce à des inhibiteurs commerciaux, puis avec des SiRNA.

Les effets de l'inactivation de ces protéines candidates sur la présentation de complexes CD1b-lipide seront étudiés principalement grâce à deux outils biologiques :

- 1) un anticorps recombinant spécifique du complexe CD1b- Ac<sub>2</sub>SGL :  
l'anticorps dAbk11 (D11).
- 2) des clones de LT CD1b-restreints dont le TCR est spécifique d'un lipide mycobactérien spécifique.

# Résultats

## Chapitre 1 : Validation des outils biologiques permettant de suivre la présentation des antigènes lipidiques par CD1b

### 1) Choix des CPA

Afin d'étudier la présentation des lipides mycobactériens par CD1b, le choix des CPA est crucial. Lors de ce projet, le gène codant pour CD1b a été introduit dans les lignées K562 et THP-1. Cependant, les CPA permettant de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques sont les CD humaines. Lors de ce projet, nous avons donc également utilisé des CD isolées des cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) de donneurs.

#### a) Présentation des lignées THP-1 et K562

Les lignées THP-1 et les K562 sont toutes deux dérivées de cellules myéloïdes multipotentes. Les K562 ont été caractérisées en 1976 par Klein et al., et ont été isolées en 1973 de la moelle osseuse d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde (Klein et al. 1976). Les cellules THP-1 ont été isolées du sang d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire aiguë, elles sont couramment utilisées en laboratoire pour leurs capacités de différenciation en macrophages, par induction avec des esters de phorbol (Phorbol 12-myristate 13-acétate ou PMA) (Tsuchiya et al. 1980).

Il est important de souligner que les cellules K562 sont des précurseurs ayant des caractéristiques myéloïdes. Elles n'ont pas encore atteint un stade de maturation avancé, ce qui leur confère des capacités prolifératives élevées, mais des capacités de phagocytose réduites par rapport aux CPA professionnelles. En revanche, les cellules THP-1 se trouvent à un stade de différenciation plus avancé vers les monocytes et sont considérées comme une lignée monocyttaire capable de se différencier en macrophages. De ce fait, elles présentent des caractéristiques plus similaires à celles des CPA que les K562, faisant d'elles un meilleur modèle d'étude.

Toutefois, ces deux lignées, une fois transfectées avec le gène codant pour CD1b, ont déjà fait l'objet de nombreuses études dans le contexte de la présentation des antigènes lipidiques. Cela implique qu'elles possèdent la machinerie moléculaire suffisante à la présentation de ces lipides. Par exemple, les K562 ont été utilisées pour activer le clone

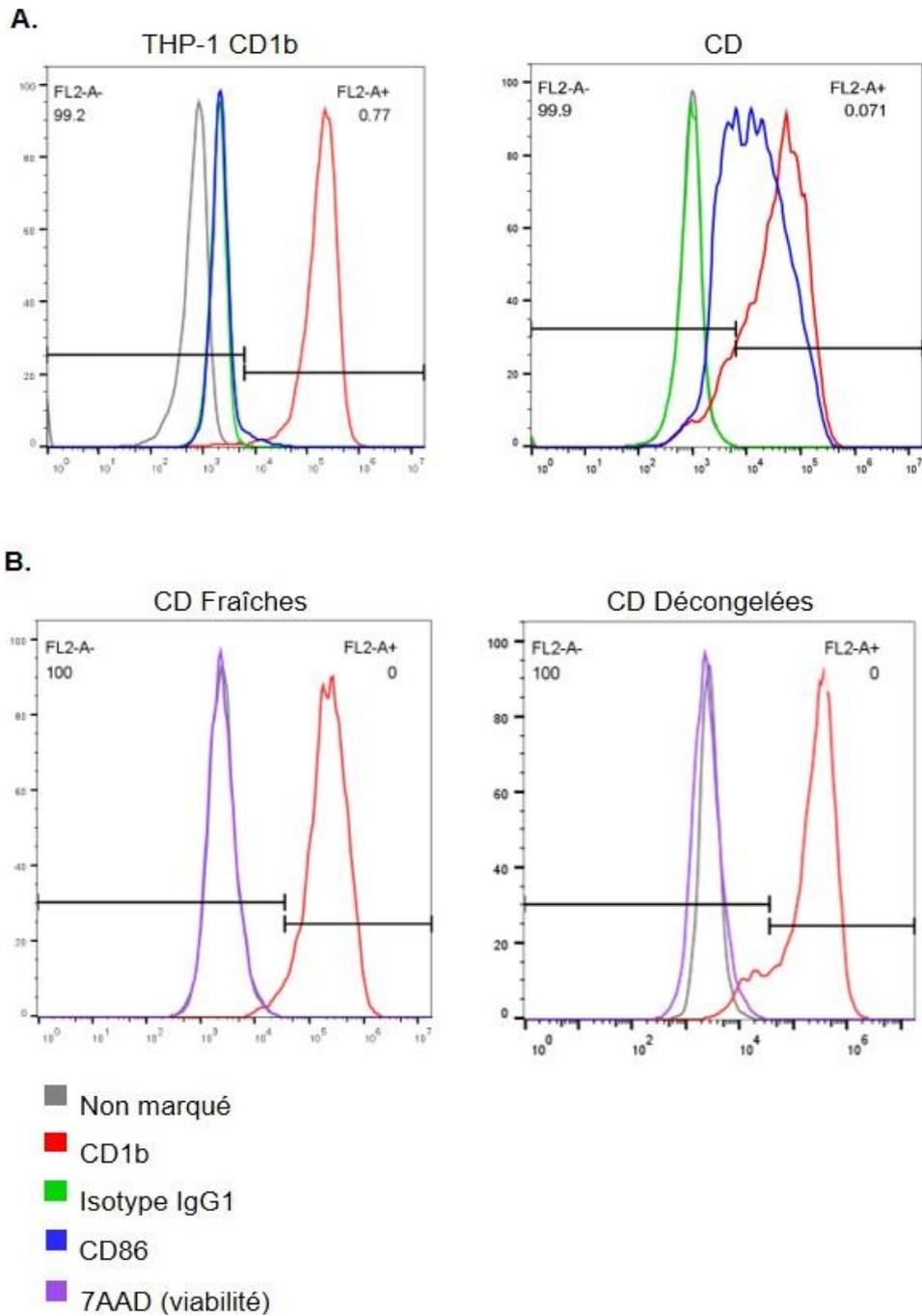
autoréactif PG90, qui reconnaît le PG (Shahine et al. 2017), ainsi que le clone spécifique du GMM LDN5 (De Jong et al. 2010). Les THP-1 sont également couramment utilisées pour étudier l'activation de LT restreints par CD1 (Layre et al. 2009; Gilleron et al. 2004).

Ces lignées cellulaires n'expriment pas les protéines CD1 de manière endogène. Dans l'équipe, les K562 ont précédemment été transfectées par électroporation avec le plasmide pSelect2B codant pour la protéine CD1b, et les THP-1, dont la transfection n'a pas été possible, ont été transduites avec un lentivirus (pLVb72-1361) codant pour CD1b. Cela a permis d'obtenir des lignées exprimant stablement CD1b, capables de présenter des lipides mycobactériens aux clones spécifiques, et dont le maintien est plus facile que celui des cellules primaires. D'autres cellules provenant de ces lignées ont été générées pour exprimer l'isoforme CD1e en plus de CD1b, étant donné que cette LTP est nécessaire à l'apprêtement des PIM.

L'avantage principal d'utiliser des cellules immortalisées réside dans le fait que les résultats sont plus reproductibles, car ils ne sont pas dépendants du donneur. De plus, ces deux lignées de cellules sont robustes et leur culture et manipulation ne nécessitent pas de précautions particulières. Cependant, il ne s'agit pas de CPA professionnelles et il se peut que des protéines nécessaires à l'apprêtement de certains lipides ne soient pas présentes dans ces cellules. Les processus de phagocytose et de prise en charge des antigènes lipidiques à travers le réseau d'endosomes peuvent également être moins efficaces que dans les CD. De ce fait, des CD issues de sang de donneurs ont également été utilisées lors de cette étude.

## **b) Utilisation de CD obtenues à partir de monocytes**

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, les CD restent le modèle cellulaire de choix pour l'étude de la présentation des lipides antigéniques par les protéines CD1. Afin de pouvoir les étudier dans ce contexte, nous avons isolé les PBMC de poches de sang de donneurs (Etablissement Français du Sang). Chaque poche permettait d'obtenir environ 400 millions de cellules. Les monocytes étaient isolés de ces PBMC à l'aide de billes magnétiques spécifiques du marqueur CD14 et entre 80 et 130 millions de monocytes étaient récupérés. Enfin, ces monocytes étaient différenciés en CD grâce à un traitement avec 400 U/mL de GM-CSF et 200 U/mL d'IL-4. Le traitement des poches de sang doit être réalisé rapidement après réception de ces dernières et les cellules doivent être ensuite



**Figure 16 : Analyses par cytométrie en flux des CD et THP-1 CD1b** A) Vérification de l'expression de CD1b (rouge) et du marqueur CD86 (bleu) dans les cellules THP-1 CD1b (gauche) et dans les CD humaines fraîches (droite). B) Comparaison de l'expression de CD1b (rouge) dans les CD humaines fraîches ou décongelées (1h après décongélation). La viabilité est mesurée à l'aide du marqueur 7AAD(violet).

utilisées entre 6 et 7 jours après être isolées et différenciées. A l'issue de ces 6 jours, une moyenne de 50 millions de CD était obtenue à partir d'une poche de sang.

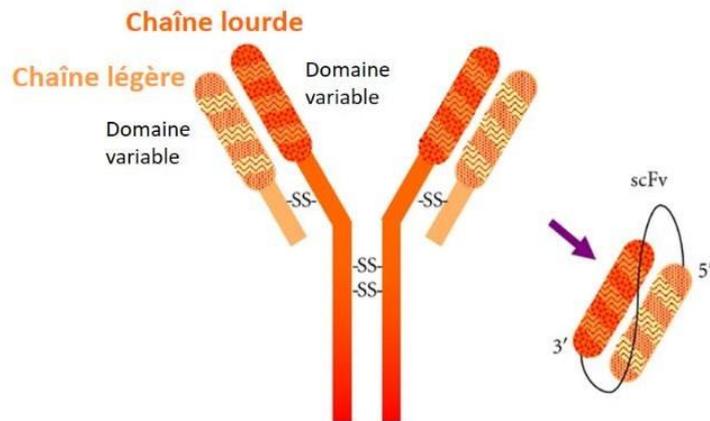
L'expression de CD1b endogène, ainsi que l'expression de CD86, qui est une protéine exprimée par les CPA professionnelles, et qui joue un rôle dans l'activation des LT, ont été mesurées par cytométrie en flux à l'issue des 6 jours de différenciation. Cela permet de s'assurer que les CD obtenues sont correctement différenciées et possèdent le phénotype désiré. La **figure 16.A** montre que ces CD expriment CD86 et CD1b de manière endogène, alors que les THP-1 CD1b n'expriment pas CD86. Ainsi, le protocole utilisé pour isoler les monocytes du sang de donneurs, et les différencier en CD exprimant CD1b a pu être validé.

Comme chaque expérience d'isolation de CD nous permettait d'obtenir 50 millions de cellules, mais que les expériences effectuées avec ces cellules en nécessitaient parfois seulement 3 à 4 millions, nous avons entrepris de congeler ces CD afin de les utiliser sur plusieurs expériences. Grâce à cette stratégie, des CD issues du même donneur pouvaient être utilisées plusieurs fois afin de reproduire les mêmes conditions expérimentales. Dans la littérature, certaines études montrent que les fonctions de CPA de ces cellules ne sont pas impactées par la congélation et décongélation (Mendoza et al. 2002). Lors de la décongélation, la mortalité ainsi que l'expression de CD1b ont été contrôlées par cytométrie en flux. La **figure 16.B** montre que les CD décongelées présentent un marquage au 7-aminoactinomycine D (7AAD) - marqueur de viabilité cellulaire qui se lie à l'ADN des cellules mortes, et donc perméables - similaire aux cellules fraîches, et la mortalité est donc quasiment nulle. Ces CD décongelées expriment CD1b une heure après décongélation. Ainsi, les CD dérivées de monocytes humains ont été utilisées fraîches, mais également décongelées lors de ces travaux.

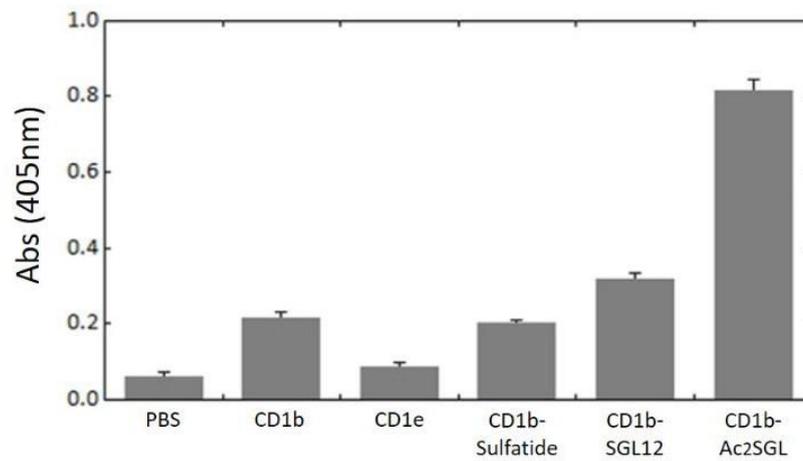
## 2) **Anticorps recombinant dirigé contre le complexe CD1b- Ac<sub>2</sub>SGL**

Ma thèse porte sur l'identification d'acteurs cellulaires permettant l'apprêtement des lipides mycobactériens, afin qu'ils soient présentés par CD1b. Il est donc nécessaire de disposer d'outils de reconnaissance des complexes CD1b-lipide mycobactérien, qui permettent de suivre avec sensibilité et spécificité cette présentation. J'ai mis en place une méthode de suivi de la présentation de l'antigène Ac<sub>2</sub>SGL avec des anticorps (AC) recombinants. Cet outil constitue une méthode de détection des complexes rapide, qui ne

A.



B.



**Figure 17 : Présentation de l'AC scFv D11** A) Schéma d'un AC scFv (Ahmad et al, Clin Dev Immunol2012). B) Spécificité de D11 pour le complexe CD1b- Ac<sub>2</sub>SGL mesurée par ELISA (les puits étaient coâtés avec du PBS, CD1b seul, CD1e seul, ou CD1b en complexe avec les SL sulfatide, SGL12 et Ac<sub>2</sub>SGL naturel)

Law et al. 2019

nécessite pas de culture et d'expansion cellulaire, à l'inverse des clones lymphocytaires.

**a) Les anticorps recombinants : des outils intéressants pour détecter la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL par CD1b en surface des CPA**

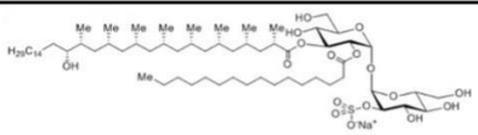
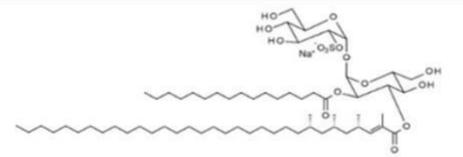
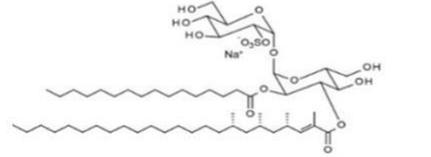
Un AC spécifique des complexes CD1b- Ac<sub>2</sub>SGL a été développé par l'équipe du Pr Acosta (Camacho et al. 2016) comme outil de diagnostic de l'infection : étant donné que les protéines CD1 ne sont pas polymorphes, cet AC permettrait de détecter les complexes et ainsi de marquer les cellules infectées par *Mtb* et diagnostiquer les individus rapidement. Il s'agit d'un AC scFv (« single-chain variable fragment », ou fragment variable à chaîne unique), à savoir une forme simplifiée d'AC ne contenant que les régions variables (de la chaîne lourde et de la chaîne légère) reliées par un court lien peptidique (**figure 17.A**). Les AC recombinants sont intéressants car leur petite taille permet de pénétrer plus facilement dans les tissus, tout en conservant la spécificité d'un AC complet. Cet AC est nommé dAbκ11 (qui sera simplifié en D11), et il interagit dans une moindre mesure, directement avec CD1b et reconnaît de manière plus faible que l'Ac<sub>2</sub>SGL naturel le sulfatide ainsi que le sulfoglycolipide synthétique SGL12 (Law et al. 2019). Cela a été démontré par test ELISA (« Enzyme-Linked Immunosorbent Assay»), où CD1b, CD1e, ou CD1b en complexe avec différents sulfolipides sont fixés au fond des plaques (**figure 17.B**).

Puisque l'objectif de ma thèse est de déterminer si des protéines candidates jouent un rôle dans la présentation des complexes CD1b-lipides à la surface des CPA, cet outil serait particulièrement intéressant pour étudier la présentation des Ac<sub>2</sub>SGL.

L'équipe d'Armando Acosta, en collaboration avec la nôtre, nous a fourni trois AC scFv, dont D11, ainsi que B7 et B12 (**tableau 7**). Pour cette étude, la détection de l'Ac<sub>2</sub>SGL en surface des cellules par cytométrie en flux est plus adaptée que les tests ELISA effectués par l'équipe du Pr Acosta. Nous avons donc d'abord validé que ces AC permettent d'étudier la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL via CD1b à la surface des CPA dans des conditions sans inactivation de protéines candidates.

Anticorps	Lipide reconnu	Méthode de sélection
D11	Ac2SGL	ELISA (CD1b en surface de THP-1)
B7	Ac2SGL	ELISA (complexe CD1b-Ac2SGL)
B12	Ac2SGL	ELISA (complexe CD1b-Ac2SGL)

**Tableau 7 : Tableau récapitulatif des trois AC recombinants testés pour leur reconnaissance du complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL.** Ces trois AC ont été sélectionnés par ELISA pour leur capacité à se fixer à ce complexe. D11 a été sélectionné pour sa reconnaissance de CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL en surface des THP-1, et B7 et B12 ont été sélectionnés pour leur reconnaissance de ce complexe fixé au fond de plaques.

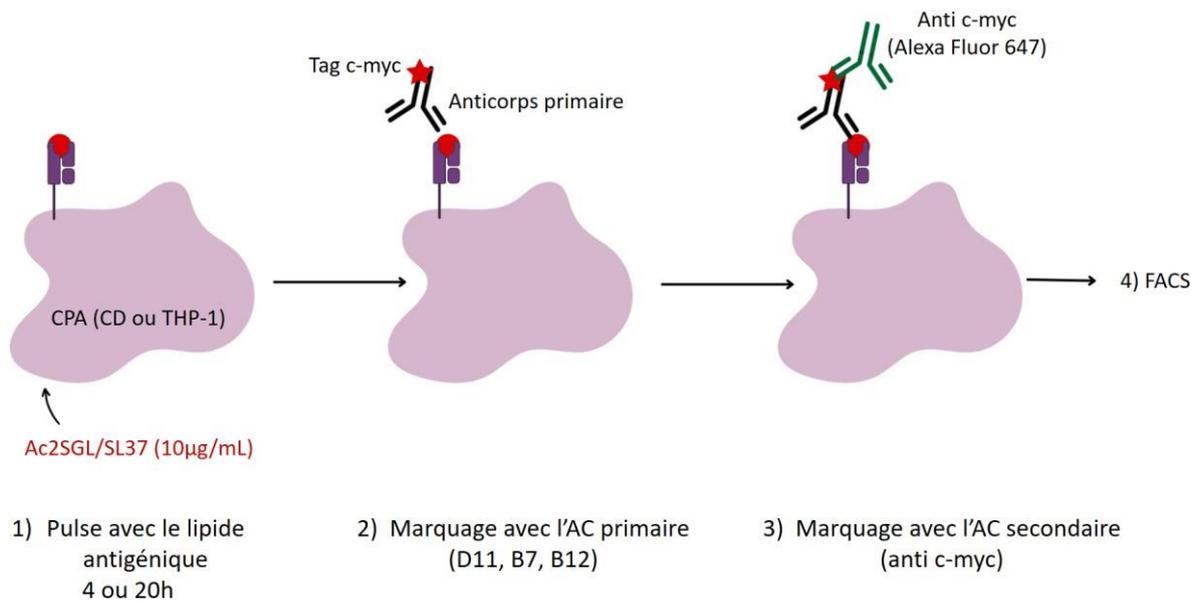
Composé	Chaîne en position 3 (type et longueur)	Groupement méthyles	Structure	Réactivité (ELISA)
Ac2SGL naturel	Hydroxyphthioceranyl	32	8	 +++++
SL37	2,4,6,8-tetramethyldotriacos-2-enoyl	32	4	 +++++
SGL12 (SL27)	2,4,6,8-tetramethyltetracos-2-enoyl	24	4	 ++

**Figure 18 : Etude de la spécificité de D11.** Réactivité de l'anticorps D11 au Ac2SGL naturel et aux SL synthétiques SL37 et SGL12. La réactivité a été mesurée par test ELISA avec les complexes CD1b-lipides fixés au fond des plaques. Tableau provenant de Camacho et al. *Frontiers in Immunology* 2020

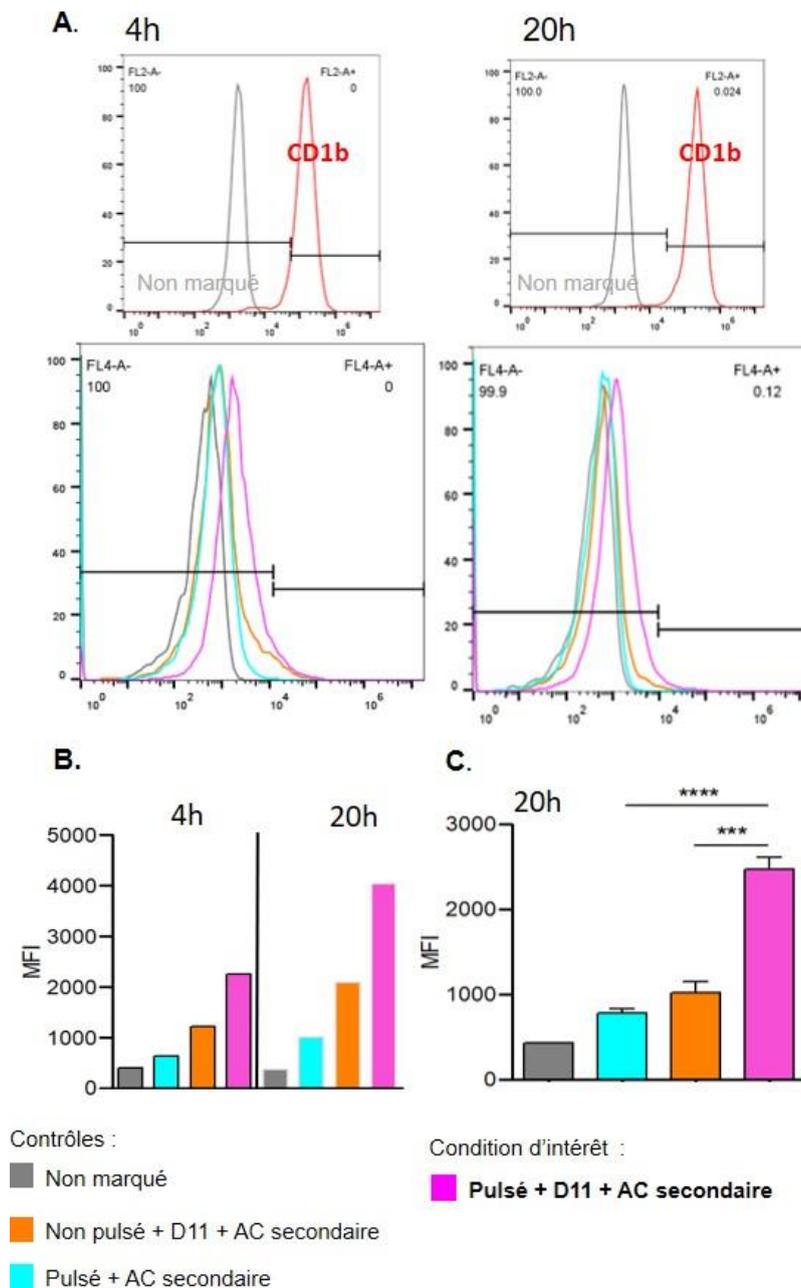
## b) L'anticorps D11 reconnaît le complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL en surface des CPA

### Validation des trois AC sur cellules THP-1

Bien que les CD constituent le modèle cellulaire le plus précis pour ces études, les premières étapes d'inhibition des protéines candidates se feront sur lignées cellulaires, car plus faciles à manipuler. Ainsi, il est nécessaire de valider les outils biologiques sur ces cellules. Nous avons commencé par valider la reconnaissance du complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL par l'AC D11 en surface des cellules THP-1, car la manipulation de cellules de lignée est plus reproductible que celle de cellules primaires.



**Figure 19 : Schéma du protocole de présentation lipidique de l'Ac<sub>2</sub>SGL (ou SL37) par CD1b et détection par FACS à l'aide des différents AC recombinants.** 1) Les CPA sont pulsées avec 10 µg/mL de lipide pendant 4 h ou 20 h. 2) Après incubation, un marquage est réalisé avec l'AC primaire spécifique de CD1b (D11, B7, ou B12). 3) Un marquage secondaire avec un AC anti-c-myc conjugué à Alexa Fluor 647 est réalisé pour visualiser le complexe. 4) Les cellules sont ensuite analysées par FACS pour évaluer l'expression et la présentation de l'antigène.



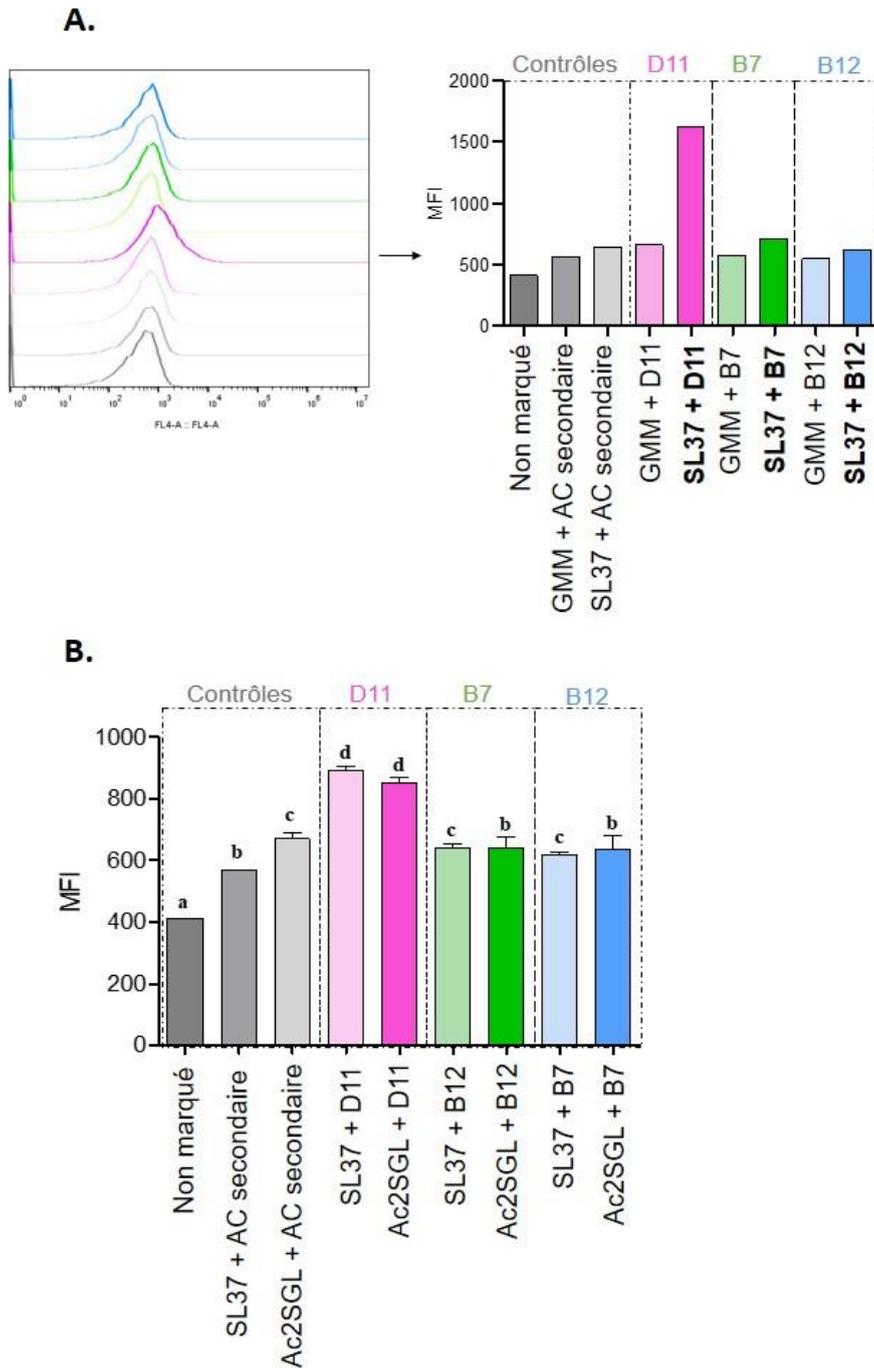
**Figure 20 : Analyse par cytométrie en flux de la reconnaissance de CD1b-SL37 par l'AC D11 en surface des THP-1.** **A)** Vérification de l'expression de CD1b après 4 ou 20h de pulse des THP-1 avec 10 $\mu$ g/mL de SL37. Marquage du complexe CD1b-SL37 avec D11 et un AC secondaire dirigé contre letag c-myc présent sur D11 (rose). Le signal non spécifique est observé grâce aux conditions où les CPA ne sont pas pulsées mais sont marquées avec les deux AC (orange), ou bien sont pulsées mais marquées avec l'AC secondaire uniquement (cyan). **B)** Diagramme de MFI pour comparer les résultats obtenus pour 4 et 20h de pulse. **C)** Pour la condition où les cellules sont pulsées 20h, le marquage a été effectué en triplicats et les résultats sont présentés dans ce diagramme de MFI où les différences entre les conditions sont comparées à l'aide d'un t-Test (p-value <0,05).

La première étape est l'incubation des CPA avec le lipide antigénique, nous appelons cette étape le pulse des CPA. Les SGL utilisés pour cette étape sont soit l'Ac<sub>2</sub>SGL naturel, soit un analogue synthétique, nommé SL37, qui correspond à un sulfotrèhalose, acylé par un acide palmitique et un acide gras insaturé tétra méthylé de 37 carbones. Il a été montré que D11 reconnaît l'Ac<sub>2</sub>SGL naturel et le SL37 avec une affinité comparable (Camacho et al. 2020) (**figure 18**). Concernant la concentration lipidique nécessaire, l'étude de Gilleron et al. de 2004 a montré qu'une concentration de 10µg/mL était suffisante pour activer des LT spécifiques de ce lipide (Gilleron et al. 2004). De plus, afin de générer l'AC D11, Camacho et al. ont également pulsé des THP-1 pendant 4h avec 10µg/mL, avant de sélectionner les phages M13 exprimant à leur surface des régions variables d'AC humains qui reconnaissaient le complexe (Camacho et al. 2016). Deux temps de pulse ont été testés : 4 heures, conformément aux travaux de Camacho et al., mais aussi 20 heures, car il est décrit que les lipides à chaînes longues (>C20) nécessitent un temps plus long pour une présentation optimale (Cheng et al. 2006; Moody et al. 2002; Camacho et al. 2016). Ces temps d'incubation sont cohérents avec la littérature et ne devraient pas présenter de risque de réinternalisation du complexe. En effet, les complexes CD1b-lipides sont peu stables en surface des CPA, et il a été observé que le complexe CD1b-sulfatide possède une demi-vie de 24h, contrairement au CD1a en complexe avec le même lipide, qui présente une demi-vie de 72h (Shamshiev et al. 2002).

Les CPA présentant en surface le complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL sont mises en présence des AC D11, B7 ou B12. L'absence de fragment constant sur ces AC recombinants rend impossible l'utilisation d'un contrôle isotypique ou d'un AC secondaire fluorescent dirigé contre ce fragment. Pour résoudre ce problème, les AC ont été synthétisés avec un tag c-myc, permettant la détection via des AC secondaires conjugués à un fluorophore spécifique de ce tag. Les deux étapes de marquage sont présentées dans la **figure 19**.

Les premiers résultats présentés concernent l'analyse du temps de pulse des THP-1 CD1b avec SL37 (**Figure 20**). L'évaluation du signal non spécifique se fait grâce à deux contrôles : 1) l'ajout de l'AC secondaire anti-c-myc seul sur cellules pulsées (en cyan sur les figures) et 2) l'ajout de l'AC primaire D11 et du secondaire sur des cellules non pulsées (en orange).

Le marquage par D11 du complexe CD1b-SL37, en rose sur les graphes, est visible aux deux temps d'incubation testés. Pour ces deux conditions, il est supérieur aux contrôles,



**Figure 21 : Comparaison par cytométrie en flux de la reconnaissance spécifique des SL par les AC D11, B7 et B12** **A)** Analyse de la reconnaissance spécifique de SL37 en comparaison au GMM par les trois AC recombinants, les résultats sous forme d'histogramme et de diagramme de MFI sont présentés. **B)** Diagramme des MFI reflétant la reconnaissance des complexes CD1b-SL37 et CD1b-Ac2SGL naturel par les anticorps D11, B7 et B12. Les marquages ont été effectués en triplicats et les tests statistiques correspondent à des t-tests ( $p < 0.05$ ).

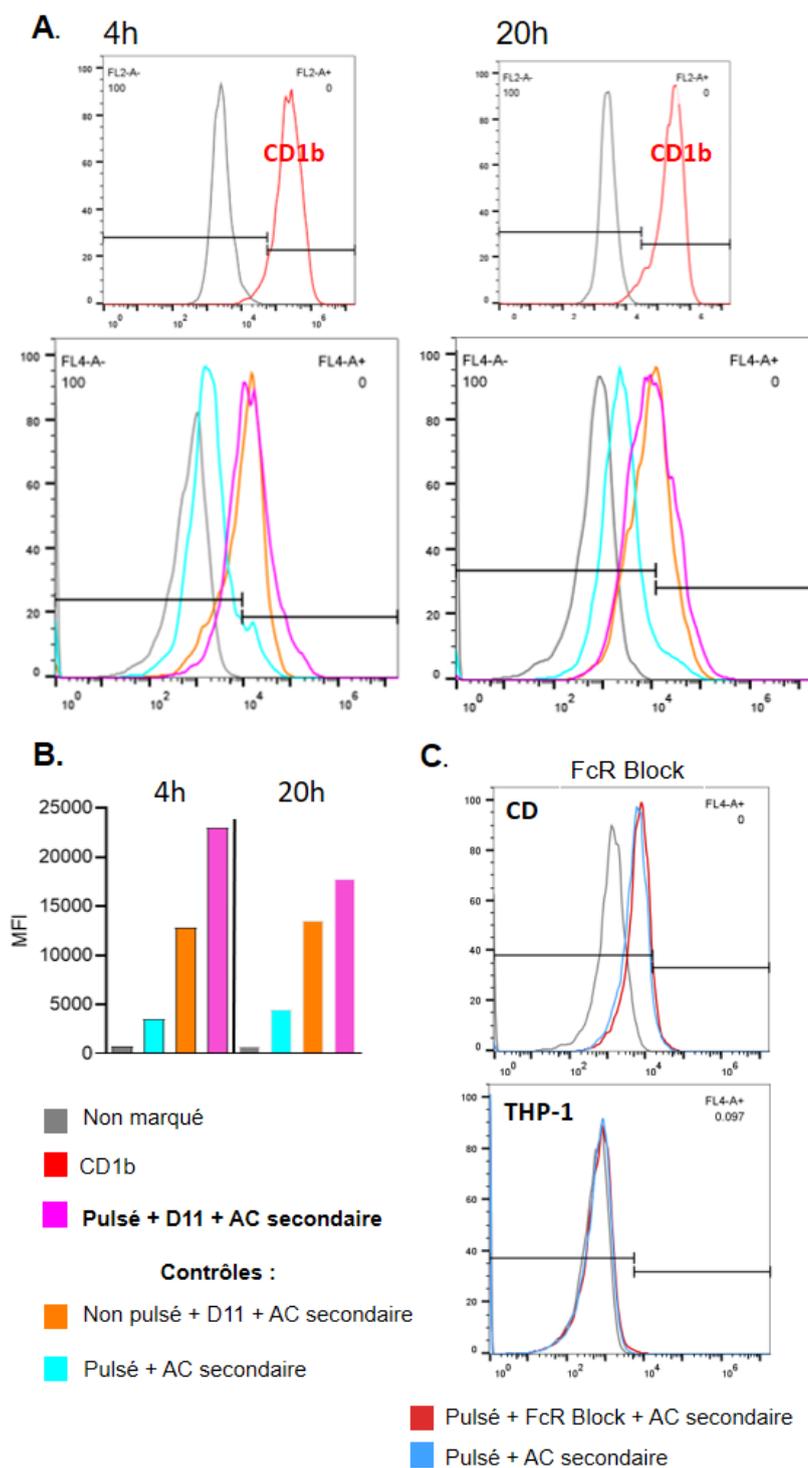
ce qui se traduit par un faible décalage de fluorescence lorsque les résultats sont présentés sous forme d'histogramme. Ainsi, les diagrammes recensant les intensités moyennes de fluorescence (MFI) permettent de mieux apprécier les résultats (**figure 20.A et 20.B**). Ces résultats suggèrent que les différences de MFI entre la condition d'intérêt et les contrôles sont identiques aux deux temps d'incubation (soit environ 2 fois supérieurs à la condition non pulsée avec les deux AC, et trois fois supérieures à la condition pulsée avec l'AC secondaire uniquement). Le signal est tout de même globalement plus important lorsque les CPA sont pulsées 20h. Il ne s'agit cependant que de tendances, car cette expérience n'a pas été réalisée en triplicats. Cependant, lorsque l'expérience est répétée en triplicats, D11 reconnaît de manière fiable le complexe CD1b-SL37 à la surface des THP-1 après 20h d'incubation (**figure 20.C**).

Pour savoir si B7 et B12 peuvent également reconnaître le complexe CD1b-SL37, le même protocole de pulse et de marquage a été appliqué en utilisant Ac<sub>2</sub>SGL, SL37 et GMM (un lipide de structure différente, servant à évaluer la spécificité des AC). Les résultats montrent que D11 reconnaît SL37 et Ac<sub>2</sub>SGL naturel avec la même intensité, sans se lier au complexe CD1b-GMM (**figure 21**). Cependant, B7 et B12, utilisés à la même concentration que D11 (5µg/mL) (**figure 21**), ou à des concentrations 2 à 5 fois supérieures à celles de D11 (données non présentées), n'ont pas montré de signal supérieur au bruit de fond.

Il est important de noter que ces trois AC ont été générés selon des protocoles différents. D11 a été sélectionné pour sa capacité à reconnaître les THP-1 CD1b pulsées avec l'Ac<sub>2</sub>SGL, tandis que B7 et B12 ont été sélectionnés pour leur reconnaissance du complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL fixé au fond de plaques. Cela pourrait expliquer leur sensibilité plus faible pour la détection du complexe en surface des cellules, où d'autres protéines membranaires peuvent entourer les complexes CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL et rendre sa reconnaissance plus complexe. Ainsi, D11 est le seul AC qui reconnaît de manière reproductible et spécifique les SGL en surface des THP-1.

### **Validation de D11 sur CD**

Les expériences effectuées sur les THP-1 ont été reproduites sur les CD, afin de savoir si les résultats observés étaient reproductibles avec des CPA professionnelles.



**Figure 22 : Analyse par cytométrie en flux de la reconnaissance de CD1b-SL37 par l'AC D11 en surface des CD.** A) Vérification de l'expression de CD1b après 4 ou 20h de pulse des CD avec 10 $\mu$ g/mL de SL37, et marquage du complexe CD1b-SL37 avec D11 et un AC secondaire dirigé contre le tag c- myc présent sur D11 (rose). Le signal non spécifique est observé grâce aux conditions où les CPA ne sont pas pulsées mais sont marquées avec les deux AC (orange), ou bien sont pulsées mais marquées avec l'AC secondaire uniquement (cyan). B) Diagramme de MFI pour comparer les résultats obtenus pour 4 et 20h de pulse. C) Histogrammes montrant le signal non spécifique lié à la fixation de l'AC secondaire avec et sans blocage des récepteurs Fc à l'aide de FcR Block (1 $\mu$ g/200 000 cellules).

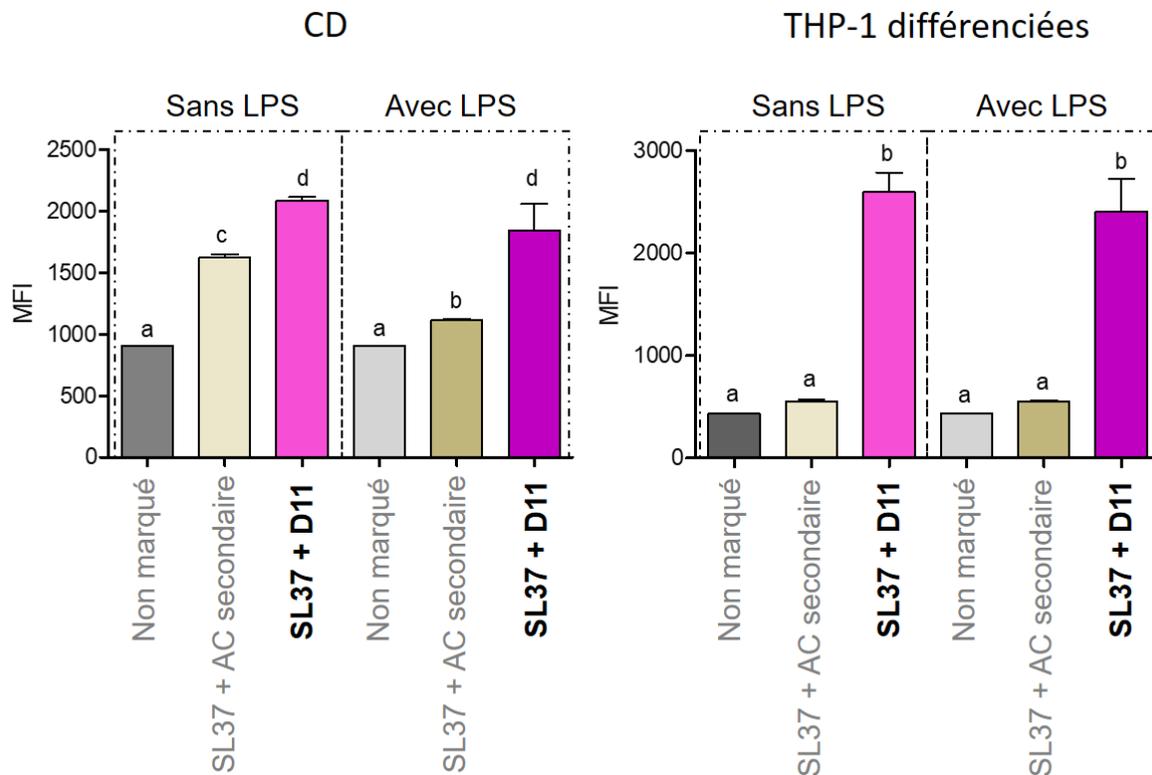
Comme le montrent les résultats de la **figure 22.B**, contrairement aux THP-1, le signal est plus intense lorsque les CD sont pulsées pendant 4h. Nous supposons que les CD possèdent des mécanismes d'endocytose, de transport des lipides vers les lysosomes, et de chargement de ces lipides sur CD1b plus efficaces que ceux des THP-1, et que le complexe est donc présenté plus rapidement.

Cependant, le signal obtenu sur les CD se distingue moins bien du bruit de fond comparé aux données obtenues sur THP-1 : sur l'histogramme, le contrôle Non pulsé +D11+AC secondaire présente également un décalage vers la droite, et semble se superposer à la condition d'intérêt (**figure 22.A**). Ceci a été observé sur 2 expériences de marquage indépendantes. Nous supposons que D11 et l'AC secondaire se lient aux CD de manière indépendante de la présentation de SL37. Ces fixations non spécifiques, observées sur les CD et non sur les THP-1, nous ont amené à penser que l'AC secondaire se fixe aux récepteurs Fc, présents sur les cellules immunitaires. Comme les cellules THP-1, qui sont des monocytes, possèdent également des récepteurs Fc, des expériences de blocage de ces récepteurs ont été menées pour déterminer si le bruit de fond observé dans les contrôles était dû à cette fixation (**figure 22.C**). Concernant les THP-1, aucun bruit de fond n'a été observé lorsque l'AC secondaire était ajouté seul, et le blocage des récepteurs Fc n'a donc pas eu d'effet. Ces résultats suggèrent que l'AC secondaire ne se fixe pas aux récepteurs Fc dans le cas des THP-1. Dans le cas des CD pulsées, l'ajout de l'AC secondaire induit un signal non spécifique, qui n'est pas réduit par le blocage des récepteurs Fc. Nous n'avons donc pas pu identifier la cause du signal non spécifique élevé lors de la présentation de SL37 par les CD à D11, mais il ne s'agit pas d'une fixation à ces récepteurs Fc.

### **Optimisation de la reconnaissance par D11**

Les résultats obtenus par cytométrie en flux permettent d'affirmer que D11 est capable de reconnaître de manière reproductible et spécifique le complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL. Néanmoins, ce signal n'est pas très intense et nous avons donc cherché à l'optimiser afin d'obtenir un décalage de fluorescence plus important dans notre condition d'intérêt.

Une étude de Salio et al. montre que l'activation des CD par des ligands des TLR provoquait une activation des cellules iNKT spécifiques de lipides endogènes plus importante que lorsque les CPA étaient immatures. Les auteurs suggèrent que cette augmentation n'est pas due à une augmentation du nombre de molécules CD1d à la surface



**Figure 23 : Etude de l'effet de l'activation des CPA par du LPS sur la détection de CD1b-SL37 par D11.** Diagrammes montrant la MFI mesurée sur des CD (à gauche) et des cellules THP-1 différenciées (à droite). Les cellules ont été pulsées 20h avec SL37 après une stimulation par du LPS (5µg/mL) de 2h. La reconnaissance du complexe par D11 a été évaluée par FACS. Les marquages ont été effectués en triplicats et les tests statistiques correspondent à des t-tests ( $p < 0.05$ ).

des CPA, mais à une régulation à la hausse des gènes impliqués dans la biosynthèse des glycosphingolipides (Salio et al. 2007). Pour les THP-1, l'étude montre que cela n'est vrai qu'avec le LPS, ligand du TLR4. D'autre part, Angénioux et al démontrent que CD1e n'est trouvé soluble dans le lysosome que si les DC sont traitées par le LPS ou le TNF- $\alpha$  (Angénioux et al. 2000). Nous avons donc voulu voir si la détection en surface du complexe n'était pas améliorée en traitant les cellules avec ce ligand de TLR4.

Ainsi, nous avons activé les CPA à l'aide de LPS (5 $\mu$ g/mL) pendant 2h avant de les pulser avec SL37. Après un pulse de 20h, les marquages avec les AC ont été effectués. Les CD utilisées étaient fraîches, et les THP-1 ont été différenciées en macrophages par ajout de 80 ng/mL de PMA pendant 24 heures avant les expériences, conformément à une étude de Kim et al. qui a montré que les cellules différenciées sont beaucoup plus sensibles au LPS (Kim et al. 2022). Les résultats (**figure 23**) montrent que pour les CD, il n'y a pas d'augmentation notable de la MFI en présence de LPS par rapport aux conditions sans LPS. Toutefois, il est intéressant de noter que le signal de bruit de fond du contrôle, pour lequel les cellules pulsées sont incubées avec uniquement l'AC secondaire, semble réduit avec l'ajout de LPS. Cette observation a été répétée sur 2 expériences. Quant aux THP-1, les résultats sont plus nets que ceux obtenus avec les cellules primaires, mais aucune différence n'a été observée entre les conditions avec ou sans LPS. Cela suggère que, contrairement à la présentation des lipides endogènes par CD1d, le LPS n'a pas d'effet sur la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL par CD1b.

En conclusion, bien que l'AC recombinant présente l'avantage d'une utilisation rapide et facile, il présente également des limites à prendre en compte. Si la reconnaissance du complexe CD1b-SL37 est reproductible et spécifique avec la lignée THP-1 CD1b, les résultats obtenus avec les CD sont plus variables et moins contrastés. Cette variabilité ne semble pas être liée à une fixation non spécifique de l'AC secondaire aux récepteurs Fc à la surface des CD. Malgré cela, cet outil pourra être utilisé de manière fiable sur les cellules THP-1.

Clone	Antigène	Isoforme de CD1	Affinité
LDN5 (Pr. Moody)	GMM	CD1b	Forte
A05	Ac2SGL	CD1b	Forte
G08	GMM	CD1b	Forte
A01	Ac2SGL	CD1b	Pas de données
Bg11	GMM	CD1b	Faible Préférence pour les chaînes courtes (C32) par rapport aux chaînes longues (C80)
M11	AM	CD1b	Spécifiques des AM méthoxy cis Affinité légère pour le GroMM
Y06	GroMM	CD1b	Pas de données
Y07	GroMM	CD1b	Lie également les AM
PB57301	$\alpha$ -GalCer	CD1d	Forte

**Tableau 8 : Tableau des clones de LT restreints par CD1b et CD1d présentant différents antigènes cibles, et leurs affinités respectives.** La quantité de tétramères liés aux LT est mesurée par cytométrie en flux. Plus la fluorescence est intense, plus il y a de tétramères liés, ce qui reflète une plus grande affinité du TCR pour le peptide-CMH. Les clones LDN5 et G08 montrent une forte affinité pour les GMM, tandis que le clone A05 présente une affinité forte pour l'Ac<sub>2</sub>SGL. Ces trois clones ont été utilisés lors de cette thèse.

### 3) **LT spécifiques de différents complexes CD1b-lipide mycobactérien**

Les outils biologiques les plus couramment utilisés pour contrôler la présentation des antigènes lipidiques sont les clones de LT, via des tests ELISA. Leur activation reflète directement la capacité des CPA à présenter des antigènes. Dans le cadre de cette étude, ces LT nous serviront pour apprécier les effets de l'inactivation des protéines candidates, mais ils doivent d'abord être validés au sein de notre laboratoire, dans les conditions où les protéines candidates ne sont pas inactivées. Les équipes du Pr Moody (Université d'Harvard) et du Pr Seshadri (Université de Washington) ont isolé des LT dont le TCR est spécifique de complexes CD1b-Lipide mycobactérien. Nous avons obtenu de ces collaborateurs certains de ces clones présentés dans le **tableau 8**. Lors de ma thèse, le clone LDN5 du laboratoire du Pr. Moody, et les clones A05 et G08 du laboratoire du Pr. Seshadri ont été validés. Nous avons priorisé les clones spécifiques du Ac<sub>2</sub>SGL, ainsi que les clones avec des affinités fortes pour leurs antigènes. De ce fait, seuls ces trois clones ont été étudiés.

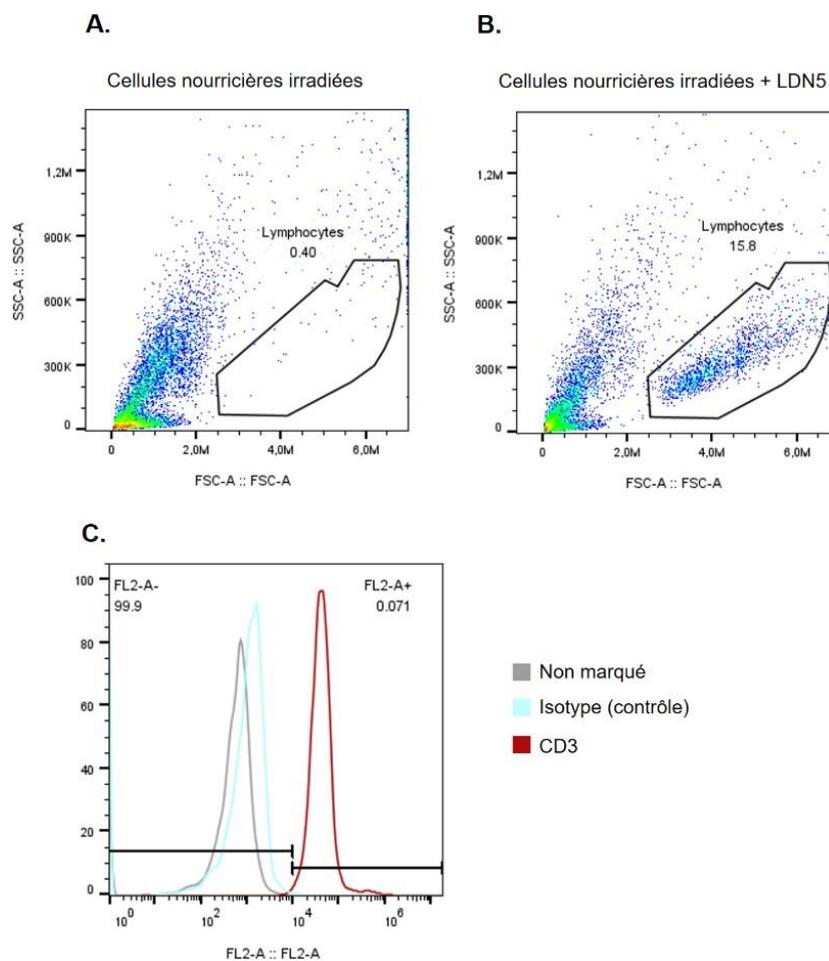
#### a) **Expansion des LT**

Les LT sont des cellules primaires, ce qui signifie qu'ils ne peuvent pas être mis en culture de manière continue comme des lignées immortalisées. Ils nécessitent d'être amplifiés *ex vivo* puis congelés pour une utilisation progressive, car leur durée de vie en culture est limitée. Afin de procéder à l'expansion des cellules, nous avons suivi le protocole du laboratoire du Pr Moody, qui permet de générer jusqu'à 1000 fois plus de LT en deux semaines. Les LT sont activés avec un AC anti-CD3, qui lie le composant du TCR CD3, et déclenche une cascade de signalisation activant des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, NFAT et AP-1, responsables de la prolifération cellulaire.

La partie délicate de ce protocole réside dans le fait qu'il nécessite de cultiver les LT avec des cellules nourricières, fournissant un support physique et des facteurs de croissance essentiels. Ces cellules nourricières sont constituées d'un mélange de PBMC et de cellules de la lignée lymphoblastique JY. Elles doivent être irradiées, afin de provoquer des cassures dans leur ADN, et d'éviter leur prolifération. Si les cellules ne sont pas bien irradiées, cela pourrait mener à leur amplification, étant donné que les PBMC contiennent des LT, qui seront également stimulés par l'ajout de l'AC anti-CD3.

	Début d'expansion (par flasque de 25 cm <sup>2</sup> )	Fin d'expansion (après 2 semaines)
PBMC irradiées	25 millions	Débris/ cellules mortes
JY irradiées	5 millions	Débris/ cellules mortes
LT	100 000	10 à 100 millions (amplification de 100 à 1000) A05 : 15 millions G08 : 50 millions LDN5 : 2 millions

**Tableau 9 : Tableau récapitulatif de l'expansion des LT.** En début d'expansion, 25 millions de PBMC et 5 millions de cellules JY irradiées sont mises en culture dans une flasque T25 avec 100 000 LT. À la fin de l'expansion, les cellules nourricières sont mortes, et on s'attend à obtenir jusqu'à 1000 fois plus de LT. Le nombre de cellules obtenus pour chaque LT est présenté.



**Figure 24 : Analyse par cytométrie en flux de l'expansion du clone LDN5** **A)** Distribution des cellules en fin d'expansion en fonction de leur granularité (SSC) et de leur taille (FSC) pour les cellules nourricières seules ou **B)** Pour les cellules nourricières et les LT LDN5. **C)** Histogramme représentant l'intensité de fluorescence (FL) des LT après marquage avec des AC dirigés contre le marqueur CD3. L'axe des abscisses indique l'intensité de fluorescence, tandis que l'axe des ordonnées représente le nombre de cellules.

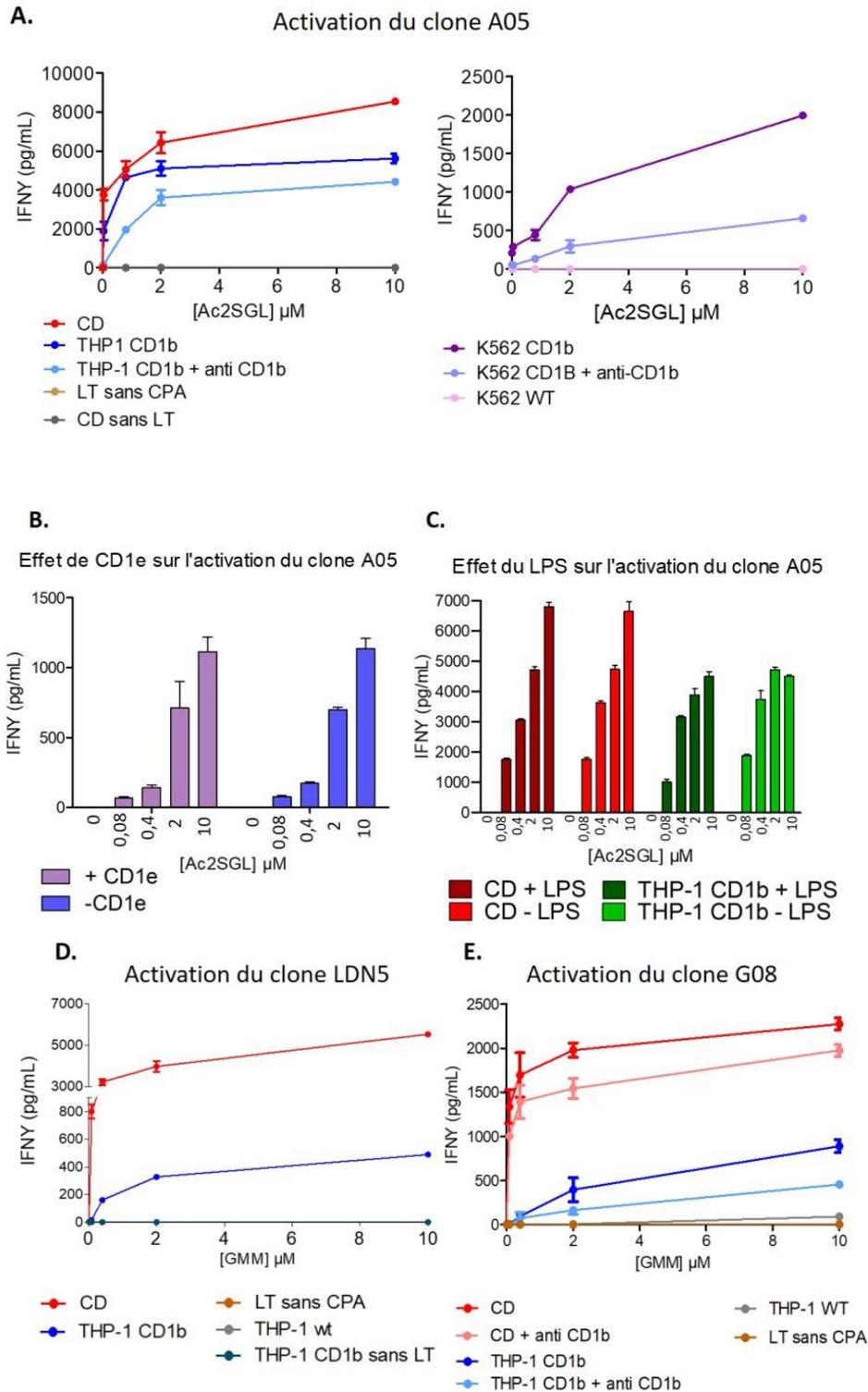
Les proportions de chaque type cellulaire nécessaires à l'expansion sont présentées dans le **tableau 9**, et les résultats obtenus pour les trois clones utilisés y figurent. Dans le but de vérifier l'amplification des LT d'intérêt à l'issue de ces deux semaines, nous avons isolé une fraction des cellules nourricières après leur irradiation pour vérifier leur viabilité en fin d'expansion. L'analyse par cytométrie en flux montre que les puits contenant uniquement les cellules nourricières présentaient de petits objets qui sont vraisemblablement des débris cellulaires (**figure 24.A**), tandis que les co-cultures avec les LDN5 présentent des populations de plus grande taille (**figure 24.B**), correspondant aux LT, ce qui a été confirmé par marquage en cytométrie du marqueur des LT CD3 (**figure 24.C**).

### **b) Validation de l'outil LT par test d'activation**

Le protocole d'activation des LT consiste en une co-culture de CPA pulsées avec le lipide d'intérêt, dilué en cascade (de 0 à 10  $\mu$ M), et les LT spécifiques du lipide dans un ratio de 1:1. Après 24h d'incubation, le surnageant est collecté pour quantifier par ELISA la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , une cytokine produite par les LT activés suite à la reconnaissance de l'antigène.

La lignée A05 exprime un TCR $\alpha\beta$  et le corécepteur CD4. Isolée à l'aide de tétramères de CD1b chargés avec du Ac<sub>2</sub>SGL à partir de PBMC d'un patient atteint de Tb latente (James et al. 2018), cette lignée n'avait encore jamais été utilisée au sein de notre équipe. Ces LT spécifiques du complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL sont particulièrement intéressants, car ils permettent de détecter le même lipide que l'AC D11, et ainsi de compléter les résultats obtenus avec celui-ci.

Les CPA (CD, THP-1 et K562) sont pulsées avec une fraction contenant les Ac<sub>2</sub>SGL purifiés à partir d'un extrait lipidique mycobactérien. Les graphes présentés dans la **figure 25.A** montrent que la reconnaissance du complexe CD1b-Ac<sub>2</sub>SGL à la surface des CPA induit une sécrétion d'IFN- $\gamma$  dépendante de la concentration de lipide utilisée pour le pulse. Les CD sont plus efficaces que les THP-1 pour activer le clone A05 et induire une sécrétion de cytokines, tandis que les cellules K562 sont les CPA les moins efficaces. L'efficacité supérieure des CD a déjà été observée dans l'équipe précédemment (données non publiées) et est attendue, du fait de leur nature de CPA professionnelles. L'activation de A05 est dépendante de CD1b, car les cellules THP-1 et K562 WT n'activent pas le clone. De plus, l'ajout d'un AC anti-CD1b réduit la quantité d'IFN- $\gamma$ , ce qui confirme la nécessité de cette protéine pour l'activation. Cependant, une seule concentration d'AC a été utilisée (10



**Figure 25 : Résultats de tests ELISA mesurant la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (en pg/mL) par les LT en fonction de la dose de lipide antigène (en  $\mu$ M). **A)** Etude de l'activation du clone A05 en fonction des différentes CPA en présence ou non de l'AC anti-CD1b (10 $\mu$ g/mL). **B)** Etude de l'effet de la présence de CD1e sur l'activation du clone A05. Les CPA utilisées sont les THP-1 CD1b+ ou les THP-1 CD1b+ - CD1e+. **C)** Etude de l'effet du LPS (5 $\mu$ g/mL) sur l'activation du clone A05. Les CPA utilisées sont les THP-1 CD1b+ ou les CD. **D)** Etude de l'activation du clone LDN5 en fonction des différentes CPA. **E)** Etude de l'activation du clone G08 en fonction des différentes CPA.**

$\mu\text{g/mL}$ ) et il semble qu'elle ne suffise pas à totalement inhiber la présentation du complexe.

Nous avons ensuite cherché à savoir si la présence de CD1e augmentait la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL. CD1e prend en charge le PIM6 afin de le présenter pour dégradation à l' $\alpha$ -mannosidase, et ce rôle précis ne correspondrait pas avec la structure de l'Ac<sub>2</sub>SGL. Cependant, dans le cadre de la présentation des SGL, le rôle de CD1e pourrait être celui d'un transporteur vers les sillons hydrophobes de CD1b. Nous avons donc comparé l'activation induite par les THP-1 exprimant CD1b avec celle des THP-1 co-exprimant CD1b et CD1e. Les résultats de l'ELISA de la **figure 25.B**, montrent que la présence de CD1e n'a pas d'impact sur l'activation de A05, suggérant que la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL via CD1b n'est pas dépendante de la présence de cette isoforme.

Par ailleurs, comme pour les expériences avec l'AC D11, nous avons évalué si la stimulation des CPA avec du LPS augmentait l'activation des LT, car ce phénomène est observé dans la présentation des lipides endogènes par CD1d (Salio et al. 2007). Nous avons donc incubé les CPA avec du LPS ( $5\mu\text{g/mL}$ ) pendant 2h avant de mettre en place la co-culture. Les résultats présentés dans la **figure 25.C**, suggèrent que le LPS n'a pas d'effet sur la présentation du Ac<sub>2</sub>SGL par CD1b. Ces expériences de stimulation au LPS ont uniquement porté sur la présentation des sulfolipides pendant ma thèse, et il est donc possible que cette stimulation affecte d'autres lipides mycobactériens.

La stimulation du clone LDN5, qui possède un TCR $\alpha\beta$  DN, avec du GMM entraîne une sécrétion d'IFN- $\gamma$  dépendante de la dose d'antigène (**figure 25.D**). Les quantités mesurées sont similaires à celles décrites dans la littérature (Moody et al. 2002; Van Rhijn et al. 2014). Cette activation a été testée avec des CD et des THP-1, montrant une réponse plus importante avec les CD. L'activation est dépendante de CD1b, car les THP-1 WT n'activent pas ce clone.

Les tests d'activation du clone G08, spécifique du GMM, sont présentés dans la **figure 25.E**. Ils montrent une activation spécifique du complexe CD1b-GMM, avec une activation plus marquée lorsque les CPA sont des CD. L'utilisation de l'AC anti-CD1b a le même effet qu'avec les cellules A05, à savoir qu'elle induit une diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT, mais ne l'annule pas totalement.

Ces clones se révèlent sensibles et spécifiques, et pourront être utilisés pour étudier les effets de l'inactivation des protéines candidates.

#### 4) Conclusions et perspectives

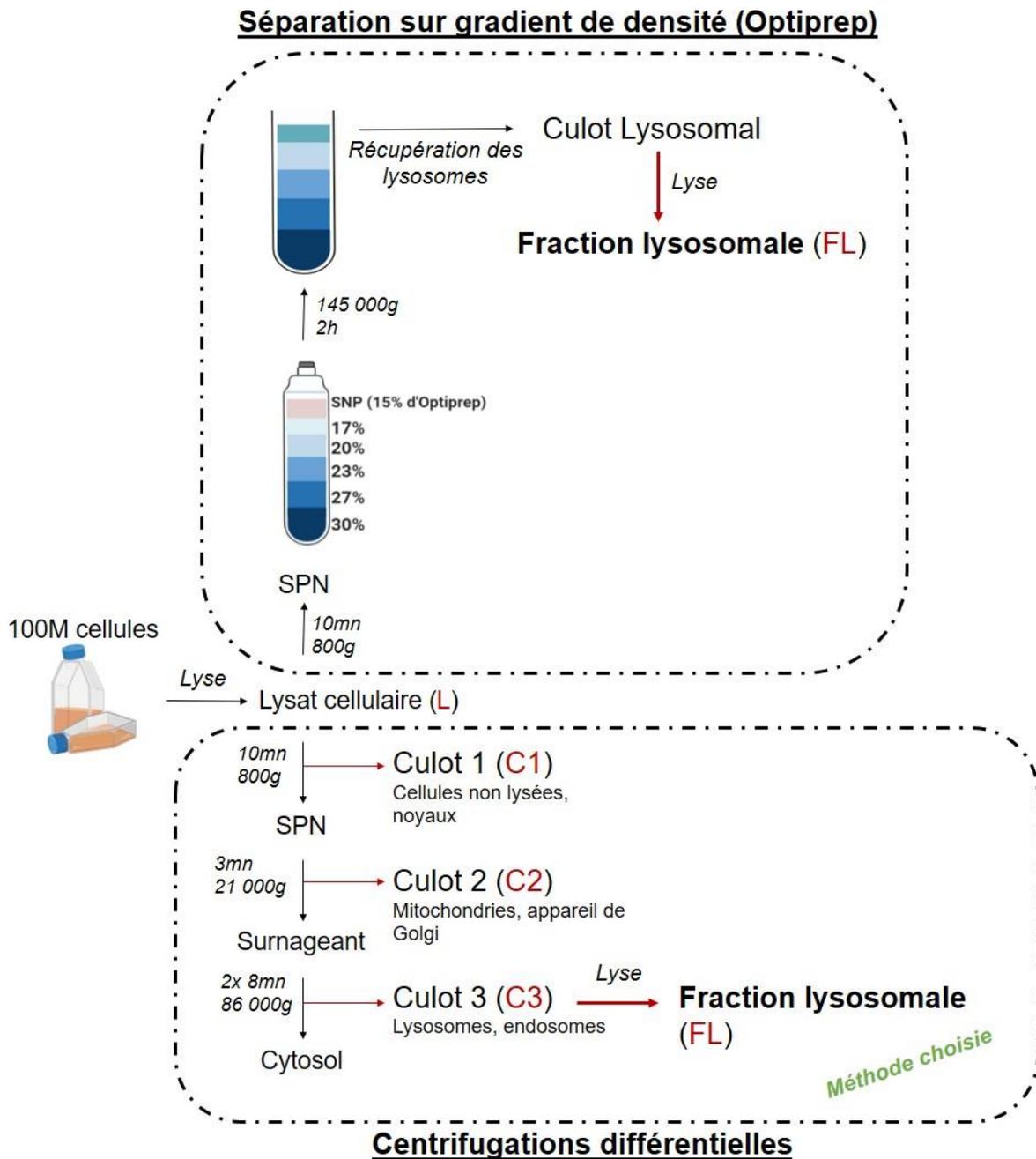
Cette étude nécessite des outils biologiques fiables pour mesurer les effets de l'inactivation des protéines candidates. Des équipes collaboratrices ont développé des AC recombinants spécifiques de l'Ac<sub>2</sub>SGL et isolé des LT spécifiques de divers lipides, comme Ac<sub>2</sub>SGL et GMM que nous avons pu valider au cours de cette thèse, et d'autres qui n'ont pas encore été exploités.

Bien que l'utilisation des AC soit plus pratique, les résultats obtenus par cytométrie en flux avec les CD sont peu clairs, avec un bruit de fond élevé, dont l'origine reste inconnue. Nous avons tout de même pu élaborer un protocole reproductible pour étudier la présentation d'Ac<sub>2</sub>SGL et d'un SL de synthèse (SL37) à la surface des THP-1 à l'aide de l'AC D11. Cependant, ces expériences ne renseignent que sur la présentation du lipide, sans donner d'information sur son immunogénicité.

Les LT constituent donc un outil plus complet, bien que leur amplification représente un défi supplémentaire. Sans l'utilisation de tétramères pour effectuer un tri en fin d'expansion, il est difficile de s'assurer que seuls les LT restreints par CD1b sont amplifiés. Les cellules nourricières que nous avons utilisées sont pourtant celles utilisées dans les études nécessitant l'expansion de LT (Siegers et al. 2013; Van De Griend et al. 1984). Cela rend l'étape d'irradiation cruciale, au risque d'induire la prolifération des LT non spécifiques. Afin de faciliter l'étape d'expansion des LT, il serait envisageable d'utiliser d'autres cellules nourricières, comme il a été montré dans l'étude de Cho et al., qui ont utilisé la lignée cellulaire K562 pour amplifier un clone de LT  $\gamma\delta$  (Cho et al. 2016).

Lors de cette thèse, nous avons montré que les LT LDN5 et G08, qui répondent au GMM, et A05, qui répond au Ac<sub>2</sub>SGL sont capables d'être activés par les CPA utilisées au laboratoire. Ces trois clones répondent en effet de manière dépendante de la présence de CD1b, et à la dose de l'antigène dont ils sont spécifiques. Ils seront donc des outils utiles afin d'étudier le rôle des protéines candidates sur la présentation des lipides immunogènes. Si une protéine candidate est une LTP nécessaire au chargement du GMM ou de l'Ac<sub>2</sub>SGL sur CD1b, son inactivation devrait réduire l'activation des clones. En revanche, ces LT et l'AC D11 ne sont pas les outils les plus adaptés pour identifier des protéines impliquées dans la digestion des lipides, car les lipides qu'ils reconnaissent ne sont pas digérés au niveau du lysosome. Toutefois, il serait possible d'utiliser le clone A05 et l'AC D11 pour déterminer si l'Ac<sub>4</sub>SGL est digéré en Ac<sub>2</sub>SGL et est chargé dans les sillons de CD1b, qui, jusqu'à présent, n'a été observé chargé qu'avec des lipides à deux chaînes d'acides gras. De la même manière, les clones G08 et LDN5 pourraient être utilisés pour examiner si le TDM est

dégradé en GMM. Des LT spécifiques de CD1b-LAM ou CD1b-LM auraient été d'un grand intérêt, car ces lipoglycanes, avec leurs parties polaires importantes, sont plus susceptibles d'être apprêtés. Pour le moment, de tels LT n'ont pas encore été isolés par nos collaborateurs.



**Figure 26 : Protocole d'obtention de fractions enrichies en lysosomes avec deux méthodes : la séparation sur gradient de densité et les centrifugations différentielles.** Ces deux méthodes nécessitent un lysat provenant de 100 millions de cellules qui est soit placé sur un gradient d'Optiprep qui permet de séparer les organites selon leur densité et de récupérer les lysosomes après ultracentrifugation du gradient, soit soumis à différentes centrifugations différentielles. Les résultats obtenus en termes de pureté des fractions étant équivalents avec ces deux méthodes, nous avons sélectionné celle des centrifugations différentielles.

## Chapitre 2 : Obtention d'une liste de protéines candidates

Afin d'identifier des protéines lysosomales susceptibles de jouer un rôle dans la présentation des antigènes lipidiques par CD1b, deux stratégies ont été explorées. La première, de nature plus globale, consiste à obtenir des fractions lysosomales (FL), puis à analyser ces fractions par protéomique pour y chercher des protéines potentiellement intéressantes. La seconde, plus ciblée, vise à identifier l'interactome de CD1b à l'intérieur des lysosomes. Ces deux approches nécessitent le développement d'une méthode fiable et reproductible pour obtenir ces FL.

### 1) Obtention et caractérisation d'une fraction enrichie en lysosomes (FL)

La première approche consiste à obtenir des FL de CPA, afin de les analyser par protéomique. Lors de l'enrichissement, l'activité des enzymes lysosomales doit être conservée, dans le but de tester la dégradation *in vitro* de lipides mycobactériens et de tenter d'identifier des activités hydrolases. Deux méthodes d'obtention de ces fractions enrichies en lysosomes ont été testées et comparées lors de cette étude.

#### a) Choix de la méthode d'enrichissement lysosomal

Classiquement, l'enrichissement en lysosomes se fait par centrifugations différentielles (Schröter et al. 1999) ou séparation sur gradient de densité (Graham et al. 2000). Bien que ces méthodes permettent d'obtenir des fractions enrichies, elles ne garantissent pas une pureté en lysosomes. En effet, ces organites, caractérisés par des propriétés physiques variables telles que la densité et la masse, présentent une grande hétérogénéité, en fonction du type cellulaire, de l'état de stress ou du stade du cycle cellulaire, ce qui rend leur isolation en fonction de ces critères biophysiques difficiles (Sardiello et al. 2009). Cependant, nous avons supposé qu'un enrichissement, plutôt qu'un isolement, était suffisant afin d'avoir une vision globale des protéines lysosomales.

Nous avons comparé les deux méthodes classiques d'enrichissement lysosomal. Les deux protocoles incluent les étapes suivantes : lyse cellulaire, enrichissement en lysosomes, et lyse des lysosomes pour libérer leur contenu enzymatique. La procédure est illustrée en **figure 26**.



L'étape de lyse cellulaire s'effectue à partir de  $1 \times 10^8$  cellules (THP1, K562 ou CD). Ce nombre important de cellules permet d'obtenir à l'issue du protocole un culot lysosomal visible à l'œil nu, ce qui garantit une concentration en protéine suffisante pour les analyses par protéomique (entre 0,5 et 1  $\mu\text{g/mL}$ ). La lyse est réalisée par homogénéisation mécanique douce, préservant l'intégrité des organelles. Le lysat obtenu est traité selon la méthode d'enrichissement choisie.

#### Centrifugations différentielles

Dans cette méthode, le lysat est soumis à différentes centrifugations et ultracentrifugations (**figure 26**). Ce protocole a été adapté de l'étude de Vergne et al., (Vergne et al. 2004). Le culot final, appelé C3, contient la majorité des lysosomes cellulaires.

#### Séparation sur gradient

Pour cette méthode, nous avons utilisé un gradient d'Optiprep. Il s'agit d'une solution d'iodixanol, un composé dense qui préserve l'intégrité des cellules grâce à ses propriétés iso-osmotiques, à la différence d'autres substances comme le sucrose. Le lysat cellulaire est déposé au sommet de ce gradient, et les organelles sont séparées selon leurs densités par ultracentrifugation. La couche contenant les lysosomes est récupérée et concentrée en un culot lysosomal.

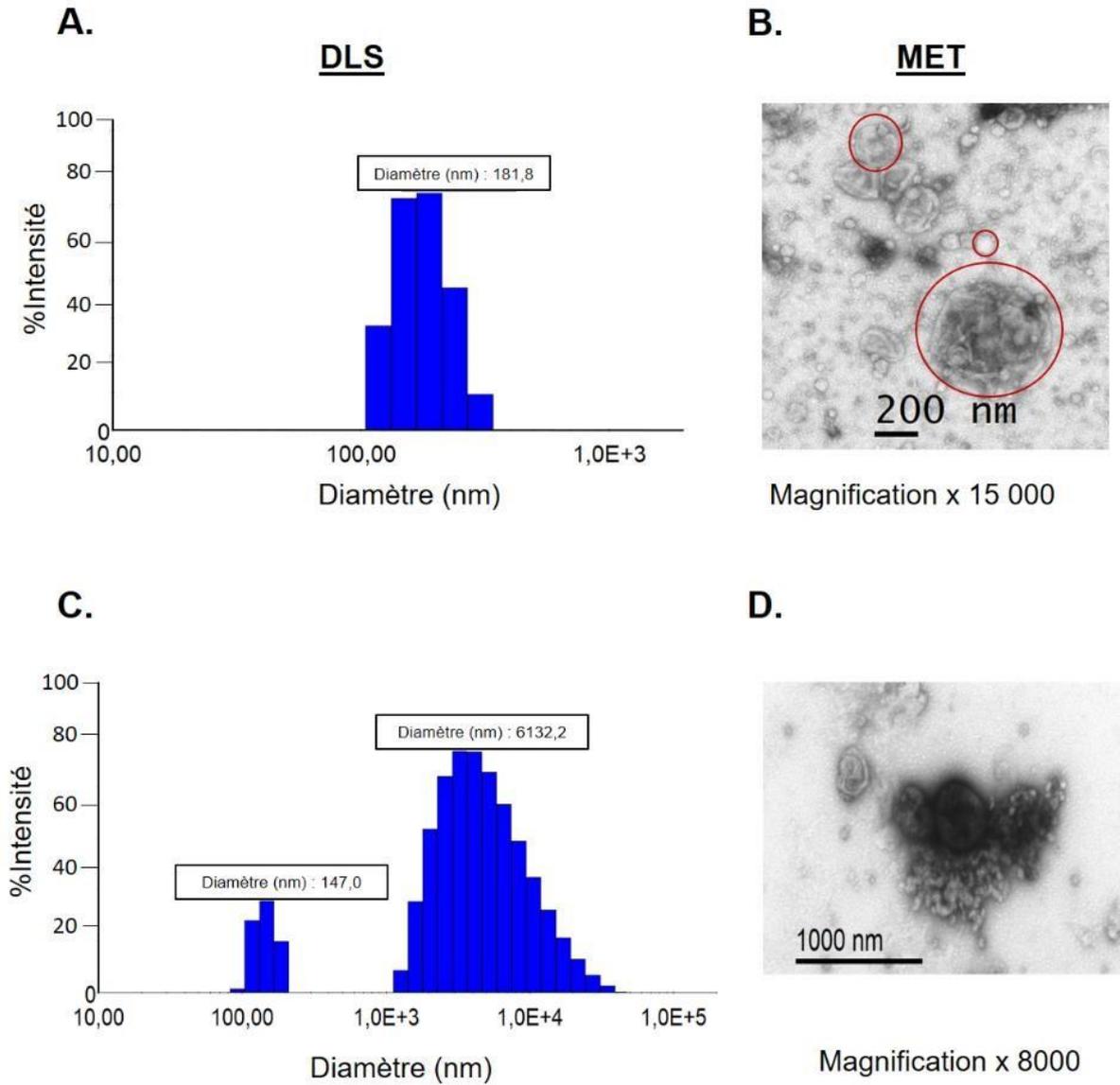
#### Lyse des lysosomes

Les culots lysosomaux obtenus par les deux méthodes sont lysés de la même manière afin d'en extraire les enzymes lumenales. Ils sont resuspendus dans du tampon à pH acide, composé d'acétate de sodium, afin de conserver l'activité des enzymes lysosomales. Ils sont ensuite lysés par plusieurs cycles successifs de congélation/décongélation rapides. Le produit de cette lyse est nommé FL.

#### Comparaison des deux méthodes

Nous avons observé lors de cette étude que les deux méthodes permettent d'obtenir des fractions de pureté comparable. Ainsi la méthode de centrifugations

## Cellules THP-1



**Figure 27 : Caractérisation de la taille et morphologie des objets contenus dans le culot lysosomal**

**A)** Mesure de la taille des objets contenus dans le culot lysosomal de THP-1 après méthode de centrifugation différentielle par DLS. Le diamètre moyen observé est de 181,8 nm, ce qui est cohérent avec les observations faites en MET pour la même fraction. Les objets entourés en rouge ont un diamètre de 500 nm, 200 nm et 80 nm (**B**). Quelques enregistrements de DLS montraient des pics suggérant la présence d'objets de 6000 nm de diamètre (**C**), ce qui n'a pas été retrouvé dans les images de microscopie, mais pourrait correspondre à des agrégats, comme observé en **D**.

différentielles a été préférée en raison de sa rapidité, de son coût réduit, et de la possibilité d'obtenir un culot lysosomal visible avec un nombre de cellules inférieur.

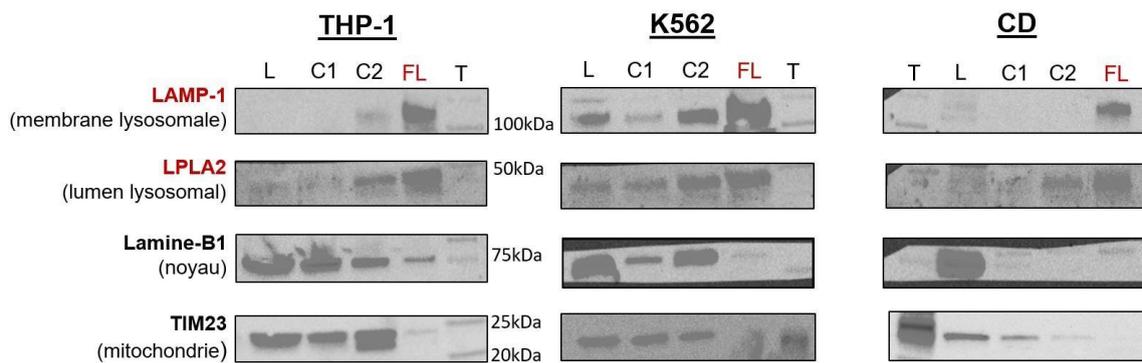
## **b) Caractérisation biophysique des FL obtenues**

Les lysosomes obtenus ont été caractérisés avant l'étape de lyse par des expériences de DLS (« dynamic light scattering »). Un exemple de ces données est présenté en **figure 27.A** pour les cellules THP-1. Ces résultats révèlent une population d'objets de taille peu polydispersé, avec un diamètre moyen de 181,8 nm. Cette taille est cohérente avec les données de la littérature, qui indiquent que le diamètre des lysosomes mesure entre 50 et 500 nm (Mellman 1989).

En complément, nous avons analysé les FL des THP-1 par microscopie électronique à transmission (MET), afin de visualiser directement ces fractions et d'évaluer leur qualité. Les objets observés apparaissent sous forme de vésicules circulaires avec des diamètres compris entre 50 et 500 nm (**figure 27.B**). Cependant, ces images ne correspondent que partiellement aux données de DLS, car de nombreux objets plus petits sont visibles en microscopie, mais absents des diagrammes de DLS. Il est possible que ces petits objets, d'une vingtaine de nm de diamètre, s'agrègent et ne soient détectés en DLS que sous forme de grappes.

De plus, lors de certains enregistrements de DLS, un second massif de pics est observé et suggère la présence d'objets de plus grande taille, avec un diamètre moyen proche de 6000 nm (**figure 27.C**). En microscopie, des objets aussi grands n'ont pas été observés. Il est probable qu'il s'agisse également d'agrégats, comme illustré dans la **figure 27.D**.

Dans l'ensemble, ces expériences de caractérisation morphologique montrent que les culots lysosomaux sont composés d'objets ronds, vraisemblablement des vésicules, de taille cohérente avec celle des lysosomes décrite dans la littérature. Cependant, ces seules analyses ne suffisent pas à confirmer la nature lysosomale de ces vésicules. Nous avons donc également caractérisé ces fractions par western blot, en recherchant des marqueurs spécifiques des différents compartiments cellulaires.



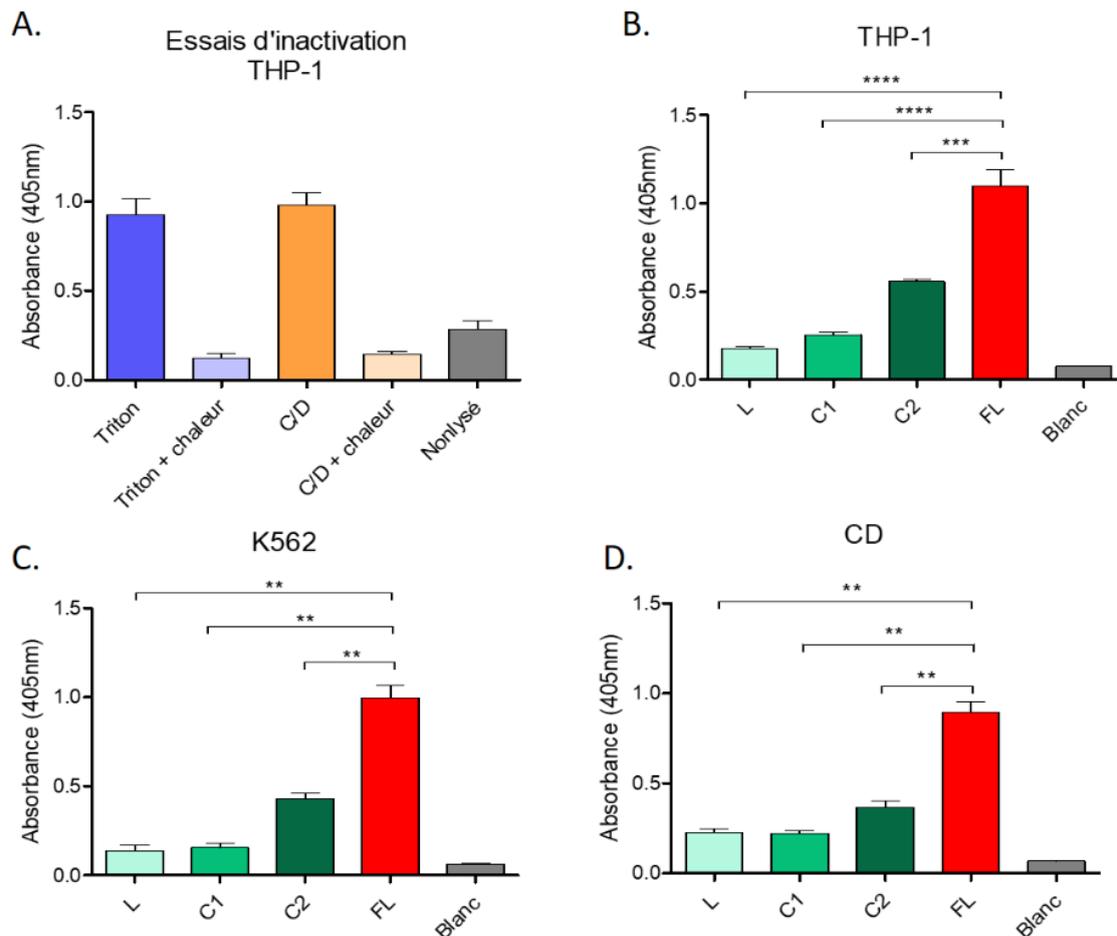
**Figure 28 : Western blot à l'aide d'AC marqueurs de différents organites.** L'enrichissement en lysosomes des THP-1, K562 et CD a été évalué à l'aide d'AC dirigés contre LAMP1 et LPLA2 pour marquer la membrane et le lumen des lysosomes, TIM23 pour marquer la mitochondrie et Lamine-B1 pour marquer le noyau.

### c) Caractérisation biochimique des FL obtenues

L'enrichissement en lysosome a été suivi en analysant des échantillons provenant de chaque étape de centrifugation (L, C1, C2 et FL) par western blot en utilisant des marqueurs spécifiques des différents organites. Des AC dirigés contre le marqueur des membranes lysosomal LAMP-1 (100kDa) et contre la phospholipase lysosomale LPLA2 (50kDa) sont utilisés pour vérifier l'enrichissement en lysosome, et les marqueurs TIM-23 (23kDa) et Lamine-B1 (75kDa) permettent de suivre respectivement les mitochondries et les noyaux.

Les résultats de ces western blots, présentés dans la **figure 28** montrent que la FL de chaque CPA est enrichie en marqueurs lysosomaux LAMP-1 et LPLA2, et déplétée en marqueurs TIM23 et Lamine B1, par rapport au lysat total et aux culots C1 et C2. Cependant, ces marqueurs du noyau et de la mitochondrie sont quelquefois visibles dans les FL. Il est en effet difficile d'obtenir une FL dénuée de contaminations par les autres organelles. De par leurs propriétés biochimiques, la membrane plasmique, par exemple, peut se retrouver dans les mêmes fractions que les lysosomes (Yates et al. 2005). De surcroît, lors de la lyse mécanique, il est possible que certains noyaux soient lysés également, ce qui entraîne une dispersion des protéines nucléaires dans tous les culots récupérés au long du protocole.

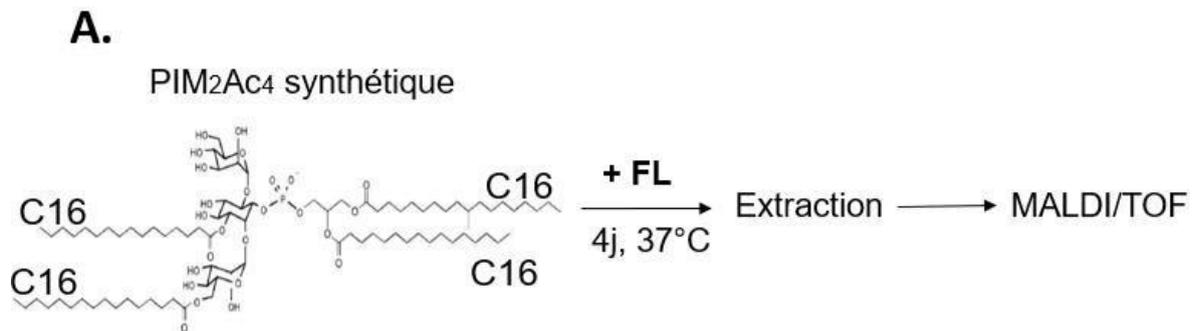
Nous avons également vérifié que l'enrichissement des FL permette de conserver des enzymes lysosomales fonctionnelles, par mesure de l'activité de la  $\beta$ -hexosaminidase dans les différentes fractions obtenues lors des centrifugations. L'activité de cette enzyme a été testée en mesurant l'hydrolyse du 4-nitrophényl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide, produisant le 4-nitrophénol, dont l'absorbance à 405 nm est mesurée (Wendeler et Sandhoff 2009). Afin de mesurer cette activité, les culots lysosomaux sont suspendus dans un tampon citrate-phosphate à pH 4,7, proche du pH lysosomal. Pour lyser les lysosomes, et ainsi libérer les enzymes contenues, nous pouvions utiliser une méthode de lyse par congélation/décongélation, ou bien l'utilisation d'un détergent. Nous avons comparé l'activité  $\beta$ -hexosaminidase lorsque les lysosomes sont lysés par congélation-décongélation ou avec le détergent Triton X-100 (0,5%). Les résultats sur les FL des cellules THP-1, présentés dans la **figure 29.A**, montrent que les deux méthodes de lyse permettent de libérer l'activité enzymatique de manière significative par rapport à la condition non lysée. En effet, lorsque les fractions ne sont pas lysées, l'activité enzymatique est similaire à celle des FL inactives chauffées à 90°C pendant 10 minutes après lyse. Ainsi, la méthode de congélation-décongélation s'est avérée efficace pour libérer le contenu des vésicules tout en préservant



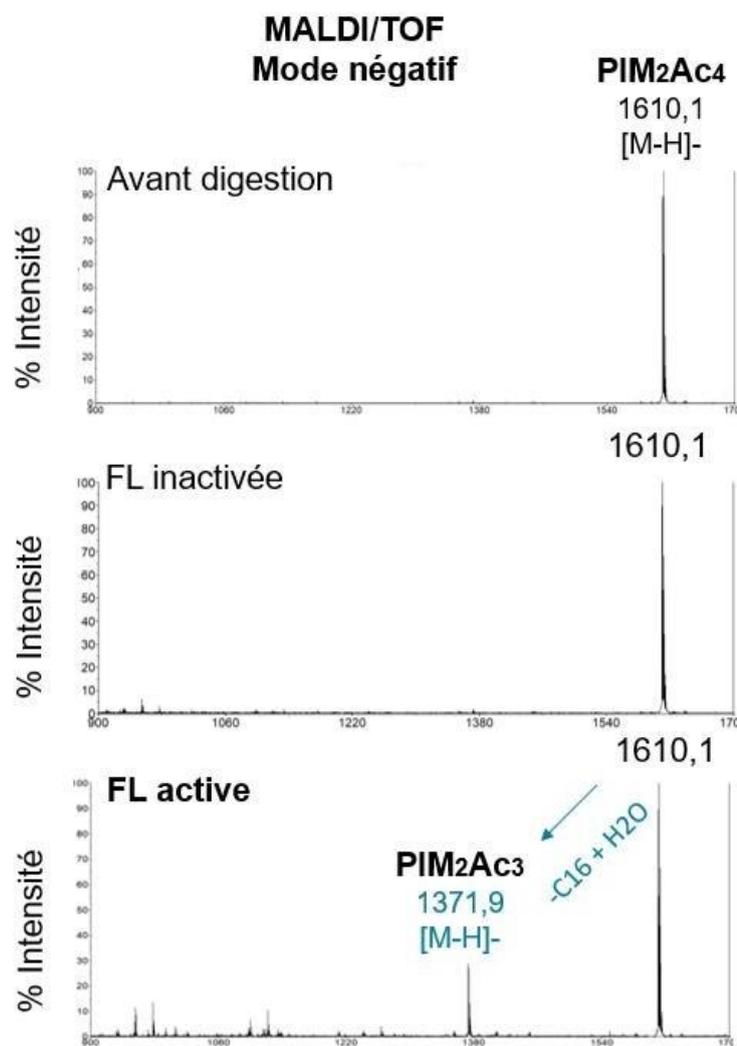
**Figure 29 : Comparaison de l'activité  $\beta$ -hexosaminidase.** Les méthodes de lyse permettant la libération des enzymes lysosomales ont d'abord été comparées (A), puis les activités des différentes fractions obtenues lors des centrifugations différentielles ont été mesurées (B à D). Les moyennes des groupes ont été comparées en utilisant un t-test non apparié. Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance à 95 %. Les différences significatives entre les groupes sont indiquées par des astérisques (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

l'activité des enzymes lysosomales, sans nécessiter l'ajout de détergent. C'est donc la technique de lyse que nous avons choisie pour les expériences ultérieures.

Les résultats présentés dans les **figures 29.B à 29.D** montrent que, pour une concentration protéique de  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , les FL présentent une activité de  $\beta$ -hexosaminidase supérieure à celle du lysat et des culots intermédiaires C1 et C2. Pour les trois types cellulaires étudiés, cette activité semble équivalente, puisque l'absorbance à 405 nm est directement proportionnelle à la quantité de substrat hydrolysé. L'activité enzymatique est systématiquement plus élevée dans le C2 que dans le lysat et le C1, en accord avec les western blots qui montrent la présence de marqueurs lysosomaux dans cette fraction. Ces données indiquent que le protocole de centrifugation différentielle, y compris l'étape finale de lyse par congélation et décongélation, permet d'obtenir des fractions lysosomales actives.



**B.**



**Figure 30 : Tests de digestion de PIM2Ac4 par la FL de THP-1 *in vitro*** A) Le PIM2Ac4 est incubé 4j avec la FL puis les lipides sont extraits pour être analysés B) Analyse MALDI/TOF en mode négatif des lipides extraits. Dans la condition témoin, où la FL est inactivée par la chaleur, le spectre reste identique à celui observé avant l'incubation. En revanche, lorsque les lipides sont incubés avec la FL active, un nouveau pic correspondant au PIM2Ac3 est observé.

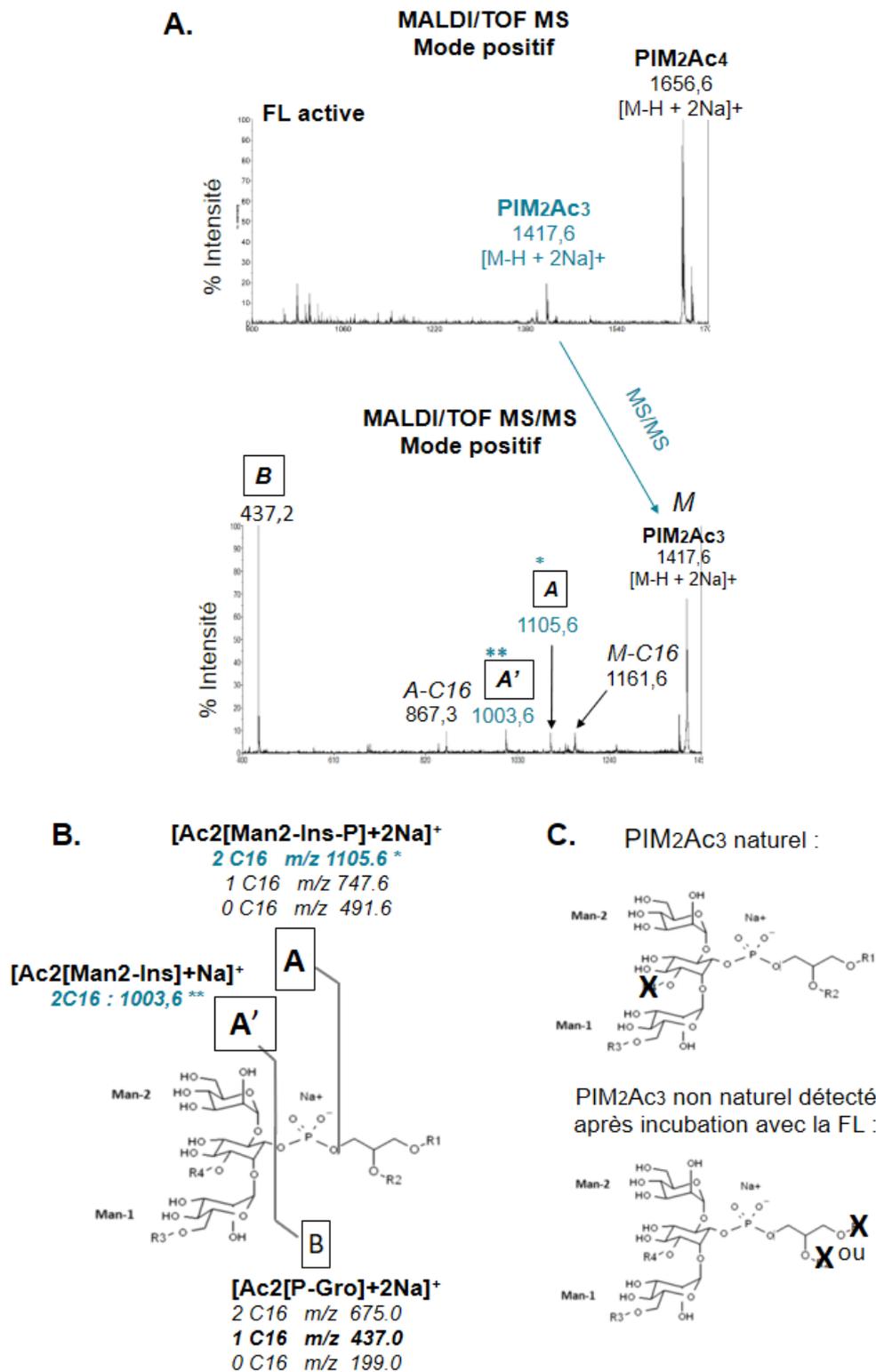
#### d) Tests de dégradation *in vitro* de lipides mycobactériens par la FL

Pour tenter d'identifier des activités hydrolases capables de digérer les lipides de *Mtb* dans les FL, nous avons réalisé des tests de digestion *in vitro* sur un PIM<sub>2</sub>Ac<sub>4</sub> de synthèse (contenant 4 chaînes C16, avec un signal unique à  $m/z = 1610,1$  sur le spectre MALDI). Nous avons choisi d'étudier dans un premier temps la digestion des PIM, car il s'agit d'un lipide mycobactérien dont la dégradation par les enzymes lysosomales a été documentée (Gilleron et al. 2016; De La Salle et al. 2005).

Pour ce faire, 100 $\mu$ L de FL provenant des cellules THP-1, correspondant à environ 50 $\mu$ g de protéines, ont été incubés pendant 4 jours avec 50  $\mu$ g de PIM<sub>2</sub>Ac<sub>4</sub> (**figure 30.A**). Après cette incubation, nous avons observé l'apparition du produit de dégradation PIM<sub>2</sub>Ac<sub>3</sub>, avec un rapport  $m/z = 1371,9$  (PIM<sub>2</sub>Ac<sub>3</sub> avec 3 C16) (**figure 30.B**). Ce PIM<sub>2</sub>Ac<sub>3</sub> a été spécifiquement observé dans la condition d'incubation avec la FL active. Aucun produit de dégradation similaire n'a été détecté dans les contrôles : incubation avec tampon acide seul (non présenté) ou avec FL préalablement inactivée par la chaleur (10 minutes à 90°C) (**figure 30.B**). Ce dernier contrôle prend en compte le bruit de fond potentiel causé par les lipides endogènes des membranes lysosomales, il constitue donc un contrôle plus précis.

Cependant, la génération d'autres formes acylées, notamment PIM<sub>2</sub>Ac<sub>2</sub> et PIM<sub>2</sub>Ac<sub>1</sub>, qui avaient été observées précédemment dans l'équipe, n'a pas eu lieu lors des différents tests, malgré les différentes conditions testées et présentées dans le **tableau 10**.

Pour caractériser plus précisément le PIM<sub>2</sub>Ac<sub>3</sub> généré, nous avons effectué une analyse MALDI-TOF/TOF (MS/MS) en mode positif, car le mode négatif ne fournit des informations que sur la nature des acides gras libres perdus, et non sur leur position. En mode positif, l'ion détecté a une masse de 1417,6, indiquant l'ajout de deux ions Na<sup>+</sup> (**figure 31.A**). Le pic le plus intense, à  $m/z = 437,2$ , correspond à l'ion B (**figure 31.B**), suggérant une perte d'acide gras au niveau du glycérol. Étant donné que le lipide synthétique ne contient que des chaînes de 16 carbones, il est impossible de déterminer si la chaîne clivée est en R1 ou R2 (**figure 31.B**). Le spectre MS/MS montre également des pics intenses à  $m/z = 1003,6$  et  $1105,6$ , indiquant la présence d'un adduit sodium de mannose acylé lié à un inositol acylé. Ces signaux suggèrent que la chaîne carbonée clivée se situe au niveau du glycérol. Ce clivage peut résulter de l'action des lipases LPLA2 et PLRP2 décrites dans la littérature (Gilleron et al. 2016), ou d'autres lipases pas encore caractérisées.



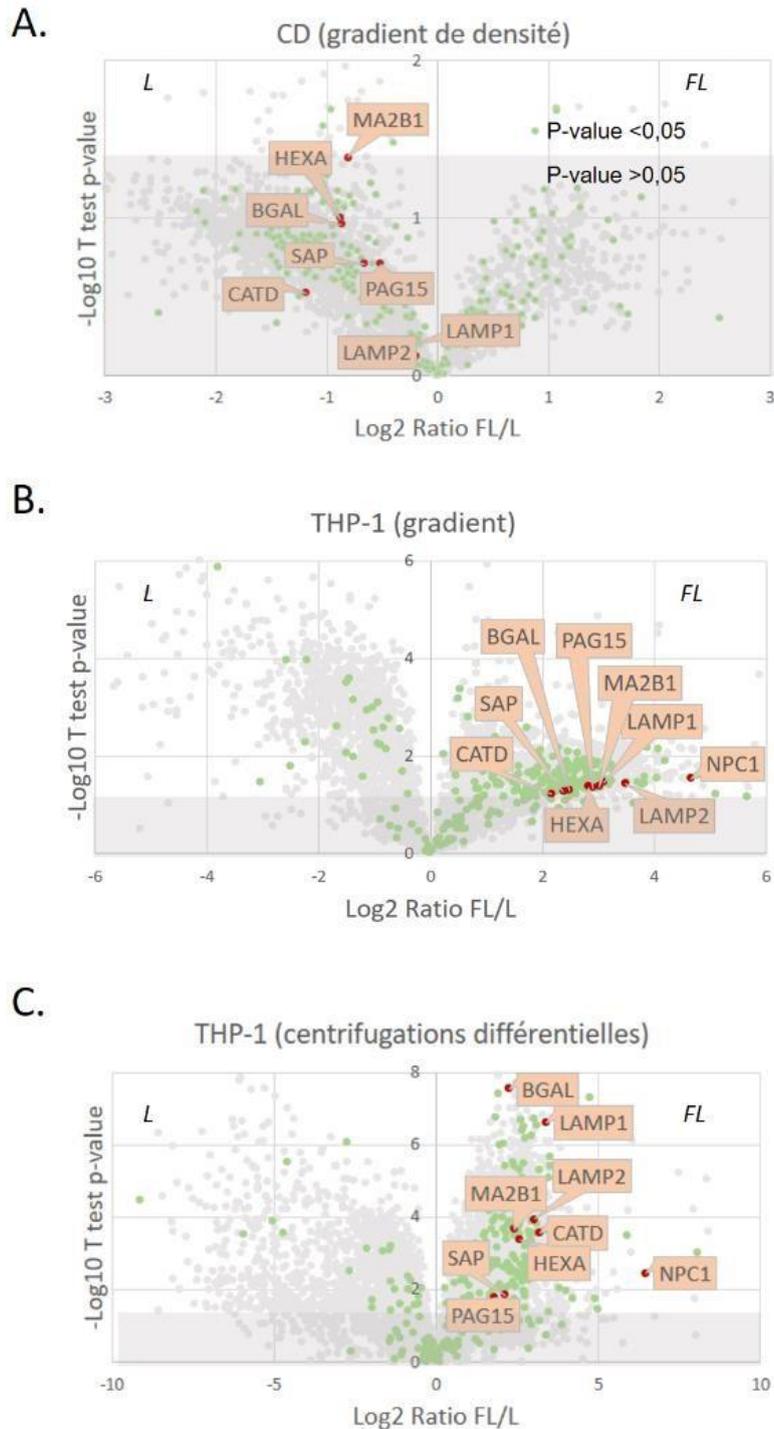
**Figure 31 : Analyse MS/MS des PIM2Ac4 de synthèse après digestion par la FL** A) Analyse MALDI-Tof et MALDI-Tof/Tof en mode positif des PIM2Ac4 incubés avec la FL. L'ion à  $m/z=1417,6$  a été fragmenté. B) Voies de fragmentation des PIM2 Ac2 en MALDI-Tof/Tof  $[M+Na]Na^+$  C) Représentation des formes conventionnelles et non conventionnelles des PIM2Ac3

La forme de PIM2Ac3 observée, avec un acide gras manquant sur la partie Gro/Man/Ins, n'est pas naturelle, ce qui indique une activité lipase présente dans la FL (**figure 31.C**). La génération de PIM2Ac3 a été reproduite suffisamment lors de cette thèse pour conclure que la FL est capable de digérer des lipides *in vitro*. En conséquence, nous avons testé l'activité des hydrolases sur le LAM et le PIM6Ac4, mais aucun produit de dégradation n'a été observé, et les spectres obtenus après incubation avec la FL sont identiques à ceux obtenus avec le tampon seul (résultats non présentés).

Ces tests n'ont pas permis d'identifier de nouvelles activités enzymatiques sur les lipides mycobactériens à partir des FL obtenues. La liste de protéines candidates a donc entièrement été construite à partir des analyses protéomiques et de la littérature.

Ratio Lipide/FL (µg)	Inhibiteur de protéase	Agitation	Volume final (µL)	Tampon	Temps d'incubation	Méthode d'extraction (ratios volumiques)
<b>1:1</b>	<b>Uniquement lors de la lyse cellulaire</b>	<b>Avec</b>	100	Citrate-phosphate, pH 4,7 (100 mM)	2h	Chloroforme/méthanol/eau (60:35:8)
<b>1:2</b>	Lors de la lyse cellulaire + lyse des lysosomes	Sans	<b>200</b>	<b>Acétate de sodium, pH = 4,5 (20 mM)</b>	24h	<b>Butanol/eau (2:1)</b>
			<b>300</b>		2 jours	
					<b>4 jours</b>	
					1 semaine	

**Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différentes conditions testées afin d'évaluer la dégradation du PIM2Ac4 synthétique *in vitro* par la FL.** Les paramètres en vert dans ce tableau sont ceux ayant permis d'observer le pic correspondant au PIM2Ac3.



**Figure 32 : Volcano-plots des analyses protéomiques comparant les protéines du lysat total (gauche) et de la FL (droite).** Les parties grisées des graphes représentent une p-value supérieure à 0,05 et donc un enrichissement non significatif. **A)** Enrichissement des CD par gradient (2938 protéines totales), **B)** enrichissement des THP-1 par gradient (3932 protéines totales), et **C)** enrichissement des THP-1 par centrifugations (4562 protéines totales). Les points en vert correspondent aux protéines annotées "lysosome" sur UniProt (723 protéines). Parmi ces 723 protéines, 271 ont été identifiées chez les CD, 294 chez les THP-1 avec la méthode gradient et 288 avec la méthode des centrifugations différentielles. Certains marqueurs lysosomaux spécifiques validés apparaissent en rouge (LAMP1, LAMP2,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -hexosaminidase, cathepsine D, NPC1, LPLA2 et prosaposine).

## 2) **Obtention d'une liste de protéines candidates par analyse protéomique des FL.**

Les CD sont les CPA professionnelles présentes chez l'homme qui expriment les cinq isoformes des protéines CD1. Elles sont donc particulièrement pertinentes pour étudier la présentation des lipides par CD1b, car elles possèdent la machinerie cellulaire la plus complète pour permettre cette fonction. Pour identifier les protéines impliquées dans une voie spécifique, une méthode couramment utilisée consiste à réaliser un screening, en inactivant l'expression de nombreuses protéines et en analysant quelles inactivations perturbent cette voie. C'est cette méthode qui a été utilisée par Chandra et al. dans une étude visant à identifier les protéines cellulaires impliquées dans la présentation de l' $\alpha$ -GalCer aux cellules iNKT (Chandra et al. 2018). Bien que la méthode de screening soit généralement considérée comme la plus appropriée pour identifier les protéines d'intérêt dans ce contexte, nous ne l'avons pas utilisée du fait des contraintes techniques de notre laboratoire. Nous avons donc adopté une approche alternative consistant en l'analyse protéomique de FL de CPA pour trouver des protéines d'intérêt.

### a) **Analyse protéomique des FL**

Bien que l'enrichissement lysosomal ait d'abord été mis au point sur les cellules de lignées THP-1 et K562, le but était d'analyser le contenu lysosomal des CD par protéomique, afin d'avoir une liste de protéines plus représentative des conditions physiologiques. Nous avons donc enrichi une fraction de CD en lysosomes, et comparé le contenu protéique de ces FL au lysat des mêmes cellules. Ces analyses ont été réalisées tôt dans la thèse, et la méthode préférée au moment de ces analyses était celle de séparation sur gradient de densité.

Les résultats obtenus avec les CD ne montrent pas d'enrichissement en protéines lysosomales dans la FL, comme l'illustre la partie droite de la **figure 32.A**. Les protéines identifiées par le mot-clé "lysosome" dans la base de données Uniprot, représentées en vert sur la figure, se trouvent majoritairement dans le lysat total (partie gauche de la **figure 32.A**). La trop faible quantité de CD utilisée pourrait être la cause principale de ce manque d'enrichissement. En effet, la méthode de séparation par gradient de densité requiert une quantité substantielle de cellules, d'au moins 100 millions, ce qui n'a pas été atteint avec les cellules primaires.

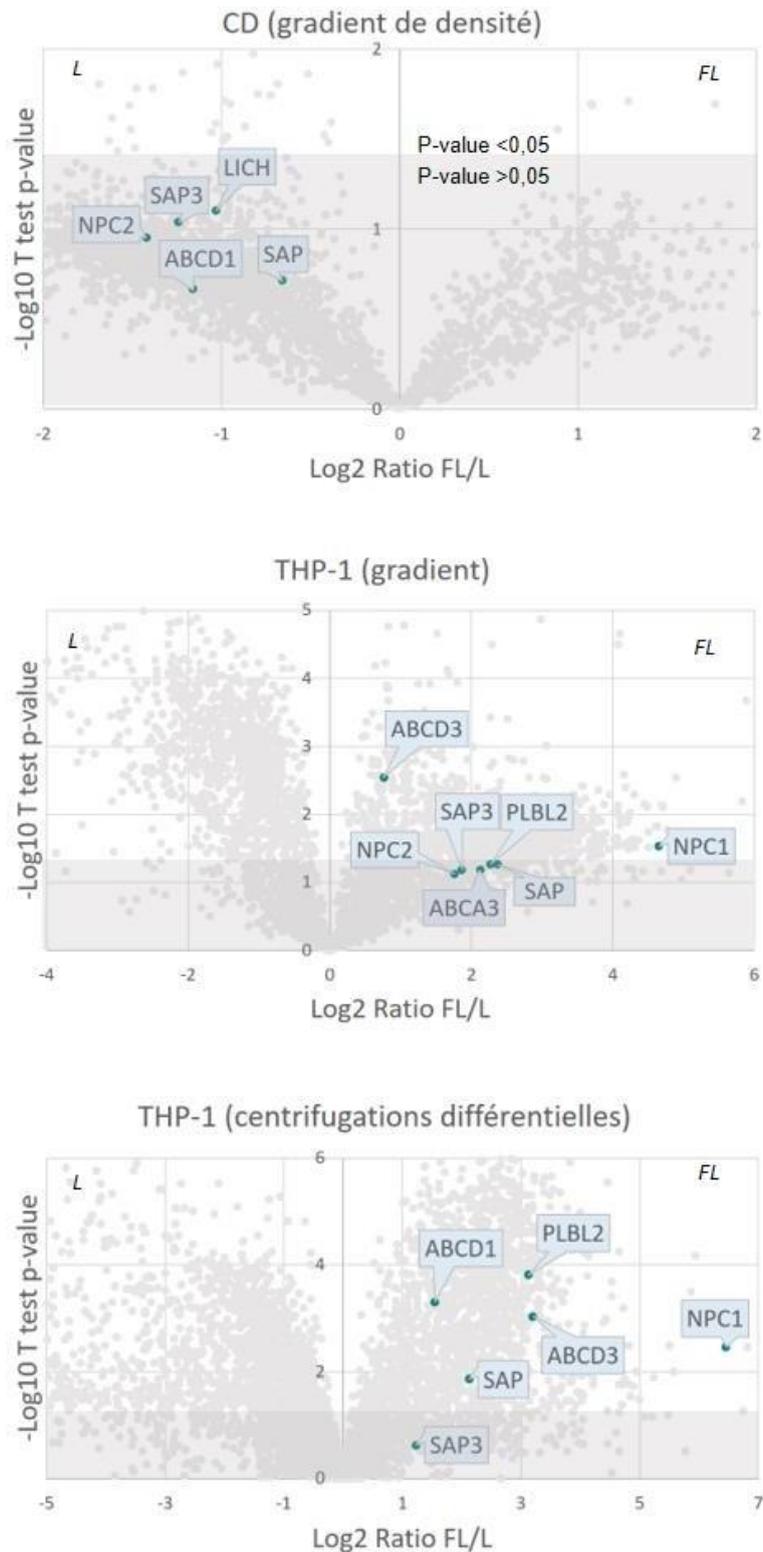


Cependant, le kit utilisé pour séparer les lysosomes par gradient recommandait d'obtenir un culot cellulaire d'une masse comprise entre 50 et 200 mg. Lors des expériences indépendantes réalisées pour obtenir des FL de CD menant à ces résultats, le culot dépassait légèrement la masse minimale requise. Il semblerait que ce ne soit pas suffisant, et le culot lysosomal était beaucoup plus petit que ceux obtenus en partant de 100 millions de cellules de lignée (THP-1 et K562), contre 50 millions avec les CD.

Des FL de cellules THP-1 ont été obtenues par les deux méthodes d'enrichissement et ont été soumises à une analyse protéomique. Les résultats, présentés dans les **figures 32.B** et **32.C**, montrent que les deux méthodes permettent d'obtenir une fraction enrichie en protéines associées au lysosome (en vert sur les graphiques), incluant des marqueurs lysosomaux tels que LAMP1, LAMP2, la  $\beta$ -galactosidase (BGAL), l' $\alpha$ -mannosidase (MA2B1), la  $\beta$ -hexosaminidase (HEXA), la cathepsine D (CATD), NPC1, LPLA2 et la prosaposine (SAP), étiquetées en orange sur la **figure 32**. Toutefois, les centrifugations différentielles ont produit des résultats statistiquement plus significatifs (p-values plus faibles), ce qui a confirmé notre décision de privilégier cette méthode pour les expériences futures.

#### **b) Elaboration d'une liste de protéines candidates à partir des données protéomiques**

Dans les trois volcano-plots obtenus lors de l'étude, les protéines catégorisées comme lysosomales sur la banque de données UniProt ont été étudiées une à une. Grâce à cette stratégie, nous avons mis en évidence certaines protéines de la famille des « ATP-binding cassettes » (ABC) présentes dans les différents volcano-plots. Cette grande famille de transporteurs compte 48 membres chez l'homme, répartis en 7 sous-familles (ABCA à ABCG), présents dans différentes membranes cellulaires, y compris celles des lysosomes, peroxyosomes, et mitochondries. Il est intéressant de noter que la protéine de la sous-famille ABC, Mrp1 (codée par le gène ABCC1), a été identifiée lors du criblage réalisé par Chandra et al., car son inhibition a un impact négatif sur l'activation des cellules iNKT (Chandra et al. 2018). Cette famille de protéines mérite donc d'être étudiée dans le cadre de la présentation des lipides par les protéines CD1.



**Figure 33 : Volcano-plots des analyses protéomiques montrant les protéines candidates identifiées. A) Enrichissement des CD par gradient, B) enrichissement des THP-1 par gradient, et C) enrichissement des THP-1 par centrifugations. Les protéines candidates sont présentées en bleu.**

La revue de Szakacs de 2020 indique que ABCA2, ABCA3, ABCA5 sont localisées au niveau des membranes lysosomales et sont des transporteurs de lipides putatifs (Szakacs et al. 2020). ABCA3 est présente dans le graphe correspondant aux THP-1 avec la méthode de séparation sur gradient (**figure 33**). Cette protéine est majoritairement exprimée dans les cellules alvéolaires de type II et joue un rôle crucial dans le transport des phospholipides du surfactant pulmonaire. Des études ont montré son implication dans l'absorption de PC dans les lysosomes des cellules A549 dérivées de carcinomes pulmonaires (Matsumura et al. 2008).

Concernant la sous famille ABCD, seule ABCD1 est également localisée au niveau de la membrane des lysosomes (Morita et al. 2006). La protéine ABCD1 est identifiée dans les graphes correspondants aux CD et aux THP-1 avec la méthode des centrifugations différentielles (**figure 33**). ABCD1 est impliquée dans le transport des lipides à chaînes longues (26 carbones) vers le lumen des peroxysomes et possède également une activité thioestérase, facilitant la  $\beta$ -oxydation des esters d'acyl-CoA à très longue chaîne (Van Roermund et al. 2008).

De plus, la protéine ABCD3 est identifiée dans les volcano-plots correspondant à l'enrichissement des cellules THP-1 avec les deux méthodes (**figure 33**). Cette protéine est localisée au niveau des peroxysomes et transporte les acyl-CoA à chaînes ramifiées et les intermédiaires des acides biliaires di- et tri-hydroxycholestanoïl-CoA dans cet organite (Van Roermund et al. 2014). Bien qu'elle n'ait pas été décrite comme lysosomale à ce jour, sa fonction connue en fait une protéine assez intéressante.

Ces analyses nous ont également permis d'identifier deux lipases potentielles. La protéine LIPA (lipase acide lysosomale, LICH sur Uniprot) est une autre lipase candidate qui a été détectée dans notre analyse protéomique des CD (**figure 33**). Elle joue un rôle important dans le métabolisme des triacylglycérols et des esters de cholestérol (Ameis et al. 1994). Enfin, la phospholipase putative PLBL2 a également été identifiée dans l'étude de Muthukottiappan, et, bien qu'il n'existe pas encore d'études menées sur sa fonction précisément, elle pourrait contribuer à l'apprêtement des lipides antigéniques, de la même manière que les phospholipases LPLA2 et PLRP2.

Il est important de souligner que les protéines candidates identifiées dans les données protéomique des cellules THP-1 varient en fonction de la méthode utilisée. Pourtant, étant donné qu'il s'agit des mêmes cellules, on pourrait s'attendre à retrouver les mêmes protéines. Cela suggère que les résultats ne sont probablement pas entièrement exhaustifs, malgré la

grande sensibilité de la méthode employée de chromatographie liquide en tandem avec spectrométrie de masse à nano-flux (LC-MS/MS à nano-flux). Nous avons donc décidé qu'il était pertinent d'explorer la littérature afin d'enrichir la liste avec d'autres protéines potentielles et de valider leur présence de manière rétroactive par western blot.

### **c) Enrichissement de la liste de protéines candidates à partir des données bibliographiques**

L'étude de Muthukottiappan et al. de 2021 nous a été particulièrement utile afin d'enrichir notre liste de protéines candidates (Muthukottiappan et al. 2021). Cette étude compile l'ensemble des protéines lysosomales identifiées lors de diverses études récentes. Elle recense 905 protéines, parmi lesquelles les auteurs ont validé que 341 sont effectivement lysosomales et ont confirmé leurs fonctions. Nous avons recherché parmi ces protéines celles susceptibles d'être des LTP ou des hydrolases (lipases, phospholipases ou enzymes capables de digérer des parties osidiques).

Concernant la digestion des parties osidiques, l'étude identifie 25 protéines caractérisées comme capables d'hydrolyser les liaisons glycosidiques. Cependant, il a été difficile de trouver des candidates pertinentes. Par exemple, des enzymes comme la NAAA (N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase), la NAGA (N-acétylgalactosaminidase) ou la CTBS (Cathepsin B-like cysteine peptidase) nécessitent une fonction amine et clivent principalement des glycoprotéines. Nous n'avons également pas ajouté à la liste des protéines candidates les arylsulfatases (ARSA à ARSI), qui hydrolysent les liaisons ester sulfate dans des substrats comme les sulfatides. En effet, bien qu'elles apparaissent dans certaines de nos analyses, nous n'avons pas exploré ces enzymes car le groupement sulfate de l'Ac<sub>2</sub>SGL de *Mtb* est essentiel à sa présentation à la surface cellulaire.

Parmi les protéines de la famille ABC, cette étude présente les protéines ABCA2 et ABCA5, qui ne sont pas détectées dans les analyses des FL. Cependant, elles sont localisées dans la membrane du lysosome et impliquées dans le transport des lipides et pourraient donc nous intéresser.

ABCA2 intervient dans le transport intracellulaire du cholestérol du lysosome vers le RE (Davis et al. 2004). Les souris délétées du gène d'ABCA2 présentent une accumulation du ganglioside GM1 et des cérébrosides, avec une réduction de la sphingomyéline et des PS et PE au niveau du cerveau, suggérant un rôle dans le métabolisme des sphingolipides, de la même manière que les saposines (Sakai et al. 2007). Bien que la fonction physiologique de l'ABCA2 dans le lysosome est inconnue à ce jour, il semblerait que cette protéine

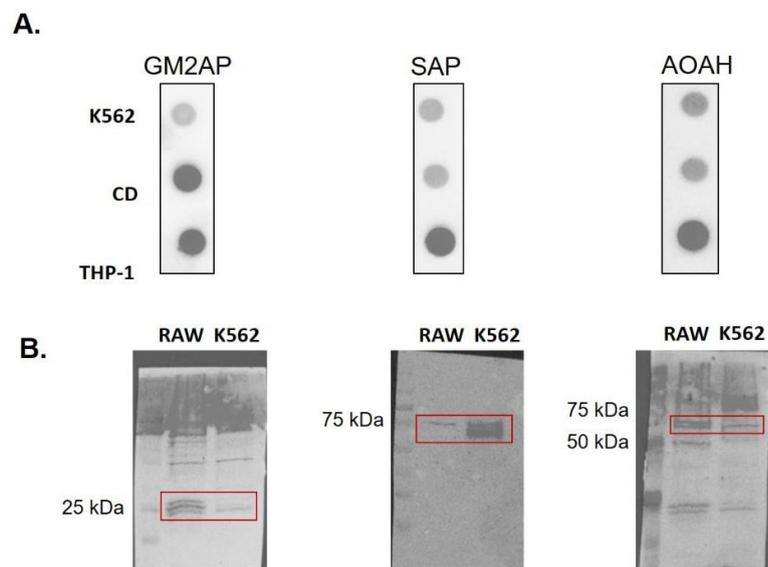
transporte des phospholipides chargés négativement vers le côté luminal de cet organite. Ce transport entraîne une haute concentration de charge négative dans le lysosome, attirant les enzymes céramidase acide et glucocérébrosidase, qui dégradent le céramide en sphingosine. Alors que le céramide favorise l'export du cholestérol hors du lysosome par les protéines NPC1 et NPC2, le sphingosine, en revanche, est moins efficace que la céramide pour déplacer le cholestérol sur NPC2, entraînant la séquestration du cholestérol libre dans les lysosomes (Davis et Tew 2018). Quant à ABCA5, elle a été identifiée par Petry et ses collègues en 2003 comme ayant une fonction similaire à celle de NPC1. En effet, ABCA5 intervient dans l'efflux du cholestérol hors des lysosomes (Petry et al. 2003).

Parmi les autres candidates, la protéine EPDR1 (« Mammalian endymin-related protein1 »), dont la structure cristallographique a été élucidée en 2019 par Wei et al. est également intéressante (Wei et al. 2019). Cette protéine est localisée dans le lumen du lysosome EPDR1 et est structurellement proche de la protéine bactérienne LolA, impliquée dans le transport des lipoprotéines. Une étude phylogénétique a également montré que l'émergence de ces protéines chez les vertébrés coïncide avec l'apparition d'enzymes impliquées dans la dégradation des gangliosides ou des sulfatides. EPDR1 serait capable d'interagir avec des membranes composées de lipides chargés négativement, comme GM1 et le BMP (Bis(monoacylglycero)phosphate), et agir comme une LTP. Cependant, elle ne figure pas dans les volcano-plots des FL, et sa présence dans les cellules d'intérêt devra d'abord être confirmée par western blot, par exemple.

Concernant les lipases potentielles, l'AOAH (acyloxyacyl hydrolase) apparaît comme un candidat prometteur. C'est une lipase lysosomale retrouvée principalement dans les cellules immunitaires, dont les CD. Elle possède deux sous-unités : une commune aux lipases (avec une séquence conservée « Gly-X-Ser-X-Gly »), et une présentant des similarités avec les saposines, et ces deux sous-unités sont nécessaires à son activité de lipase (Staab et al. 1994; Gorelik et al. 2018). AOAH est connue pour cliver le LPS et la PC. De plus, des études ont montré que cette enzyme possède plusieurs activités, incluant celles de phospholipase, lysophospholipase mais aussi acyltransférase, ce qui en fait un potentiel acteur dans le transport lipidique au sein des lysosomes (Munford et al. 1992).

Candidate (Nom Uniprot)	Rôle potentiel	Présent dans les graphes	DéTECTÉ par Dot Blot ou WB
Transporteurs ABC (ABCA2 ABCA3, ABCA5, ABCD1, ABCD3)	LTP	ABCD1, ABCD3, ABCA3	
EPDR1		Non	
AOAH	Lipase	Non	Oui
LIPA (LICH)		Oui (CD)	
PLBL2		Oui (THP-1)	
NPC1 et NPC2	LTP	Oui	
GM2AP (SAP3)		Oui	Oui
Prosaposine (SAP)		Oui	Oui

**Tableau 11 : Protéines candidates identifiées.** En jaune : LTP potentielle, en vert : lipase potentielle et en bleu : LTP déjà connue pour jouer un rôle dans le chargement des lipides sur CD1d



**Figure 34 : Premiers tests de détection de 3 protéines candidates (AOAH, GM2AP et SAP) avec des AC polyclonaux A) Dot-blot et B) Western blot avec des AC polyclonaux dirigés contre trois des protéines candidates (GM2AP, prosaposine et AOA). 10µg de protéines provenant du lysat total des trois types de CPA (CD, THP-1 et K562) ont été utilisés.**

Nous avons également inclus dans la liste les protéines impliquées dans la présentation des lipides sur CD1d, comme GM2AP et les protéines NPC1 et NPC2, bien qu'aucun rôle direct n'ait encore été démontré pour CD1b. La prosaposine est ajoutée à la liste pour jouer le rôle de contrôle, étant donné que les produits de clivage de la prosaposine, particulièrement la Sap-C, sont impliqués dans le chargement de lipides mycobactériens sur CD1b. La liste finale de protéines candidates est présentée dans le **tableau 11**.

Cette étude nécessite des AC fiables dirigés contre les protéines candidates pour deux raisons : 1) certaines protéines intéressantes identifiées grâce à la bibliographie ne figurent pas dans les données protéomiques, mais ne sont peut-être simplement pas détectées et 2) ces AC seront utilisés une fois l'inactivation effectuée par siRNA afin de s'assurer de l'efficacité de cette inactivation. Nous avons donc commencé à tester des premiers AC dirigés contre AOA (une des candidates les plus intéressante), GM2AP et la prosaposine (qui sont des contrôles positifs car identifiés dans les volcano-plots). Nous avons essayé de détecter la présence de ces trois protéines dans du lysat total des trois CPA. Les résultats de dot-blot (**figure 34.A**) montrent que pour une même quantité de protéine déposée dans chaque puits (10µg), les protéines cibles sont détectées dans les trois lysats différents. Les résultats de western blot ne sont pas bien nets pour la GM2AP et AOA et présentent un fort signal non-spécifique, qui a persisté même en modulant la quantité de l'AC (avec des dilutions allant du 10 000<sup>e</sup> au 100<sup>e</sup>) (**figure 34.B**). Cela est probablement dû au fait que les AC utilisés ici sont polyclonaux, ce qui ne permet pas une reconnaissance aussi spécifique de la protéine cible. Comme il est important d'obtenir et de valider des AC fiables, la recherche d'AC devra donc être poursuivie, à l'exception de l'AC anti-prosaposine qui donne des résultats satisfaisants.



### 3) Identification du protéome intra-lysosomal de CD1b

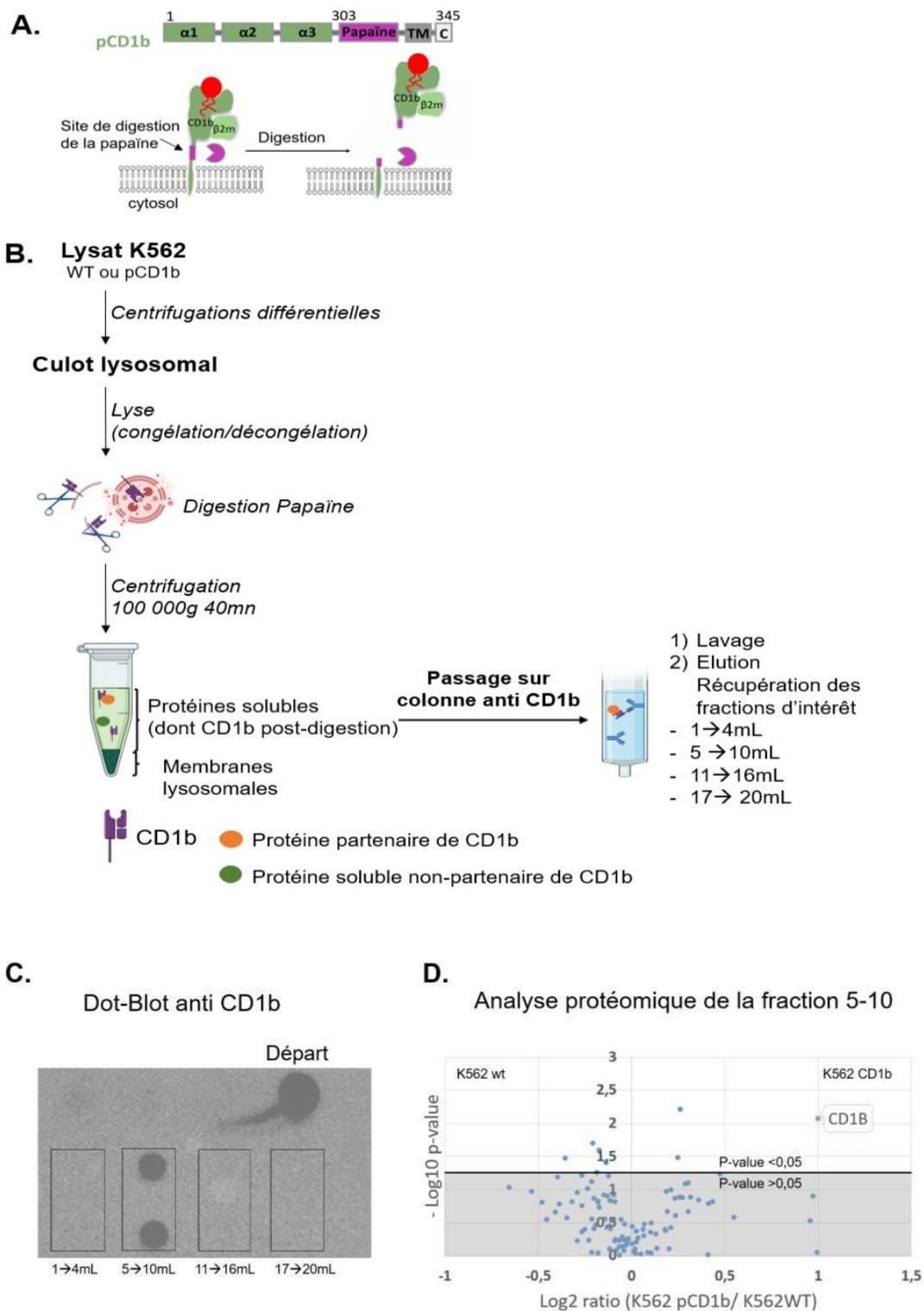
Une approche complémentaire que j'ai essayé de mettre en place consiste à identifier les protéines partenaires de CD1b. Cela est intéressant car aucune étude sur l'interactome complet des protéines CD1 n'a été publiée à ce jour. Cependant, quelques études ont examiné des interactions spécifiques de certaines protéines avec certaines isoformes de CD1.

Par exemple, en 2004, Winau et al. ont cherché à savoir si Sap-C, connue pour interagir avec des protéines comme la  $\beta$ -glucosidase, pouvait également interagir directement avec CD1b. Ils ont incubé des CD avec les saposines A à D, couplées à un agent de réticulation permettant de lier de façon covalente les protéines en interaction. Ils ont observé par immunoprécipitation que Sap-C, et dans une moindre mesure Sap-D, interagissent avec CD1b. Ces résultats ont été confirmés par des expériences de purification sur colonne d'affinité, où CD1b a été purifiée avec Sap-C (Winau et al. 2004).

En 2012, Angénieux et al. ont identifié une protéine de 27 kDa, précédemment observée comme liée à CD1e lors de son transport vers les lysosomes, comme étant LPTM5 (Lysosomal-Associated Transmembrane Protein 5), impliquée dans la régulation de l'ubiquitination des protéines cibles (Angénieux et al. 2012). Pour caractériser cette protéine, les auteurs ont transfecté la lignée de mélanome humain M10 avec un plasmide codant pour CD1e, et ont réalisé une immunoprécipitation en utilisant un AC spécifique de CD1e lié à la protéine A-Sepharose. Les fractions d'élution ont ensuite été analysées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS), ce qui a permis d'identifier LPTM5.

Notre objectif diffère de ces études car nous cherchons à identifier l'interactome complet de CD1b au niveau des lysosomes. Elucider cet interactome permettrait d'identifier de nouvelles LTP, capables d'interagir avec CD1b de la même manière que Sap-C. Cette approche permettrait éventuellement de découvrir des acteurs nécessaires au trafic intracellulaire de CD1b, ainsi que sa stabilité au sein du lysosome.

Cependant, cette approche ne permettrait sûrement pas d'identifier des hydrolases, qui supposément interagissent avec le lipide, sans interagir avec CD1b. Parmi les modèles cellulaires utilisés, les cellules K562 sont les plus adaptées à la transfection de siRNA. Nous avons tenté d'identifier les partenaires de CD1b dans les lysosomes de ces cellules.



**Figure 35 : Expérience de purification de CD1b sur colonne** A) Construction des K562 pCD1b B) Purification de CD1b en complexe avec ses protéines partenaires sur colonne d'affinité. Les fractions lysosomales sont obtenues par centrifugations différentielles et CD1b est clivé hors de la membrane lysosomale avec une digestion par la papaine. Les protéines solubles lysosomales sont passées sur colonne anti-CD1b C) Dot-blot avec un AC anti-CD1b afin de détecter les fractions d'élution où se trouve la protéine d'intérêt. La totalité de CD1b récupéré se trouve dans les mL 5 à 10. D) Volcano plot résultat de l'analyse protéomique de cette fraction d'élution. Le nombre de protéines est trop faible pour conclure.

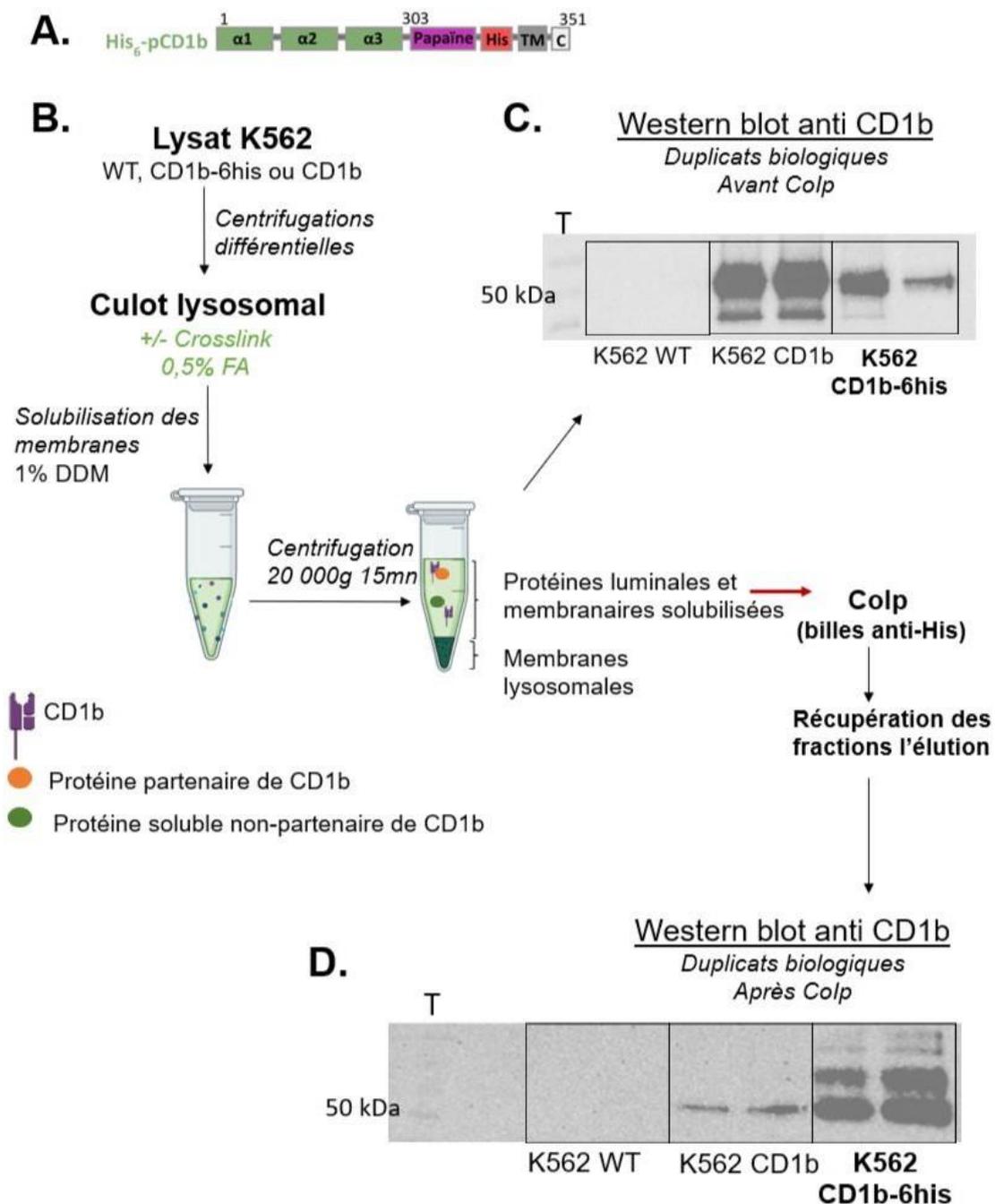
### a) Essai de purification de CD1b et ses protéines partenaires sur colonne

Dans un premier temps, nous avons tenté de purifier CD1b en complexe avec ses éventuelles protéines partenaires en utilisant une colonne de sépharose greffée avec des AC anti-CD1b. Cette colonne est couramment utilisée au laboratoire pour étudier les complexes CD1b-lipides présentés à la surface des cellules, et nous avons donc conclu que la méthode serait plus aisée à mettre au point. L'utilisation de la colonne est rendue possible grâce à des cellules K562 nommées pCD1b générées précédemment dans l'équipe. Ces cellules possèdent le gène de CD1b auquel le site de clivage spécifique de la papaïne à la base du domaine extracellulaire est ajouté (**figure 35.A**).

De plus, l'utilisation de la papaïne permet de ne pas utiliser de détergent, car CD1b n'a pas à être extrait de la membrane et est clivé à la place. Cela conserve l'intégrité des lipides chargés sur CD1b, et présente donc un avantage quant à la stabilité de la protéine dans le cadre de notre étude. Un contrôle est nécessaire pour éliminer les protéines se liant de manière non spécifique à la colonne, indépendamment de CD1b. Pour cela, nous avons utilisé les cellules K562 WT.

Afin de cibler spécifiquement les protéines partenaires de CD1b dans les lysosomes, les lysosomes sont d'abord enrichis par centrifugations différentielles (la méthode est celle présentée dans la chapitre 2.1.a), puis lysés par cycles de congélation/décongélation. En effet, comme CD1b se trouve dans la lumière des lysosomes, il est nécessaire de lyser ces organelles pour accéder au site de clivage par la papaïne. La solution obtenue après clivage, supposée contenir CD1b et ses partenaires, est passée sur la colonne d'affinité (**figure 35.B**). Afin de déterminer les fractions d'élution dans lesquelles CD1b est élué, des dot-blots dirigés contre CD1b ont été réalisés sur la fraction de départ (avant passage sur colonne) ainsi que sur différentes fractions d'élution. Les fractions correspondant aux mL 5 à 10 ont été regroupées et constituent la fraction d'intérêt, permettant de récupérer la quasi-totalité des protéines CD1b fixées à la colonne après lavage (**figure 35.C**).

Aucune protéine d'intérêt n'a été révélée avec cette approche. La protéine la plus enrichie était CD1b, mais la p-value et le ratio suggèrent un enrichissement très faible (**figure 35.D**). Ces résultats indiquent que très peu de protéines ont été éluées. Nous émettons l'hypothèse que certaines protéines ont pu être perdues lors de la centrifugation post-digestion par la papaïne (figure 35.B) ou lors des lavages de la colonne. Il est également



**Figure 36 : Expérience de co-IP pour identifier des partenaires lysosomaux de CD1b** A) Construction du plasmide CD1b avec le tag 6-histidine présent en N-ter du domaine transmembranaire. B) Les fractions lysosomales sont obtenues par centrifugations différentielles et les protéines membranaires sont solubilisées. Pour les conditions avec crosslink, du FA 0,5% est ajouté sur les culots lysosomaux avant solubilisation. C) Les protéines solubilisées sont co-précipitées. Un western blot anti-CD1b est réalisé avant l'étape de co-IP D) Western blot avec un AC anti-CD1b afin de vérifier l'enrichissement en cette protéine dans les fractions d'élué après co-IP.

possible que la papaine ait entraîné un clivage non spécifique de plusieurs autres protéines lysosomales.

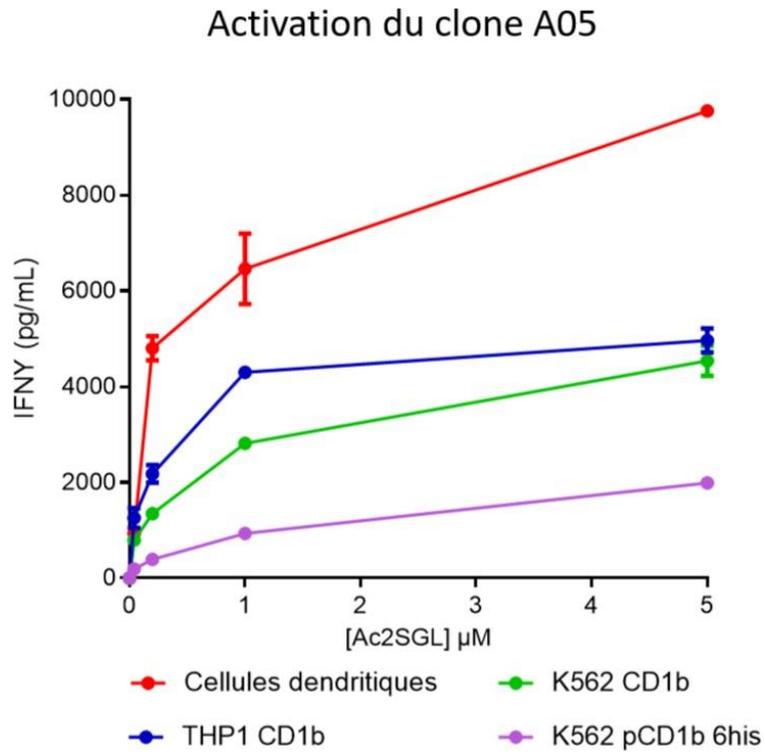
Étant donné les nombreuses incertitudes et le faible rendement de ce protocole, nous avons décidé d'adopter une autre méthode, plus classique, pour déterminer l'interactome de CD1b dans les lysosomes. Cependant, il est important de souligner qu'une seule analyse protéomique a été effectuée par cette méthode (avec chaque condition effectuée en quatre exemplaires) et que nous n'avons pas effectué de mise au point afin de recommencer.

#### **b) Identification de l'interactome de CD1b par co-IP**

Une seconde approche pour identifier les protéines lysosomales interagissant avec CD1ba été développée. Cette approche est inspirée de l'étude de Zhang et al., qui a permis d'identifier des protéines lysosomales partenaires de LAMP, via co-IP (Zhang et al. 2023). Toutefois, cette méthode, qui nécessite l'utilisation de détergents, pourrait perturber les lipides chargés sur CD1b. Il est donc possible que cette stratégie ne permette pas de capturer l'ensemble des partenaires de CD1b, notamment ceux dont l'interaction dépend de la présence des lipides dans les sillons de CD1b.

Nous avons utilisé une lignée de cellules K562 générées précédemment au laboratoire, transfectées avec un plasmide codant pour CD1b portant un tag 6-histidine (6his) au niveau de sa queue cytoplasmique (**figure 36.A**). Cette lignée permet d'utiliser des billes magnétiques dirigées contre le tag pour réaliser la co-IP, ce qui permet d'utiliser des billes déjà commercialisées (à l'inverse de billes coatées avec des AC anti-CD1b). Lors de la génération de cette lignée, la localisation de la protéine CD1b taguée a été vérifiée par microscopie à fluorescence (données non publiées générées précédemment dans l'équipe). Il a donc été confirmé que l'ajout du tag n'avait pas d'influence sur la localisation lysosomale de CD1b, et nous pouvons donc utiliser cette lignée pour déterminer son interactome dans cet organite.

Le protocole mis en place est présenté dans la **figure 36.B**. Il inclut une première étape de préparation de culots lysosomaux par la méthode de centrifugations différentielles. Les membranes lysosomales sont ensuite solubilisées à l'aide d'un tampon contenant 1% de n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM), un détergent non ionique couramment utilisé pour solubiliser les protéines membranaires intégrales sans dénaturer leurs structures ni leurs interactions fonctionnelles. Les fractions d'élution obtenues des cellules K562 exprimant



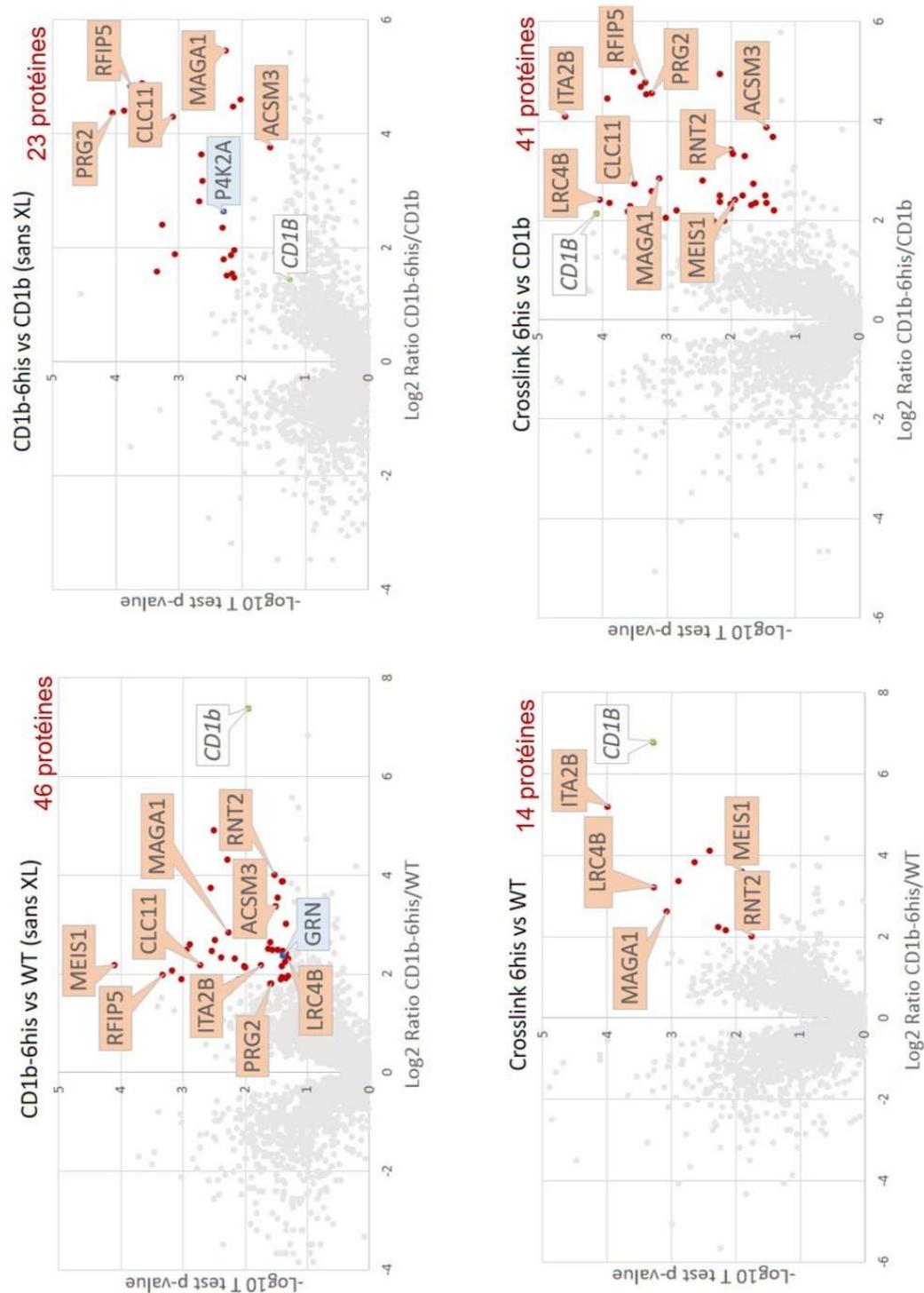
**Figure 37 : Comparaison des capacités d'activation du clone A05 des CPA suivantes : CD, THP- 1 CD1b, K562 CD1b et K562 CD1b-6his.** Les CD sont les CPA les plus efficaces, suivies de THP-1 puis des K562. Les K562 CD1b-6his n'activent pas le clone A05 aussi efficacement que les cellules nontaguées.

CD1b-6his ont été comparées à deux types de contrôles : les cellules K562 WT et les cellules K562 exprimant CD1b sans le tag 6his.

Les billes magnétiques utilisées pour la co-IP étant dirigées contre le tag 6his, le contrôle le plus précis est constitué par les cellules K562 CD1b ne possédant pas le tag. Cependant, nos expériences de western blot après solubilisation, et donc avant l'étape de co-IP, montrent que, pour un même nombre de cellules de départ (200 millions) et une même quantité de protéines déposées (10 µg), les cellules K562 CD1b contiennent une quantité de CD1b nettement supérieure à celle des cellules K562 CD1b-6his (**figure 36.C**). Cette différence se reflète également dans les tests d'activation du clone A05 : bien que les cellules K562 CD1b-6his soient capables d'activer le clone, elles le font de manière moins efficace que les cellules K562 CD1b (**figure 37**). Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette différence. Il est possible que, malgré leur transfert vers les lysosomes, les protéines CD1b-6his subissent un trafic réduit. Une autre hypothèse est que les plasmides codant pour CD1b et CD1b-6his se soient intégrés dans des régions du génome présentant des niveaux d'activité transcriptionnelle différents, entraînant une moindre expression de CD1b-6his.

Le western blot sur les fractions d'élution après co-IP avec un AC anti-CD1b a révélé cette fois-ci que pour une même quantité de protéines (5 µg) déposée dans les puits, les produits d'élution des cellules K562 CD1b-6his contiennent davantage de CD1b (**figure 36.D**), ce qui indique un bon fonctionnement du protocole de co-IP. Etant donné la quantité initiale de CD1b bien supérieure dans les K562 CD1b, cette protéine est toujours détectée dans les fractions d'élution, malgré le fait que les billes utilisées soient contre le tag 6his et non CD1b. Par conséquent, nous avons ajouté un autre contrôle, les cellules K562 WT, afin de nous assurer que les analyses protéomiques ne soient pas biaisées par des faux positifs.

Ces fractions d'élution ont ensuite été analysées par protéomique. Nous avons effectué les analyses avec et sans une étape de pontage chimique (ou crosslink) dans le protocole. L'agent crosslinkant est ajouté sur le culot lysosomal, à l'issue des centrifugations différentielles. Nous avons choisi d'effectuer le crosslink à cette étape plutôt que sur les cellules entières en nous basant sur l'étude de Singh et al. de 2022, où les auteurs étudient les interactions entre protéines dans le lysosome, et effectuent l'étape de crosslink après purification des lysosomes (Singh et al. 2022). L'agent crosslinkant que nous avons utilisé est le formaldéhyde (FA) à 0,5%. Cet agent permet de créer des liaisons covalentes réversibles entre les groupes fonctionnels amine des résidus lysine des protéines proches, ce qui permet l'analyse protéomique de ces dernières par la suite.



**Figure 38 : Volcano plots résultant des analyses protéomiques après co-IP pour identifier les partenaires de CD1b dans différentes conditions. A) Sans crosslink : K562 CD1b-6his contre WT (2588 protéines totales), B) sans crosslink : K562 CD1b-6his contre CD1b (2588 protéines totales), C) avec crosslink : K562 CD1b-6his contre WT (2893 protéines totales), et D) avec crosslink : K562 6His contre CD1b (2893 protéines totales). Le nombre de protéines enrichies du côté de la fraction d'intérêt est noté en rouge sur chaque plot. Les protéines étiquetées sont celles enrichies dans trois des quatre graphes, tandis que les protéines en bleu sont spécifiques à un seul graphe mais jugées intéressantes pour une analyse plus approfondie.**

Les résultats des analyses protéomiques des fractions d'éluion obtenues avec et sans crosslink sont présentés sous forme de volcano-plots, où nous comparons les fractions d'éluion des cellules CD1b-6his avec celles des contrôles (K562 WT et K562 CD1b), respectivement. Pour filtrer les protéines les plus enrichies, nous avons sélectionné celles présentant un log<sub>2</sub> ratio d'au moins 1,8 et un -log(p-value) d'au moins 1,3 (qui témoignent d'un enrichissement significatif, avec la p-value fixée à 0,0). Ces critères ont permis d'identifier entre 14 et 46 protéines selon les conditions expérimentales (**figure 38**). Parmi ces protéines, nous avons établi une liste à partir de celles présentes dans au moins trois des quatre volcano-plots, ce qui a réduit notre sélection à neuf protéines (étiquetées en orange dans les volcano-plots de la **figure 38**).

Nous avons recherché dans les bases de données (Uniprot, GeneCard, Human Protein Atlas) quelles étaient les localisations subcellulaires ainsi que les fonctions connues de ces neuf protéines. Ces recherches ont révélé que 6 protéines sur les 9 possèdent des actions très éloignées de celles que nous pourrions supposer des protéines partenaires de CD1b. Ces protéines, à savoir MEIS1, CLEC11A, MAGA, PRG2, LRC4B et ITA2, n'ont donc pas fait l'objet de plus de recherches. Ces données sont surprenantes étant donné leur présence dans la majorité des résultats de co-IP ducôté de la fraction d'intérêt, avec un ratio important et une p-value significative.

Les trois autres protéines pourraient être impliquées dans les mécanismes menant à la présentation des lipides par CD1b, même de manière indirecte (**tableau 12**). Par exemple, la RNaseT2 (RNT2), dont la localisation lysosomale a été découverte en 2006 par Campomenosi et al., a pour rôle de dégrader les acides nucléiques (Campomenosi et al. 2006). Des études chez le rat ont montré que l'inactivation de cette protéine entraîne un dysfonctionnement lysosomal et une neuroinflammation, ainsi qu'une diminution des protéines LAMP1 et LAMP2A, essentielles pour l'intégrité des lysosomes (Sinkevicius et al. 2018). Bien qu'aucun lien direct avec CD1b n'ait été établi, son rôle dans le maintien de la structure lysosomale en fait une candidate potentielle. La protéine ACSM3 (Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3) est une enzyme de la famille des acyl-CoA synthétases, principalement localisée dans les mitochondries. Elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme des acides gras à chaîne moyenne (6 à 12 carbones) en les convertissant en acyl-CoA (Iwai et al. 2002). Ainsi, ACSM3 est impliquée dans le métabolisme lipidique. Il est possible qu'elle influence la disponibilité des lipides pouvant transiter vers les lysosomes et être présentés par CD1b. Cependant, aucune localisation lysosomale

Candidate (Non Uniprot)	Localisation	Rôle décrit (Uniprot)	Présence dans les FL
<b>ITA2B</b>	Membrane plasmique	Rôle dans la coagulation	Non
<b>LRC4B</b>	Membrane plasmique	Formation des synapses	Non
<b>CLEC11A</b>	Sécrété	Facteur de croissance	Non
<b>MAGA1</b>	Noyau, cytoplasme	Facteur de transcription	Non
<b>MEIS1</b>	Noyau	Facteur de transcription	Non
<b>PRG2</b>	Sécrété	Cytotoxine	Non
<b>RnaseT2 (RNT2)</b>	Lysosome, RE, mitochondrie	RNAse dégradant les ARN des pathogènes microbiens (Greulich et al. 2019)	CD et THP-1
<b>Rab11FIP5 (RFIP5)</b>	Endosomes tardifs, Golgi, cytoplasme	Régule le transport intracellulaire, trafic de protéines endocytées vers la membrane plasmique apicale (Prekeris et al. 2000)	Non
<b>ACSM3</b>	Mitochondrie	Activation des acides gras par CoA produisant un acyl-CoA, rôle dans le métabolisme des acides gras (Iwai et al. 2002)	THP-1
<b>GRN</b>	Lysosome	Régule le trafic des protéines vers les lysosomes et l'activité des enzymes lysosomales (Zhou et al. 2017)	Non
<b>PI4K2A</b>	Membranes des endosomes, Golgi, mitochondries	Génération du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2), permet l'efflux de cholestérol hors des lysosomes (Hu et al. 2018)	CD et THP-1

**Tableau 12 : Protéines candidates identifiées par co-IP.** Neuf protéines étaient enrichies dans au moins trois graphiques parmi les quatre générés (en rouge), et deux protéines n'ont été identifiées que dans un seul graphique, mais elles sont intéressantes (en bleu). Les protéines sur fond gris n'ont pas fait l'objet d'études bibliographiques approfondies, car leurs rôles décrits sont trop éloignés. Les protéines sur fond vert sont celles qui pourraient participer directement ou indirectement à la voie de présentation des lipides antigéniques par CD1b. La présence de ces protéines dans les volcano-plots des analyses protéomiques des FL obtenues précédemment a également été recherchée.

d'ACSM3 n'a été rapportée à ce jour, rendant incertaine une interaction directe entre cette protéine mitochondriale et CD1b.

Parmi les protéines identifiées par ces expériences de co-IP, la plus intéressante est RFIP5 (Rab11 Family-Interacting Protein 5), ou Rab11FIP5. Cette protéine est impliquée dans le recyclage des protéines internalisées vers la membrane plasmique (Schonteich et al. 2008) et dans le transport de protéines vers les lysosomes, comme cela a été démontré lors d'infections par le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV). Dans ce contexte, RAB11FIP5 interagit avec la protéine virale ORF45 pour faciliter sa dégradation dans les lysosomes (Wei et al. 2020). Elle pourrait jouer un rôle dans le transport de CD1b entre la membrane plasmique et les endosomes tardifs et les lysosomes. Inversement, Rab11FIP5 pourrait médier le transport de CD1b de ces compartiments acides vers la membrane plasmique. Cette étape de transit de CD1b n'est pas décrite à ce jour, et Rab11FIP5 est une protéine candidate possiblement actrice de cette étape encore peu connue de la voie de présentation des antigènes lipidiques.

De plus, deux autres protéines, la progranuline (GRN), et la Phosphatidylinositol 4-Kinase Type 2 Alpha (P4K2A) ont été identifiées dans les volcano-plots des conditions non crosslinkées et sont des partenaires possibles de CD1b intéressantes.

Concernant la GRN, une étude de Evers et al. publiée en 2017 a montré que, les cerveaux de souris n'exprimant pas cette protéine présentaient des différences de proportions de lipides (une accumulation préférentielle d'esters de cholestérol et de TAG, ainsi qu'une diminution de DAG et PS) (Evers et al. 2017). De plus, la GRN permet la localisation lysosomale de la prosaposine et de la  $\beta$ -glucosidase (X. Zhou et al. 2017; Jian et al. 2016). Cette protéine, bien qu'identifiée comme enrichie uniquement dans un des quatre volcano-plots, est une candidate prometteuse car elle pourrait de manière directe ou via son action sur la prosaposine, réguler le chargement des lipides sur CD1b.

La P4K2A, comme la protéine Rab11FIP5, pourrait être impliquée dans le trafic intracellulaire de CD1b. Il est possible de supposer que cette kinase soit impliquée dans le transport de CD1b aux lysosomes, via son association à la protéine AP-3. En effet, il a été montré que la P4K2A est associée aux vésicules contenant la protéine AP-3, et que celle-ci est délocalisée lorsque l'expression de la P4K2A est inactivée (Salazar et al. 2005). De plus, cette kinase joue un rôle dans la régulation du transport intracellulaire du cholestérol via la phosphorylation du phosphatidylinositol 5-phosphate (PI(5)P). Le PI(4,5)P2 ainsi produit permet l'efflux du cholestérol hors des lysosomes vers les peroxysomes. De ce fait,

l'inhibition de la P4K2A entraîne une accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Hu et al. 2018). Le fait que P4K2A puisse être impliquée dans la modulation de la quantité de cholestérol intralysosomal, de la même manière que les protéines NPC1 et NPC2 en fait une candidate intéressante à inactiver.

Cette liste de protéines candidates a été élaborée en fin de projet, et il n'a donc pas été possible de confirmer l'interaction de certaines de ces protéines avec CD1b. Cependant, les protéines Rab11FIP5, P4K2A, GRN, ACS3M et RNT2 sont des protéines intéressantes, qui pourront être étudiées dans le cadre de la présentation des lipides par CD1b de manière plus précise.

### 3) Conclusion et perspectives

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre, notamment sur l'obtention de la FL et sa caractérisation, sont inclus dans la publication dont je suis co-première autrice, soumise en 2024 dans le *Journal of Lipid Research*, et en attente de révision. L'identification de l'activité lipase présente dans les FL, capable de générer des formes non conventionnelles de PIM2Ac2, permet l'activation du TLR2 en association avec TLR6, contrairement aux formes naturelles de *Mtb* qui nécessitent TLR1. Cette étude montre que la transformation des lipides microbiens dans les cellules immunitaires élargit le spectre des PAMPs reconnus par les PRRs et diversifie l'utilisation des TLR.

Pour établir une liste pertinente de protéines lysosomales impliquées dans la dégradation ou le transport des lipides de *Mtb*, il était nécessaire de développer une méthode reproductible pour obtenir une fraction enrichie en lysosomes. Deux méthodes classiques, les centrifugations différentielles et la séparation sur gradient d'Optiprep, ont été testées. Les deux ayant montré une efficacité comparable, nous avons opté pour les centrifugations différentielles. Le contenu de ces fractions a été caractérisé par des analyses biochimiques et biophysiques, confirmant leur enrichissement.

Après s'être assurés que les enzymes contenues dans la FL étaient encore actives à l'aide d'un test d'activité  $\beta$ -hexosaminidase, nous avons testé la digestion *in vitro* des PIM2Ac4. L'objectif était de commencer les tests de digestion *in vitro* sur un lipide déjà connu pour être dégradé par des enzymes lysosomales. Cela permettait de vérifier si les formes non conventionnelles de PIM, identifiées dans la littérature, sont générées lors des expériences de ma thèse. Après avoir modulé différents paramètres, il a été possible d'observer de manière reproductible des produits de dégradation générés par les enzymes

de la FL.

Toutefois, seule la forme acylée PIM2Ac3 a été détectée dans nos conditions, après 4 jours de digestion, un délai relativement long comparé aux durées des actions enzymatiques physiologiques, qui varient généralement de 30 minutes à quelques heures. La génération de PIM2Ac2 n'a pas été observée, contrairement aux résultats obtenus par d'anciens membres de l'équipe. De plus, aucun produit de digestion n'a été observé pour les autres lipides testés, tels que PIM6Ac4 et LAM. Ces résultats suggèrent que, bien que les enzymes lysosomales restent actives après obtention des FL, le protocole de digestion lipidique *in vitro* n'est pas encore optimisé. Cela pourrait indiquer que l'environnement cellulaire est indispensable à l'action des hydrolases, ou que des enzymes telles que LPLA2 et PLRP2 ne sont présentes qu'en quantités insuffisantes dans les fractions utilisées.

Il serait intéressant d'essayer d'incorporer les lipides dans des liposomes pour mieux simuler le contexte cellulaire, ou d'utiliser des enzymes purifiées afin de valider ces hypothèses. Ces expériences n'ont donc pas permis d'orienter la recherche de protéines candidates, qui a été effectuée grâce à l'analyse des protéines contenues dans les FL.

La recherche de protéines candidates a été effectuée à partir de FL de CD et de THP-1, ainsi que grâce à une étude bibliographique. Les graphiques générés à partir des données protéomiques comptaient un nombre important de protéines du côté des FL, et nous avons donc dû d'abord filtrer les protéines à étudier en ne prenant en compte que celles figurant sous le mot-clé « lysosome » dans la base de données Uniprot. Pour obtenir des volcano-plots plus ciblés, il aurait été préférable de purifier spécifiquement les lysosomes. À cet égard, la méthode de purification à l'aide de nanoparticules magnétiques (SPIONS - Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) est une technique prometteuse. Les lysosomes peuvent en effet être rapidement isolés à partir de cellules en culture en utilisant des particules d'oxyde de fer qui sont absorbées par les cellules via la voie endocytaire. Les SPIONS s'accumulent dans les lysosomes, permettant leur isolement à l'aide de billes magnétiques (Rofe et al. 2016). Cependant, en raison de contraintes techniques, nous n'avons pas pu appliquer cette méthode, ce qui aurait permis d'affiner la liste des candidats. Nous avons tout de même établi une liste de protéines candidates à partir des analyses effectuées et avec l'aide des données bibliographiques. Les protéines relevées dans les analyses bibliographiques qui n'apparaissent pas dans les données de protéomique devront dans un premier temps être détectées par western blot. Selon leur détection et la qualité des AC spécifiques, elles seront inactivées pour évaluer l'impact de cette inactivation sur la présentation du GMM et de l'Ac<sub>2</sub>SGL, en utilisant les outils biologiques validés.

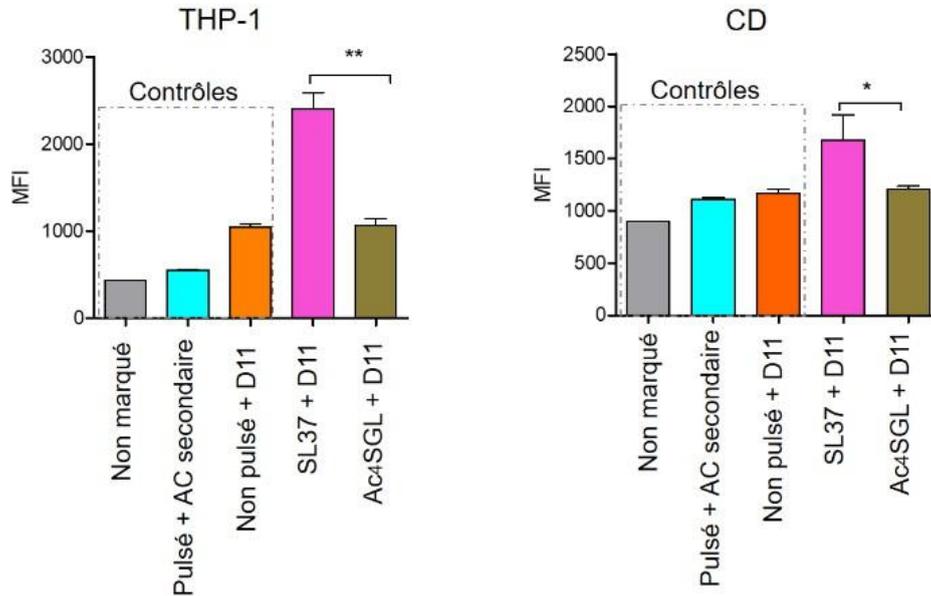
Protéine candidate	Inhibiteur spécifique commercialisé	Références
ABCA2, ABCA3, ABCA5, ABCD1, ABCD3	Non	
ACSM3	Non	
AOAH	Non	
GM2AP	Non	
GRN	Non	
EPDR1	Non	
LIPA	Lalistat	Hamilton et al. 2012
PI4K2A	PI-273 NC02, NC03	Li et al. 2017 Sengupta et al. 2019
PLBL2	Non	
NPC1, NPC2	NPC1 : U18666A NPC2 : Non	Lu et al, 2015
Rab11FIP5	Non	

**Tableau 13 : Protéines candidates et recherche de l'existence d'inhibiteurs spécifiques.** Ces protéines candidates identifiées lors des deux approches (analyse des FL et co-IP). Les inhibiteurs ont été recherchés sur les bases de données PubChem, ChEMBL, BindingDB, DrugBank, SwissTargetPrediction, MedChemExpress et TargetMole.

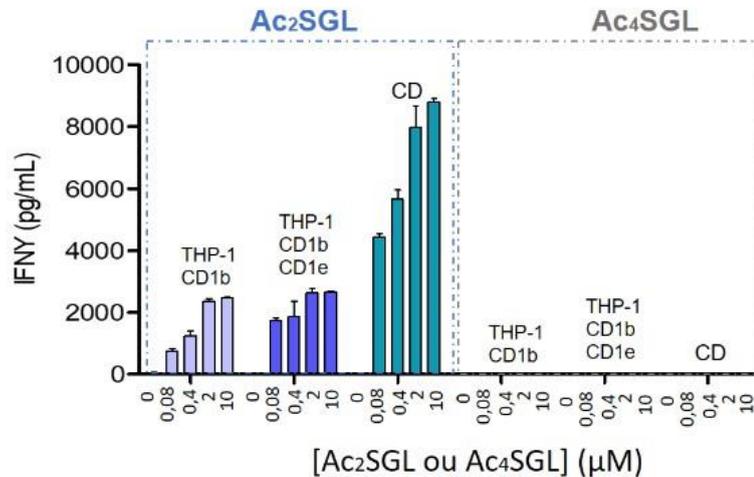
Des recherches sur l'interactome de CD1b n'ont jamais été effectuées, bien que cela soit essentiel pour comprendre l'environnement de cette protéine, qui pourrait influencer le chargement des lipides. Nous avons donc immunoprécipité la protéine CD1b afin d'étudier quelles protéines interagissaient avec elle dans les lysosomes. Les protéines retrouvées enrichies dans la majorité des fractions d'élution d'intérêt ont été étudiées en priorité. Ces protéines ne semblent pas toutes avoir été caractérisées comme lysosomales à ce jour, et le lien entre CD1b et certaines protéines de la liste est difficile à établir. Cependant, le fait que ces expériences soient effectuées en quatre réplicats biologiques, ainsi que la répétition de l'expérience avec ou sans crosslinking, suggère une certaine robustesse des résultats. Tout d'abord, la confirmation de l'interaction des protéines identifiées avec CD1b devra être effectuée par une co-IP inversée, ou des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), une méthode ayant déjà confirmé l'interaction de CD1e et LAPTM5 dans l'étude d'Angénieux et al. (Angénieux et al. 2012). Ces résultats de co-IP pourraient être complétés afin d'apporter un intérêt supplémentaire : l'interactome de CD1b pourrait être étudié en condition de pulse avec un extrait de lipides mycobactériens dans un premier temps, puis en condition d'infection. Cela aurait pour but de savoir si l'activation des CPA suite à l'endocytose de lipides mycobactériens induit de nouvelles interactions entre CD1b et des protéines lysosomales. Enfin, pour avoir des données les plus pertinentes possibles, ces expériences pourront être répétées sur FL de CD. Étant donné l'absence de modèles CD où CD1b est endogène et tagué, cela nécessiterait de générer des billes coatées avec des AC anti-CD1b.

Enfin, l'expression des 16 protéines candidates obtenues par les deux approches sera inactivée via l'utilisation de siRNA ou de la technologie CRISPR/Cas9. Cependant, dans un premier temps, les protéines pour lesquelles un inhibiteur spécifique est commercialisé seront d'abord inactivées de cette manière. L'existence de tels inhibiteurs est reportée dans le **tableau 13**.

### A. AC D11 (Cytométrie en flux)



### B. Lignée A05 (ELISA)



**Figure 39 : Test de mise en évidence d'une activité lipase sur le Ac4SGL permettant la reconnaissance de CD1b-Ac2SGL par les outils spécifiques** A) Tests de détection de CD1b-Ac2SGL par l'AC D11 après pulse des CPA (CD à droite et THP-1 à gauche) avec du Ac4SGL pendant 20h. B) Tests d'activation du clone A05 après pulse des CPA (THP-1 CD1b, THP-1 CD1b+CD1e et CD) pendant 24h avec du Ac4SGL.

## **Chapitre 3 : Etude du rôle de NPC1 dans la présentation des antigènes lipidiques par CD1b**

### **1) Utilisation des outils spécifiques du Ac2SGL pour tenter de mettre en évidence une activité lipase**

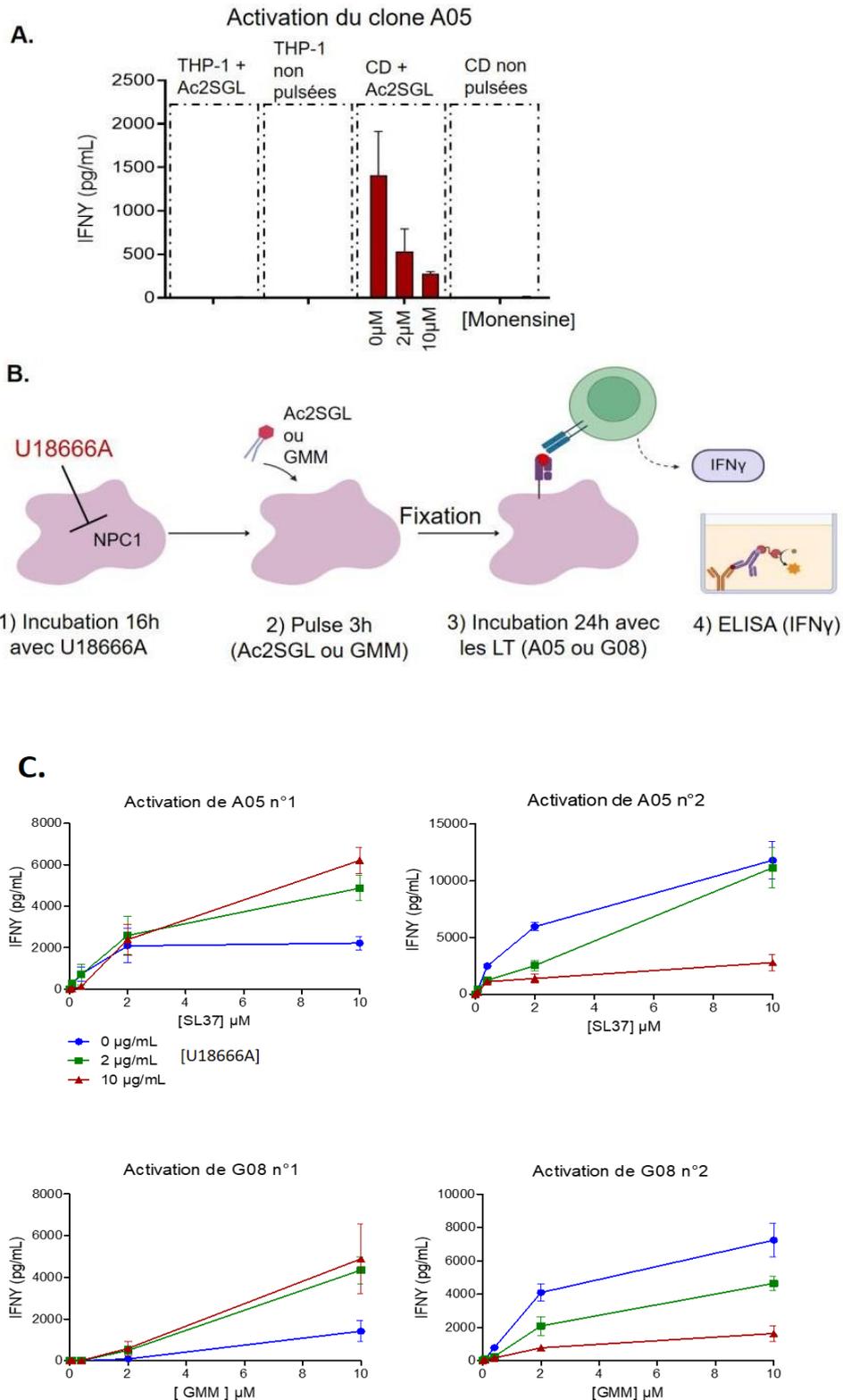
Une liste de protéines candidates a été élaborée, constituée de lipases et de LTP potentielles. Nous utiliserons les outils validés, présentés dans le chapitre 1, pour évaluer l'effet de l'inactivation des candidates. Il est incertain que nous soyons en mesure de détecter les effets des lipases potentielles identifiées (LICH, AOA et PLBL2) avec les AC et LT dont nous disposons. Nous avons donc essayé de voir si, en pulsan les CPA avec de l'Ac4SGL, les outils A05 et D11, spécifiques du Ac2SGL, le détectaient à la surface. Cela indiquerait une activité des lipases cellulaires sur l'Ac4SGL.

Des expériences de pulse des CPA (THP-1 et CD) avec une fraction naturelle de lipides mycobactériens enrichie en Ac4SGL ont été réalisées. Les temps de pulse utilisés sont les mêmes que pour le pulse avec l'Ac2SGL, présentés dans le chapitre 1, à savoir 20 h pour la détection par D11 et 24 h pour l'activation des LT. Les résultats présentés dans la **figure 39.A** montrent que, lorsque les CPA sont incubées en présence d'Ac4SGL, elles ne présentent pas, après 20 h, le complexe CD1b-Ac2SGL en surface et D11 ne se fixe donc pas aux cellules, contrairement à lorsque les CPA sont pulsées avec SL37. De même, lorsque les CPA sont incubées pendant 24 h avec Ac4SGL en présence des LT A05, ceux-ci ne sont pas activés et ne sécrètent pas d'IFN- $\gamma$ , contrairement à la condition d'incubation avec Ac<sub>2</sub>SGL (**figure 39.B**).

Les outils que nous avons validés ne permettent donc pas de mettre en lumière une activité lysosomale qui permettrait la dégradation de l'Ac4SGL de telle sorte qu'il soit présenté sous la forme Ac<sub>2</sub>SGL. Néanmoins, il reste important de souligner que ces outils semblent reconnaître un complexe spécifique, et rien n'assure que, si l'Ac4SGL est digéré par la cellule, le produit de cette digestion serait chargé sur CD1b et présenté de manière à être reconnu par ces outils.

### **2) Premiers essais d'inactivation de NPC1 avec l'inhibiteur U18666A**

Afin de nous concentrer sur les LTP candidates, nous avons choisi de commencer par l'étude du rôle de NPC1. Ce choix se justifie par deux raisons : 1) cette protéine a déjà été décrite dans le cadre de la présentation des lipides par CD1d (Sagiv et al. 2006) et 2) il existe



**Figure 40 : Premiers essais de l'étude de l'impact de l'inactivation de NPC1 par l'inhibiteur U18666A sur la présentation du GMM et de l'Ac<sub>2</sub>SGL. A) Les CPA traitées avec différentes concentrations de monensines sont utilisées pour activer les LT A05. B) Schéma expliquant le protocole d'inactivation de NPC1 avec l'U18666A pour étudier les effets sur l'activation des LT A05 et G08. C. Résultats des deux premières expériences d'activation des LT lorsque les CPA sont traitées avec différentes concentrations d'U18666A (0, 2, 10 μg/mL).**

un inhibiteur spécifique commercialisé, nommé U18666A. Dans une étude portant sur le virus Ebola (Lu et al. 2015), U18666A, connu pour bloquer l'export du cholestérol hors du lysosome et inhiber la réplication virale, a été identifié comme ciblant NPC1. U18666A se lie à un domaine crucial pour le transport du cholestérol, comme l'a confirmé une mutation rendant NPC1 non fonctionnel. Nous avons donc utilisé cet inhibiteur spécifique afin de déterminer si, de la même manière que pour la présentation des lipides par CD1d, l'inhibition de NPC1 entraînait des défauts de présentation des lipides par CD1b.

Il a d'abord été nécessaire de vérifier si les protocoles d'utilisation de molécules déjà connues pour inhiber la présentation des lipides avaient un impact sur l'activation de nos outils validés. Nous avons testé l'inhibition de la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL avec la monensine, qui perturbe le transport des ions et interfère avec l'acidification des lysosomes. Cette molécule a déjà été utilisée pour bloquer la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL au clone Z4B27 (Gilleron et al. 2004). Le protocole de cette publication a été reproduit. Les CD et THP-1 CD1b ont été incubées 1h avec 0, 2 ou 10 µM de monensine, puis pulsées ou non pendant 3h avec 10 µg d'Ac<sub>2</sub>SGL. Ces cellules ont ensuite été fixées, et les LT A05 ont été ajoutés après la fixation. Le surnageant de cette co-culture a été récupéré 24h plus tard, et l'IFN-γ sécrété a été quantifié par ELISA. Les résultats, présentés en **figure 40.A**, montrent que seules les CD pulsées avec de l'Ac<sub>2</sub>SGL activent les LT A05 après 3h de pulse. Les résultats obtenus quant à l'ajout de monensine sont attendus : l'activation des LT décroît en fonction de la concentration de monensine ajoutée. Les conditions contrôles, où les cellules ne sont pas pulsées donnent également les résultats attendus, à savoir pas d'activation de la lignée. En revanche, les cellules THP-1 exprimant CD1b ne parviennent pas à activer les LT dans ces conditions. Nous supposons que les CD sont plus efficaces pour présenter les lipides phagocytés et acheminés jusqu'aux lysosomes, et que les 3h de pulse avant la fixation ne sont pas suffisantes pour permettre aux THP-1 CD1b de présenter l'Ac<sub>2</sub>SGL qui doit d'abord être endocyté. Néanmoins, ce protocole nous a permis de déterminer que 3h était un temps de pulse nécessaire à la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL par les CD. Nous nous sommes donc concentrés sur l'utilisation des CD pour les tests d'inhibition de NPC1. Ces essais ne sont que des essais préliminaires, et nous n'avons pour le moment testé qu'un seul temps d'incubation avec l'inhibiteur. En nous basant sur les études de Song et al. et d'Elgner et al., qui ont utilisé U18666A dans le cadre de l'inhibition des cycles réplcatifs viraux, nous avons décidé d'incuber les cellules avec l'inhibiteur U18666A (à 0, 2 ou 10µg/mL) pendant 16h (Song et al. 2022; Elgner et al. 2016). Les CD étaient ensuite pulsées avec du GMM ou de l'Ac<sub>2</sub>SGL pendant 3h avant d'être fixées et incubées 24h en présence des clones G08 et

A05 (**figure 40.B**). Les CD utilisées pour ces expériences étaient des cellules décongelées provenant du même donneur, dont certains aliquots avaient déjà été décongelés et utilisés pour des tests d'activation des LT, confirmant ainsi que leurs fonctions de CPA étaient opérationnelles. C'est également avec ce lot de cellules décongelées que les tests d'incubation avec la monensine ont été réalisés. Les résultats obtenus lors de ces expériences (**figure 40.C**), effectuées deux fois et sous forme de triplicats biologiques, présentent des tendances opposées. Les résultats de la première expérience (n°1 dans la **figure 40.C**) suggèrent que l'inhibition de NPC1 induit une plus forte activation des LT A05 et G08, à l'inverse de ce qui est connu dans le contexte de CD1d. Les résultats de la seconde expérience (n°2 dans la **figure 40.C**) indiquent, en accord avec ce qui est connu pour CD1d, que l'ajout de concentrations croissantes d'inhibiteur réduit l'activation des clones. Il n'est donc pas possible de conclure sur ces expériences pour le moment.

### 3) Conclusions et perspectives

Les outils validés lors de cette thèse permettraient potentiellement de mettre en lumière l'importance des LTP et des partenaires de CD1b candidats identifiés dans le chapitre 2. En revanche, la mise en évidence d'une action lipase ne pourra pas être effectuée avec les clones et l'AC que nous savons désormais manipuler. Nous n'avons en effet pas révélé d'activité lipase qui permettrait la digestion du Ac<sub>4</sub>SGL en Ac<sub>2</sub>SGL. L'utilisation de clones spécifiques étant la méthode la plus largement utilisée, il aurait été intéressant de valider au sein du laboratoire des clones spécifiques d'autres lipides présents dans l'enveloppe mycobactérienne sous différentes formes acylées. Des clones spécifiques des PIM di-acylés ou des DAT, par exemple, nous auraient permis de pulser les CPA avec des PIMAc<sub>4</sub> ou avec du TAT et PAT, afin de voir si des lipases cellulaires permettent la formation de lipides avec deux chaînes d'acides gras, présentés par CD1b et reconnus par les clones.

Nous avons donc choisi de nous concentrer sur les LTP candidates dans un premier temps, et NPC1 a été notre première cible. Les résultats préliminaires de l'utilisation de l'inhibiteur spécifique U18666A ne permettent cependant pas de conclure sur le rôle, s'il en existe un, de cette protéine sur la présentation de l'Ac<sub>2</sub>SGL ou du GMM par CD1b en surface des CD humaines. L'utilisation de cellules primaires, provenant de donneurs différents, pourrait induire des variabilités dans ces résultats. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, par rapport aux techniques de siRNA ou CRISPR, présente à la fois des

avantages et des inconvénients. Bien que cette méthode soit plus rapide, peu coûteuse et qu'elle évite la manipulation du génome et par conséquent les effets hors-cible, les inconvénients sont également importants. L'inhibition pharmacologique peut également induire des effets hors-cible. De plus, l'action des inhibiteurs est réversible, et il se peut qu'en fonction des cellules et de la manipulation, les effets ne soient donc pas toujours aussi efficaces. Afin de connaître le rôle d'une protéine de manière plus reproductible, en prenant en compte les effets à long terme, il est nécessaire d'effectuer un knockdown ou un knock-out de cette protéine.



## Conclusion générale

La tuberculose, causée par *Mycobacterium tuberculosis*, est la seconde maladie infectieuse la plus mortelle à ce jour, juste derrière le VIH/SIDA. Le vaccin BCG, utilisé depuis des décennies, montre une efficacité insuffisante, surtout chez les adultes, ce qui souligne l'urgence de développer de nouvelles stratégies vaccinales. Les vaccins sont non seulement plus pratiques que les traitements longs et coûteux, mais ils offrent aussi une protection durable à grande échelle, essentielle dans les régions où les infrastructures médicales font défaut. C'est dans cette optique que les lipides présentés par CD1b suscitent un intérêt grandissant pour le développement de vaccins ou d'adjuvants de nouvelle génération, car ils sont capables d'induire une réponse immunitaire spécifique, protectrice et mémoire.

Ma thèse s'inscrit dans ce cadre et explore les mécanismes encore peu étudiés de la voie de présentation de ces lipides, en particulier leur digestion dans le lysosome et leur chargement sur CD1b. À ce jour, seule la maturation des PIM6Ac4 en PIM2Ac2 a été étudiée. Élargir nos connaissances sur ces mécanismes d'apprêtement des lipides antigéniques pourrait conduire à l'identification de nouveaux lipides mycobactériens capables d'activer les LT. L'enrichissement du répertoire d'antigènes lipidiques permettrait ainsi de renforcer l'efficacité des vaccins basés sur ces lipides.

Le but de cette thèse était donc d'identifier des acteurs cellulaires, localisés dans le lysosome, qui pourraient être impliqués dans ces processus. Pour ce faire, la méthode standard consiste à effectuer un criblage à grande échelle (screening), où l'expression de la totalité des protéines lysosomales est inactivée, afin de déterminer quelle inactivation impacte la présentation des lipides par CD1b. Cependant, en accord avec les ressources disponibles, nous avons développé une approche consistant à étudier des fractions enrichies en lysosomes de cellules présentatrices d'antigènes et à analyser leur contenu protéique pour identifier des protéines candidates. Avec cette approche, nous avons identifié 5 protéines candidates, susceptibles d'avoir des rôles de protéines de transfert lipidique ou de lipases. Cette liste de protéines a été enrichie grâce à des études de la littérature concernant la protéomique des lysosomes, menées par d'autres équipes, notamment celle de Muthukottiappan et al. (Muthukottiappan et al. 2021). Cette étude nous a permis d'ajouter 4 autres protéines candidates. Nous avons également ajouté les protéines GM2AP, NPC1 et NPC2, qui sont des LTP décrites dans le contexte de la présentation des lipides par CD1d, ainsi que la prosaposine, protéine précurseur des saposines, impliquées dans la présentation

des lipides par CD1b et CD1d. Nous avons ainsi établi une liste de 13 protéines candidates, présentant des rôles potentiels de lipases ou de protéines de transfert lipidique.

Dans un premier temps, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques sera effectuée lorsqu'un inhibiteur est commercialisé. Cette approche présente cependant des limitations. D'une part, les inhibiteurs ne sont pas spécifiques et peuvent affecter d'autres protéines non ciblées. De plus, il existe peu d'inhibiteurs spécifiques disponibles pour les protéines de notre liste. Dans un second temps, nous procéderons donc à une diminution de l'expression des protéines candidates à l'aide de siRNA, suivie d'une inactivation génétique plus précise via CRISPR/Cas9 pour valider leur rôle dans la présentation lipidique par CD1b.

En parallèle, nous avons également développé une technique de co-IP afin d'identifier les partenaires lysosomaux de CD1b. Le but ici n'étant pas d'identifier des hydrolases, qui interagissent avec le lipide mais peu probablement avec CD1b, mais plutôt des LTP et des protéines nécessaires au transport de CD1b dans et hors des lysosomes. Cette approche a révélé cinq nouvelles protéines candidates qui pourraient être impliquées dans le transport de CD1b ou dans la régulation des lipides disponibles dans le lysosome.

Les protéines candidates identifiées lors de cette thèse représentent une première piste intéressante pour de futures études. Afin de déterminer leur rôle précis, l'impact de l'inactivation de leur expression sera évalué à l'aide d'outils spécifiques aux lipides Ac<sub>2</sub>SGL (un AC recombinant et une lignée lymphocytaire T) et GMM (un clone et une lignée de LT), validés lors de cette thèse dans des conditions où l'expression des protéines candidates n'est pas inactivée dans les cellules présentatrices d'antigènes. Nous privilégions l'utilisation des lymphocytes spécifiques plutôt que des AC, car les résultats obtenus sont plus facilement interprétables et fournissent des informations non seulement sur la présentation de ces lipides à la surface cellulaire, mais aussi sur leur capacité à générer des réponses immunitaires.

Nous avons donc commencé à explorer si NPC1, comme dans le contexte de la présentation des lipides par CD1d chez la souris, joue un rôle dans la présentation du GMM et du Ac<sub>2</sub>SGL, en utilisant un inhibiteur spécifique (U18666A). Cependant, les expériences menées n'en sont qu'au stade de mise au point, rendant impossible toute conclusion définitive à ce stade.

En résumé, bien que des protéines candidates prometteuses aient été identifiées, d'importantes questions restent ouvertes quant aux mécanismes lysosomaux et aux acteurs cellulaires impliqués dans la présentation des lipides par CD1b. Ces travaux fournissent néanmoins une base pour de futures recherches, qui commenceront par l'inactivation de

l'expression des protéines identifiées.

## **Annexe**

**Article en cours de révision** : Ma contribution pour cet article a porté sur l'obtention et caractérisation des fractions lysosomales (western blot, protéomique, DLS, test d'activité). J'ai également contribué à la digestion *in vitro* des PIM2Ac4 par la fraction lysosomale (résultats des **figures 1 et 2**).

## Processing of microbial glycolipids in lysosome expands the repertoire of TLR2 agonists

Sonia Belkai<sup>1§</sup>, Christophe Carrat<sup>1§</sup>, Emilie Layre<sup>1</sup>, Diane Cala-De Paepe<sup>1</sup>, Landry Blanc<sup>1</sup>, Charlotte Dessaux<sup>1</sup>, Cyrine Chanchabi<sup>1</sup>, Alexandre Stella<sup>1,2</sup>, Odile Burlet-Schiltz<sup>1,2</sup>, Stéphane Canaan<sup>3</sup>, Isabelle Vergne<sup>1</sup>, Jérôme Nigou<sup>1</sup>, Martine Gilleron<sup>1\*</sup>

1 : Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France

2 : Infrastructure nationale de protéomique, ProFI, 205 Rte de Narbonne, 31400, Toulouse, France

3 : CNRS, Aix-Marseille Univ, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM

UMR7255), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM FR3479) Marseille, France.

\*correspondance should be addressed to Martine Gilleron: Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France ; Phone +33 561 175 919, Fax +33 561 175 994, E- mail: [Martine.Gilleron@ipbs.fr](mailto:Martine.Gilleron@ipbs.fr)

<sup>§</sup>Christophe Carrat and Sonia Belkai contributed equally to this work.

Actual address of Charlotte Dessaux: Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

and of Cyrine Chanchabi: Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)-CNRS, Montpellier, France

**Running title:** A mycobacterial glycolipid antigen agonist of TLR2/6

**Funding sources:** This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Actions transverses en appui d'une demande sociétale), La Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20180339208), the European Commission (H2020-PHC-643381). We thank the Integrated Screening Platform (PICT) for providing access to NMR spectrometers which were funded by CNRS, Université Paul Sabatier, Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA), Région Occitanie and European Structural Funds. We acknowledge the METi imaging facility, member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR- 10-INBS-04). This work was also funded in part for proteomics by grants from the Région Occitanie, European funds (FEDER, Fonds Européens de Développement Régional), Toulouse Métropole, and the French ministry of research with the Investment for the Future program dedicated to National Infrastructures in Biology and Health (ProFI, Proteomics French Infrastructure project, ANR-10-INBS-08).

A CC-BY public copyright license has been applied by the authors to the present document and will be applied to all subsequent versions up to the Author Accepted Manuscript arising from this submission, in accordance with the grant's open access conditions.

**Abbreviations:** APC, antigen-presenting cell; CD1, first cluster of differentiation; DLS, dynamiclight scattering; Gro, glycerol; LAM, lipoarabinomannan; LF, lysosomal fraction; LM, lipomannan; LPLA2, lysosomal phospholipase A2; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PRR, pattern recognition receptor; PIM, phosphatidyl-*myo*-inositol mannoside; PLA, phospholipase A; TLR, Toll-like receptor.

Due to the diversity of structures generated from tetra-acylated PIM<sub>2</sub>, we were not able to use the usual nomenclature of PIM<sub>2</sub>, which did not allow to distinguish the different natural and unconventional acyl-forms in a clear and simple way. So, for the sake of clarity, the different PIM<sub>2</sub> acyl-forms are labeled according to the total number of acyl chains of the molecule, with precise structures drawn in Figures. Mtb tetra-acylated PIM<sub>2</sub> and tri-acylated PIM<sub>2</sub> (Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> and Ac<sub>1</sub>PIM<sub>2</sub> in the usual nomenclature) are referred to 4Ac-PIM<sub>2</sub> and 3Ac-PIM<sub>2</sub>, respectively. Synthetic PIM<sub>2</sub> are called 2Pam-PIM<sub>2</sub>, 3Pam-PIM<sub>2</sub> and 4Pam-PIM<sub>2</sub> indicating the presence of two, three and four palmitic acids on the molecule, respectively. 1Ac-Enz, 2Ac-Enz and 3Ac-Enz refer to enzymatically degraded PIM<sub>2</sub> containing one, two and three fatty acids, respectively.

## **Abstract**

Toll-like receptor 2 (TLR2) is a pattern recognition receptor (PRR) that plays a key role in the innate immune detection of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). It recognizes diverse Mtb glycolipids, including a family of phospholipids, namely phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIMs), which exist in different acyl-forms. However, PIMs are also antigens of the adaptive immune system by activating T cells. We discovered that PIMs are processed in the lysosomes of antigen-presenting cells (APCs) in a new antigenic di-acylated form of PIMs, which differs from the native acyl-forms produced by Mtb. This indicates that the repertoire of PIM molecules encountered by immune cells is wider than the acyl-forms naturally present in Mtb cell envelope. Here, we demonstrate that a fraction of lysosomal proteins purified from APC contains lipolytic activities capable of digesting tetra-acylated PIM to generate acyl-

forms not produced by Mtb. Using a panel of lipolytic enzymes purified from various organisms, milligram amount of these unconventional PIM acyl-forms were prepared and structurally characterized. Interestingly, whereas natural Mtb PIM acyl-forms stimulate TLR2 in a TLR1-dependant manner, the activity of an unconventional form of di-acylated PIM requires the heterodimerization of TLR2 with TLR6. Our study identifies for the first time a mycobacterial-derived ligand of TLR2 requiring the cooperation of TLR6 for its recognition and suggests that the processing of microbial lipids in the endosomal pathway extends the repertoire of PAMPs recognized by PRRs and broadens TLR usage.

**Key words :** lysosome, receptor, mycobacterium, CD1b, acylation, glycolipids, lipase, phospholipase, enzymology, proteomics

## **Introduction**

The main role of the immune system is to recognize foreign molecules in the host to signal the presence of an invading infectious microorganism. Conserved molecules of microbes, referred to as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), are initially detected by the innate immune system, which involves a limited number of germline-encoded pattern recognition receptors (PRRs). PAMPs are diverse as nucleic acids, proteins, peptides, glycoconjugates or lipids (1). Toll-like receptors (TLRs) are a family of PRRs that detect a wide range of PAMPs and trigger NF- $\kappa$ B-dependent and IFN regulatory factor (IRF)-dependent signaling pathways. TLR2, TLR9, and possibly TLR4, contribute to the innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the etiological agent of tuberculosis in humans. The best-characterized TLR2 agonists are bacterial lipoproteins and lipopeptides (1). But, the mycobacterial envelope contains additional agonists of this receptor belonging to a family of biosynthetically related lipoglycans, namely phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides

(PIMs) and their multiglycosylated counterparts, lipomannan (LMs) and lipoarabinomannan (LAMs) (2-4). LMs are strong agonists of TLR2, whereas PIMs and LAMs are weaker agonists. Lipoglycans are recognized *via* their conserved lipidic anchor, namely mannosyl-phosphatidylinositol, composed of a *sn*-glycero-3-phospho-(1-D-*myo*inositol) unit glycosylated with two  $\alpha$ -D-Manp units and containing four potential acylation sites (4, 5).

Our previous studies determined that mycobacterial lipoglycans and lipopeptides share the same binding site on TLR2 and that their degree of acylation is a key parameter for their ability to trigger signaling (6). Lipopeptides structure contains a conserved N-terminal cysteine which is acylated mainly by palmitoyl chains. In general, lipoproteins from Gram-negative bacteria and mycobacteria have three acyl chains, two of which esterify a *S*-glyceryl backbone on the N-terminal cysteine and the third of which is linked to the amino terminus by an amide bond. In contrast, lipoproteins from Gram-positive bacteria and mycoplasma often lack the amide-linked lipid chain and are therefore only diacylated (4). TLR2 is unique in its ability to form heterodimers with TLR1 or TLR6 to mediate intracellular signaling. Lipoproteins can signal through TLR2 in a TLR1 or TLR6-dependant manner, depending on their acylation state. Structure-function relationship studies have established that the acylated cysteinyl moiety is the structure recognized by the receptors and that triacylated lipoproteins are preferentially recognized by the TLR2/1 heterodimer, whereas diacylated lipoproteins are recognized by the TLR2/6 heterodimer (7). Crystal structure of TLR2/1 or TLR2/6 heterodimers in complex with synthetic tri- or diacylated lipopeptides corroborated these studies and allowed these interactions to be defined at the atomic level (8, 9). Regarding Mtb lipoglycans, only tri- and tetra-acylated LMs, bearing two fatty acids on glycerol (Gro), induce TLR2 signaling and require heterodimerization of TLR2 with TLR1. Unlike lipoproteins, di-acylated LMs, while having two acyl chains on Gro, do not activate TLR2 even in the presence of TLR6 (2).

In addition to being PAMPs, Mtb lipoglycans are T cell antigens presented by CD1b molecules (10-12). They undergo processing in lysosomes of antigen-presenting cells (APCs) (11).

Interestingly, we previously discovered that an unconventional di-acylated form, i.e. not naturally found in the Mtb envelope, is generated during the processing of PIMs (13). This indicates that the repertoire of PIM molecules encountered by immune cells is not restricted to the acyl-forms produced by bacteria, raising the question of whether the PIM acyl-forms generated in the APC during infection are TLR2 agonists.

Here, we evidenced that a fraction of lysosomal proteins purified from human promyelocytic THP-1 cells contains lipolytic activities generating acyl-forms of phosphatidyl-*myo*-inositol di-mannosides (PIM<sub>2</sub>) not produced by Mtb. Using a panel of lipolytic enzymes purified from various organisms, we generated sufficient amount of these unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms to perform biological assays and found that several of them are indeed TLR2 agonists. Interestingly, the unconventional di-acylated form of PIM<sub>2</sub> required heterodimerization of TLR2 with TLR6 for activity. Altogether, our data suggest that microbial lipid processing in the endosomal pathway expands the repertoire of PAMPs recognized by PRRs.

## **Material and methods**

### ***Cell culture***

THP-1 cells were grown in suspension at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> air atmosphere in RPMI-1640 supplemented with L-glutamine, completed with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and antibiotics (penicillin 10 000 units/mL and streptomycin 10 000 µg/mL) (Gibco by Life Technologies).

### ***Preparation of a lysosomal fraction from THP1 cells by differential centrifugations***

A pellet of around 100 million cells was resuspended in 1mL homogenization buffer (250mM sucrose, 0.5mM EGTA, 3mM Imidazole) with protease inhibitor cocktail (Sigma), then lysed by about 30 Dounce strokes at 4°C. The lysate was centrifuged for 10min at 800g to remove nuclei and unlysed cells in the pellet, noted P1. The supernatant was ultracentrifuged (Optima MAX-130K Ultracentrifuge, Beckman-Coulter) at 21000g for 2min. The resulting pellet, P2,

contains mostly mitochondria. The supernatant was then ultracentrifuged at 86,000g for 8min. The resulting pellet, called P3 contains mostly lysosomes. This pellet was washed once with 1mL homogenization buffer and centrifuged again at 86,000g for 8 min. P3 was resuspended in 200 $\mu$ L of acidic pH buffer (20mM sodium acetate, pH 4,5) and the lysosomes were lysed by 20-second freeze/thaw cycles.

#### ***Western-Blot using the lysosomal marker antibodies***

Ten microgram of each fraction collected during lysosomal enrichment were loaded on a 13% acrylamide SDS-PAGE gel. After migration, the proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose membrane (Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad). The membrane was first saturated with 3% milk in TBS-T, 0.01% tween-20, pH 7.4, then incubated for 2h with primary antibodies, i.e. recombinant anti-LAMP1 (F46325, NSJ bioreagents), anti Timm23 (15946974, Thermofisher), anti-Lamin B1 (ab229025, Abcam) and anti-LPLA2 (gift from Pr Shayman JA) antibodies in 1.5% milk in TBS-T, 0.01% tween- 20, pH 7.4. Finally, the membrane was incubated for 2h at room temperature with an anti-rabbit IgG HRP conjugated (Invitrogen 32460) or an anti-mouse IgG HRP conjugated (Invitrogen, 32430). The revelation was done with the Cytiva Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent and using a Bio-Rad Chemidoc imaging system.

#### ***Dynamic Light Scattering (DLS)***

The size of the resulting particles inside the lysosomal fraction was analyzed by DLS using a DynaPro Titan instrument (Wyatt Analytical Technologies, Santa Barbara, CA, USA), yielding an estimated average diameter of 300 nm. LF was kept at 4°C before performing analysis (10 acquisitions of 5s at 25°C).

#### ***$\beta$ -hexosaminidase activity assay***

One microgram of protein from each fraction was mixed with 80 $\mu$ L of the  $\beta$ -hexosaminidase substrate, i.e. 7.5mM 4-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (Sigma) diluted in 100mM Citrate-phosphate buffer at pH 4.7. After 30 mins of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 180 $\mu$ L of 200 mM borate buffer at pH 9.8. The 4-nitrophenol product was measured by reading OD

at 405 nm (CLARIOstar Plus Microplate Reader, BMG labtech).

### ***Transmission electron microscopy***

The lysosomal pellet (P3, in PBS) was prepared for electron microscopy using the conventional negative staining procedure. For the analysis, 5 $\mu$ L of solution was absorbed on formvar-carbon coated grids for 2min. Grids were blotted and negatively stained with uranyl acetate (2%) for 1 min. Grids were examined with a TEM (Jeol JEM- 1400, JEOL Inc, Peabody, MA, USA) at 80 kV. Images were acquired using a digital camera (Gatan Orius, Gatan Inc, Pleasanton, CA, USA) at different magnifications.

### ***In vitro digestion assays of PIMs***

#### ***With LF***

Synthetic tetra-palmitoylated PIM<sub>2</sub> (4Pam-PIM<sub>2</sub>) (100 $\mu$ g) was dried under nitrogen flux in 2mL glass vial and solubilized in 10 $\mu$ L DMSO by vortex and heating. 50 $\mu$ L of the LF and 300 $\mu$ L of acidic pH buffer (20mM sodium acetate, pH 4,5) were added and the mix was incubated under agitation at 37°C for two to five days. Lipids were extracted twice using 400 $\mu$ L of butanol-1. The upper organic phase containing PIM derivatives was dried under nitrogen flux and suspended in 100 $\mu$ L of chloroform-methanol-water (60:35:8, v/v/v) to be analyzed by MALDI MS.

#### ***With a panel of lipolytic enzymes***

The various lipolytic enzymes used in this study were from bacteria, fungus, mycobacteriophage, mammalian and plants and provided by several groups (**Tables 1 and S1**). The activities described for each enzyme are indicated in the second column of the **Table 1**. All enzymatic assays were performed overnight at 37°C under agitation in a total volume of 200 $\mu$ L. For this purpose, PIM<sub>2</sub> (100 $\mu$ g) were hydrated during 30 min with 50 $\mu$ L of the appropriate hydrolysis buffer and pH (**Table S1**) and sonicated. Then the enzymes described above were added to the mixture (the quantity for each one is listed in last column **Table S1**) and incubated overnight.

Remaining PIM<sub>2</sub> and product released by the lipolytic enzymes hydrolysis were extracted by Folch method and dried. Finally, products were solubilized in 30µL of chloroform/methanol/water 60:35:8 (by vol.) for MALDI-Tof-MS analysis.

### ***Purification of Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> digestion products***

Conditions of enzymatic assay using *F. solani* cutinase, *T. lanuginosus* lipase and mycobacteriophage Ms6 LysB lipase have been optimized to obtain complete digestion. Final assays were realized on Mtb 4Ac-PIM<sub>2</sub> (3 mg) for 3 days at 37°C in buffer detailed in **Table S1** under agitation in a final volume of 2mL. The digestion products of *F. solani pisi* cutinase were lyophilized and resuspended in chloroform (200 µL) and purified using a Sep-Pak® silica cartridge (Waters). Di- acylated cutinase products were eluted using chloroform/methanol/water, 60:35:8 (by vol.). The lyophilized *T. lanuginosus* lipase and Ms6 LysB lipase digestion products were resuspended in 0.1M ammonium acetate (500µL) and purified using a Sep-Pak® C8 reverse phase cartridge (Waters). Mono-, di- and tri-acylated hydrolysis products were eluted using methanol/water 7:3 (by vol.), 8:2 (by vol.) and 9:1 (by vol.), respectively.

### ***MALDI-Tof MS***

Acquisition of the MS spectra was performed in negative and positive mode in reflectron mode on an AbSciex ToF / ToF 5800. Ionization was achieved by irradiation with an Nd:YAG laser (349 nm) operating with a pulse rate of 400 Hz. The laser intensity was set at 2000 and continuous stage motion was used with a velocity of 600µm/sec. Typically, spectra from 2000 to 5000 laser shots were summed to obtain the final spectrum. 2,5-dihydroxybenzoic acid (Sigma) or 2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA) were used as matrix at a concentration of 10mg/mL in ethanol:water (by vol). Analysis of data was done using the Data Explorer TM software.

### ***NMR analysis***

$^1\text{H}$  1D spectra and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D HMQC NMR experiments were performed at 298K with a cryo- probed Bruker DRX600 spectrometer (Karlsruhe, Germany) using “zg” and “hsqcetgpsisp2.2” sequences. Native molecules were dissolved in  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$  (30/35/8, v:v:v) (Eurisotop, France) and analyzed in 200 x 5 mm UP5 NMR tubes (CortecNet, France). Proton and carbon chemical shifts are expressed in ppm downfield from the signal of external acetone ( $\delta\text{H}$  2.22 and  $\delta\text{C}$  30.89).

### *Sample preparation for label-free proteomics analysis*

For each sample (4 samples of Lysate and 4 samples of LF prepared from THP-1 cells), 50 $\mu\text{g}$  of dried protein extracts were solubilized with 25 $\mu\text{L}$  of 5% SDS. Proteins were submitted to reduction and alkylation of cysteine residues by addition of TCEP and chloroacetamide to a final concentration respectively of 10mM and 40mM. Protein samples were then processed for trypsin digestion on S-trap Micro devices (Protifi) according to manufacturer’s protocol, with the following modifications: precipitation was performed using 245 $\mu\text{L}$  S-Trap buffer, 4 $\mu\text{g}$  trypsin was added per sample for digestion in 25 $\mu\text{L}$  ammonium bicarbonate 50mM pH 7.

### *NanoLC-MS/MS analysis of proteins*

Tryptic peptides were resuspended in 50 $\mu\text{L}$  of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid and analyzed by nano-liquid chromatography (LC) coupled to tandem MS, using an UltiMate 3000 system (NCS-3500RS Nano/Cap System; Thermo Fisher Scientific) coupled to an Orbitrap Q-ExactivePlus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Five micrograms of each sample was loaded on a C18 precolumn (300 $\mu\text{m}$  inner diameter  $\times$  5mm, Thermo Fisher Scientific) in a solvent made of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid, at a flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ . After 5min of desalting, the precolumn was switched online with the analytical C18 column (75 $\mu\text{m}$  inner diameter  $\times$  50cm; in-house packed with Reprosil C18) equilibrated in 95% solvent A (5% acetonitrile, 0.2% formic acid) and 5% solvent B (80% acetonitrile, 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 10%-50% gradient of solvent B over 105min at a flow rate of 300nL/min. The

mass spectrometer was operated in data- dependent acquisition mode with the Xcalibur software. MS survey scans were acquired with a resolution of 70,000 and an AGC target of  $3 \times 10^6$ . The 10 most intense ions were selected for fragmentation by high-energy collision-induced dissociation, and the resulting fragments were analyzed at a resolution of 17,500, using an AGC target of  $1 \times 10^5$  and a maximum fill time of 50ms. Dynamic exclusion was used within 30s to prevent repetitive selection of the same peptide.

#### *Bioinformatics analysis of mass spectrometry raw files*

Raw MS files were processed with the Mascot software (version 2.7.0) for database search and Proline for label-free quantitative analysis (version 2.1.2). Data were searched against Human entries of the UniProtKB protein database release Swiss-Prot 2020\_10, 20,385 entries). Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification, whereas oxidation of methionine was set as variable modifications. Specificity of trypsin/P digestion was set for cleavage after K or R, and two missed trypsin cleavage sites were allowed. The mass tolerance was set to 10 ppm for the precursor and to 20 mmu in tandem MS mode. Minimum peptide length was set to seven amino acids, and identification results were further validated in Proline by the target decoy approach using a reverse database at both aPSM and protein false-discovery rate of 1%. For label-free relative quantification of the proteins across biological replicates and conditions, cross-assignment of peptide ions peaks was enabled inside group with a match time window of 1 min, after alignment of the runs with a tolerance of  $\pm 600$  s.

Median Ratio Fitting computes a matrix of abundance ratios calculated between any two runs from ion abundances for each protein. For each pair-wise ratio, the median of the ion ratios is then calculated and used to represent the protein ratio between these two runs. A least-squares regression is then performed to approximate the relative abundance of the protein in each run in the dataset. This abundance is finally rescaled to the sum of the ion abundances across runs.

A Student paired T-test (two-tailed T-test, equal variances) was then performed on log<sub>2</sub>-transformed values to analyze differences in protein abundance in all biologic group comparisons. Significance level was set at  $p = 0.05$ , and ratios were considered relevant if higher than  $\pm 2$ .

### ***HEK-TLR2 Cell Experiments***

HEK-Blue™ hTLR2 (InvivoGen), derivatives of HEK293 cells that stably express the humanTLR2 genes, along with a NF- $\kappa$ B-inducible reporter system (secreted alkaline phosphatase) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) 4.5 g/l glucose, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin(Sigma) and 100  $\mu$ g/ml zeocin, 200 $\mu$ g/ml hygromycin, 10 $\mu$ g/ml blasticidin, 1 $\mu$ g/ml puromycin and 50 $\mu$ g/ml mofetil (all from InvivoGen). PIM<sub>2</sub> (1nmole/mL), Pam3CSK4 (250ng/mL) and FSL-1 (50ng/mL) (Invivogen, France) were added to 96-well plates. Reporter cells ( $5 \times 10^4$ /well) were stimulated for 18h, after which alkaline phosphatase activity was measured by mixing 20 $\mu$ L of the culture supernatant and 180 $\mu$ L of Quanti-Blue™ (InvivoGen), and reading O.D. at 630nm. Concerning the experiments with antibodies, HEK-TLR2 cells were preincubated for 1h at 37°C, before stimuli addition, with monoclonal anti-TLR2 (clone TL2.5), anti-TLR1 (clone H2G2), anti-TLR6 (clone C5C8) (Invivogen) at 10 $\mu$ g/ml or an IgG1 isotype control (eBioscience).

## **Results**

### ***Lipolytic activities in lysosomes of antigen presenting cells trim tetra-acylated PIM<sub>2</sub>***

We first sought to obtain a lysosomal fraction (LF) from human promyelocytic THP-1 cells, previously shown to express the enzymatic machinery required for glycolipid processing (11, 14, 15). LF was prepared using the differential centrifugation method adapted from Vergne *et al.* (16). A cell homogenate (called “lysate”) obtained by about 30 Dounce strokes was submitted to increasing centrifugation speeds, in order to eliminate unbroken cells and nuclei (P1) as well as bigger organelles such as Golgi and mitochondria (P2), with lysosomes being expected in the final pellet (P3) (**Figure 1A**). Resulting fraction P3 appeared fairly homogeneous, containing vesicles of about 290 nm mean diameter as measured by DLS (**Figure 1B and C**). The efficiency of fractionation was controlled by immunoblotting, using specific cellular protein markers: LAMP-1 and lysosomal phospholipase A2 (LPLA2) for the lysosomes, lamin B1 for the nuclei and TIM-23 for the mitochondria. Although slightly contaminated by nuclei and ER, P3 contained the lysosomes, as reflected by the strong enrichment in both lysosomal markers relatively to cell lysate (L) (**Figure 1D**). Lysosomal membranes were subsequently disrupted by freezing/thawing to release the soluble proteins, including enzymes (the resulting fraction was thereafter referred to as the lysosomal fraction: LF) (**Figure 1A**). The enrichment of lysosomal proteins in LF vs L was investigated by proteomic analysis (**Figure 1E**). A total of 1732 proteins were detected in LF, including 288 (in red) out of the 723 proteins listed in UniProtKB as localized in human lysosomes. Among these 288 proteins, ~2/3 (183) were significantly more abundant in the LF, including several well-known lysosomal proteins, highlighted in yellow, such as LAMP1,  $\beta$ -galactosidase (BGAL),  $\alpha$ -mannosidase (MA2B1) or LPLA2 (PAG15). Finally, we controlled that lysosomal enzymatic activities were preserved by probing  $\beta$ -hexosaminidase activity of LF (**Figure 1F**). Interestingly,  $\beta$ -hexosaminidase activity was not only detected in LF, but increased as compared to the other fractions.

We next assessed if LF contained enzymes capable of degrading mycobacterial glycolipids. LF was tested for its capacity to hydrolyze synthetic tetra-palmitoylated PIM<sub>2</sub> (4Pam-PIM<sub>2</sub>), acylated on both positions of glycerol (Gro), position 6 of Man-1, and position 3 of *myo*Ins (**Figure 2A**). Enzymatic reaction was monitored by MALDI-Tof mass spectrometry (MS) (**Figure 2B**). The

negative MALDI mass spectrum of native 4Pam-PIM<sub>2</sub> exhibits a single peak at  $m/z$  1610.1 assigned to [M-H]<sup>-</sup> ions. After incubation with LF, two additional peaks of lower intensity at  $m/z$  1371.9 and  $m/z$  1133.6 were detected, which matched the calculated  $m/z$  of tri- and di-palmitoylated PIM<sub>2</sub>, respectively. The latter peaks were not present in the mass spectrum recorded after incubation with heat-inactivated LF, indicating that LF contains enzymes that can degrade 4Pam-PIM<sub>2</sub>. To get insight into the structure of the tri-palmitoylated PIM<sub>2</sub> reaction product (tri-palmitoylated PIM<sub>2</sub>-LF), an MS/MS analysis was carried out in positive mode on the corresponding [M-H+2Na]<sup>+</sup> species at  $m/z$  1417.8 (**Figure 2C**). As shown in our previous studies, the majority of fragment ions arise from the cleavage of the phosphodiester bond on both sides, and contain either the P-Gro or the Man<sub>2</sub>Ins-P moieties (17). They are thus diagnostic ions of the presence of fatty acids on the Gro side (ions B) or the osidic side (ions A and A'), allowing to position fatty acids on the four possible sites (**Figure 3**).

MS/MS spectrum was first recorded for the natural tri-acylated PIM<sub>2</sub> ([M-H+2Na]<sup>+</sup> at  $m/z$  1459.9), bearing 1 palmitic acid (C16) on position 6 of Man-1 and 1 C16 and 1 tuberculostearic acid (C19) on Gro (17), showed one fragment ion A at  $m/z$  867.3 assigned to [C<sub>16</sub>[Man<sub>2</sub>-Ins-P]+2Na]<sup>+</sup> and fragment ions B at  $m/z$  437.2 and 479.2 assigned to [C<sub>16</sub> or C<sub>19</sub>[P-Gro]+2Na]<sup>+</sup> (**Figures 2D and 3**). So, in contrast to ions A and A', ions B is characteristic of the loss of one fatty acid on di-acylated molecular species. Thus, only ions corresponding to mono- or di-acylated species are detected whether the native molecule is mono- or di-acylated on the Gro.

Interestingly, MS/MS spectrum of tri-palmitoylated PIM<sub>2</sub>-LF (**Figure 2C**), showed two additional ions. Fragment ions A at  $m/z$  1105.6 and A' at  $m/z$  1003.6, assigned to [2C<sub>16</sub>[Man<sub>2</sub>-Ins-P]+2Na]<sup>+</sup> and [2C<sub>16</sub>[Man<sub>2</sub>-Ins]+Na]<sup>+</sup> respectively, proved the presence of two C16 on the osidic moiety

of the molecule. Tri-palmitoylated PIM<sub>2</sub>-LF thus corresponds to a mixture of two molecular species, i) one bearing two fatty acids on Gro and one on Man-1 or *myo*Ins, and ii) a second one with a single fatty acid on the glycerol and two on the other side. Taken together, MS/MS data indicate that THP-1 LF harbors both phospholipase and lipase activities that can remove fatty acids

on the Gro and Man<sub>2</sub>-Ins moieties of PIM<sub>2</sub>, allowing the generation of unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms that are not found naturally in the cell envelope of mycobacteria. However, despite the use of acidic buffer to mimic the lysosome environment, the efficiency of digestion in this *in vitro* assay was weak using LF.

### ***Generation of unconventional acyl-forms of PIM<sub>2</sub>***

Therefore, in order to obtain sufficient quantities of unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms for biological testing, we sought to use purified enzymes having similar activities to lysosomal enzymes able to hydrolyze lipidic substrates. A panel of twenty lipolytic enzymes exhibiting lipase, phospholipase, galactolipase as well as thioesterase activities from various origins (bacterial, fungal, mammalian, and vegetal) (**Table 1**) were tested for their ability to hydrolyze purified Mtb tetra-acylated PIM<sub>2</sub> (4Ac-PIM<sub>2</sub>) (**Figure 4A**) (18). Thin-layer chromatography analysis of the reaction products revealed that seven enzymes (the mycobacteriophage Ms6 LysB and the fungal lipases of *Thermomyceslanuginosa*, *Fusarium solani pisi*, *Candida Antarctica* (CALB), *Mucor javanicus*, *Rhizomucor miehei* and *Aspergillus oryzae*) generated products more polar than 4Ac-PIM<sub>2</sub>, assumed to correspond to deacylated products of 4Ac-PIM<sub>2</sub> (**Figure S1**).

Reaction products were further analyzed by negative MALDI-MS. Native Mtb 4Ac-PIM<sub>2</sub> is composed of a mixture of three major species bearing either 3C<sub>16</sub>/1C<sub>19</sub>, 2C<sub>16</sub>/1C<sub>18</sub>,1C<sub>19</sub> or 2C<sub>16</sub>/2C<sub>19</sub> and giving [M-H]<sup>-</sup> ions at *m/z* 1694.2, 1680.2 and 1652.1 respectively (**Figure 4B**) (17, 18). MALDI-MS analysis of the enzymatic products revealed four different digestion profiles, patterns I to IV (**Figure 4C, Table 1**). Pattern I (obtained with the lipases of *C. antarctica* and *R. miehei*) and pattern

II (exclusively generated by the Ms6 LysB) both exhibited a single sub-product. In pattern I, [M-H]<sup>-</sup> ions at *m/z* 1371.8, 1399.9 and 1413.9 indicated the removal of one C<sub>19</sub> from the 4Ac-PIM<sub>2</sub> molecule, while in pattern II, ions at *m/z* 1413.9, 1441.9 and 1455.9 characterized the loss of a C<sub>16</sub>. Pattern III was observed with the *F. solani pisi* cutinase. This MS profile highlighted the sequential removal of two fatty acids, first a C<sub>19</sub> and then a C<sub>16</sub>. Finally, pattern IV, obtained with the lipases of *T.*

*lanuginosa M.*

*javanicus* and *A. oryzae*, was typified by the generation of 3 sub-products, resulting from the successive loss of a C<sub>19</sub>, a first and a second C<sub>16</sub> (**Figure 4C, Table 1**). The fully deacylated PIM<sub>2</sub> form (expected *m/z* 657.2) was never detected, even in the aqueous phase of the partition step performed for PIM extraction from the reaction mixture. These lipases can thus hydrolyze up to three out of the four fatty acids on 4Ac-PIM<sub>2</sub>.

In order to determine the exact positions of the fatty acids present on the digestion products, further structural investigations were performed by MS/MS analyses in the positive mode (**Figure S2**). As indicated above, pattern I is characterized by the exclusive removal of one C<sub>19</sub>, which suggests a

hydrolysis at position *sn*-1 of Gro (**Figure 4A**). This assumption was confirmed by the presence of diagnostic ions A at *m/z* 1105.6 and 1147.6 and A' at *m/z* 1003.6 and 1045.7 (**Table 2, Figures 3 and S2**), which revealed that the two fatty acids remain present on the osidic side of the molecule, and by the fragment ions B at *m/z* 437.2 showing the presence of C<sub>16</sub> on Gro. In pattern II, the exclusive removal

of one C<sub>16</sub> occurred on Man-1 and not at the *sn*-2 position of Gro, since the two fragment ions B at *m/z*

437.2 and 479.2 indicated a Gro acylated with both C<sub>16</sub> and C<sub>19</sub> and fragment ions Ay and Az corresponded to the presence of a single fatty acid (**Table 2, Figures 3 and S2**). This was further confirmed by the ability of LysB to hydrolyze the native Ac<sub>1</sub>PIM<sub>2</sub>, which contains a C<sub>16</sub> on Man-1 (18), but not PIM<sub>2</sub>, which is acylated on Gro only (18) (**Figure S3**). Pattern III corresponds to the hydrolysis

of both fatty acids of the Gro, as proved by the fragment ion B at *m/z* 199.0 typifying a non-acylated Gro and the important fragment ion A' at *m/z* 1003.6, 1031.6 or 1045.7 demonstrating that two fatty acids remain on the osidic moiety (**Table 2**). These results therefore attest to the phospholipase A activity of this enzyme. Characterization of pattern IV indicated that the lipase of *T. lanuginosus* hydrolyzes successively the two fatty acids on Gro and the C<sub>16</sub> on Man-1, ultimately generating a PIM form mono-acylated on *myo*-Ins. This was first strongly suggested

by MS analysis in the negative mode, which showed  $[M-H]^-$  ions corresponding to three different mono-acylated PIM<sub>2</sub> species, with a C<sub>16</sub>, a C<sub>19</sub>, or a C<sub>18</sub> to a lesser extent (**Figures 4C**). MS/MS experiments in the positive mode were carried out on the final products to confirm this hypothesis, and on intermediates to determine the sequence of hydrolyses. The MS/MS spectrum obtained for the tri-acylated intermediate product showed an ion profile similar to that obtained in pattern I (**Figure S2 and Table 2**), confirming the presence of both fatty acids on the osidic moiety and the presence of C<sub>16</sub> in *sn*-2 position of Gro. This demonstrates that the enzyme first removes the C<sub>19</sub> in *sn*-1 position of Gro. Analysis of the di-acylated intermediate showed again the presence of both fatty acids on osidic moiety based on fragment ions A' (**Figure S2 and Table 2**). Expectedly, B ions indicated a deacylated Gro, demonstrating that the second fatty acid hydrolyzed is the C<sub>16</sub> in *sn*-2 position of Gro. Finally, MS/MS spectra of mono-acylated species confirmed the presence of the remaining fatty acid on the osidic moiety. Its precise position on the molecule was deduced to be *myo*-Ins because of fatty acid heterogeneity (**Figures 4A**).

Altogether, digestion of natural Mtb 4Ac-PIM<sub>2</sub> by the various purified enzymes allowed the generation of 4 unconventional acyl-forms of PIM<sub>2</sub>, namely 1Ac-Enz, 2Ac-Enz, 3Ac-Enz and 3Ac-Enz' (**Figure 4C**). It is worth noting that none of the enzymes tested was able to remove the fatty acid on the *myo*Ins.

In order to ascertain their structure by NMR analysis and evaluate their biological activity, we undertook the purification of individual 1Ac-Enz, 2Ac-Enz, 3Ac-Enz and 3Ac-Enz' PIM<sub>2</sub> forms. For this purpose, one enzyme of each pattern was selected and the digestion conditions were optimized on 3 to 5 mg of 4Ac-PIM<sub>2</sub>. Unfortunately, *C. antarctica* lipase A yielding pattern I was not efficient enough to allow purification of sufficient amount of 3Ac-Enz'. Four enzymatic products were successfully purified: 3Ac-Enz generated by Ms6 LysB lipase (Pattern II), 2Ac-Enz generated independently by both cutinase from *F. solani pisi* (Pattern III) and *T. lanuginosus* lipase (Pattern IV) lipases, and 1Ac-Enz generated by *T. lanuginosus* lipase (Pattern IV) (**Figure 4C**). They were subsequently analyzed by 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC NMR (**Figure 5**). All spectra showed a

deshielded *myo*Ins H-3 (at around 4.5 ppm) confirming that all the products were acylated at O-3 of the *myo*Ins. Spectrum of 3Ac-Enz only exhibited signals of Gro H-1 at  $\delta$  3.96/4.16 and Gro H-2 at  $\delta$  5.02 indicative of a di-acylated Gro (**Figure 5A**). Moreover, protons in positions 6 showed the same chemical shifts for both Man-1 and Man-2, further supporting the unique loss of the C<sub>16</sub> on Man-1 unit. The analysis of 2Ac-Enz from pattern III (**Figure 5B**) and pattern IV (**Figure 5C**) concluded to the same structure, with deshielded Man-1 H-6/H-6' (at  $\delta$  4.07/4.15) and shielded G-1/G-1' (at  $\delta$  3.39) and G-2 (at  $\delta$  3.61), indicative of a di-acylated PIM<sub>2</sub> with the fatty acids carried by Man-1 and *myo*Ins units. Spectrum of 1Ac-Enz (**Figure 5D**) confirmed a mono-acylation on position 3 of *myo*Ins, but also indicated a migration of the fatty acid on position 4 of *myo*Ins in a large proportion of the batch.

Altogether, NMR analysis confirmed structures deduced from MS data and milligram range of these three pure and structurally-characterized unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms (namely 1Ac-Enz, 2Ac-Enz and 3Ac-Enz) was available for biological testing (**Figure 5A**).

### ***Activation of TLR2 signaling by unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms***

We previously demonstrated that acylation degree of LM is critical for its TLR2 agonist activity(2). Indeed, tri- and tetra-acylated LMs, bearing two fatty acids on Gro, induce TLR2 signaling and require the heterodimerization of TLR2 with TLR1 while mono- and di-acylated LMs do not activate TLR2 signaling even in the presence of TLR6. We also showed that agonist activity is dependent on the length of mannan backbone, PIM<sub>2</sub> being weaker TLR2 agonists than LM (6).

In order to evaluate the TLR2 agonist activity of the unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms generated and to delineate the role of acylation pattern (number and position of fatty acids), we used HEK cells transfected with human TLR2 and a NF- $\kappa$ B-inducible reporter system (HEK-TLR2 cells). These cells naturally express functional TLR1 and TLR6 (6). We tested the four natural Mtb PIM<sub>2</sub> acyl-forms (**Figure 6A**) as well as the three unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms

(**Figure 6B**). As for LM, only tri- and tetra-acylated PIM<sub>2</sub> activated HEK-TLR2 cells while mono- and di-acylated PIM<sub>2</sub> had very weak or no activity (**Figure 6C**). Regarding unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms, 1Ac-Enz was expectedly inactive. Surprisingly, 2Ac-Enz was the most active acyl-form of all tested, while 3Ac-Enz only showed a weak activity (**Figure 6C**). The requirement of TLR1 or TLR6 for recognition was then determined by antibody blocking experiments (**Figure 6D**). TLR2 activation by natural Mtb tri- and tetra-acylated PIM<sub>2</sub>, as well as by unconventional 3Ac-Enz, was dependent on the heterodimerization of TLR2 with TLR1. However, unexpectedly, TLR2 activation by 2Ac-Enz required heterodimerization with TLR6.

## Discussion

TLR2 is an important receptor for innate immune detection of Mtb. It is thought to play a critical role in defense against infection, although it has been reported to have a dual role in both activation and suppression of immune responses (19-21). TLR2 is instrumental for recognizing lipoproteins and lipopeptides that are ubiquitously produced by bacteria (22, 23). It generally functions as a heterodimer with either TLR1 or TLR6, which are required for binding tri- and di-acylated lipoproteins/lipopeptides respectively (24). Mtb and related species produce additional potent TLR2 agonists at their cell envelope, namely phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIMs) and their multiglycosylated counterpart, lipomannans (LMs). PIMs (3) and LMs (2) stimulate cytokine production by macrophages in a TLR2 and TLR1-dependent fashion. However, the magnitude of the response increases with the length of the oligomannoside chain, LM being stronger agonists than PIM<sub>6</sub>, and PIM<sub>6</sub> than PIM<sub>2</sub> (6). PIMs and LM exist in different acyl-forms that differ by the number of the fatty acids, from one to four, esterifying the molecule (2, 3, 18). Only tri- and tetra-acylated LMs are TLR2 agonists and require the heterodimerization of TLR2 with TLR1, while mono- and di-acylated LMs do not activate TLR2 even in the presence of TLR6 (2). Here, we found that the same applies for the natural Mtb PIM<sub>2</sub> acyl-forms. Only tri- and tetra-acylated PIM<sub>2</sub>, bearing two fatty acids on Gro, induced TLR2 signaling, in a TLR1-dependant fashion. In contrast, mono- and di-acylated PIM<sub>2</sub> had very weak or no activity.

We previously demonstrated that unconventional acyl-forms are generated during the processing of PIMs inside the lysosomes of antigen-presenting cells, yielding T cell epitopes presented by CD1b (13). As it has been established that soluble lysosomal PAMPs can be disseminated by extracellular vesicles issued from the phagolysosome (25) or by a process named eructophagy (26), we wondered whether these unconventional PIM acyl-forms have TLR2 agonist properties. We first thought to generate unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms by incubating tetra-acylated PIM<sub>2</sub> with a fraction of lysosomal proteins purified from THP-1 cells. Indeed, previous studies using radiolabeling showed that cardiolipids or ManLAM can be degraded by incubation with lysosomes purified from macrophages, demonstrating that lysosomal enzymes can modify lipids *in vitro* (27, 28). Accordingly, MALDI-MS analysis indeed evidenced the production of tri-acylated PIM<sub>2</sub> containing two fatty acids on Man2Ins and one on Gro, an acyl-form not found naturally in the Mtb cell envelope. However, due to the weak efficiency of digestion of the LF, we thus resorted to a set of lipases purified from diverse organisms to generate unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms from tetra-acylated PIM<sub>2</sub>.

Most lipolytic enzymes that digested PIM<sub>2</sub> exhibited lipase as well as phospholipase A (PLA) activity. Indeed, lipases from *Candida antarctica* and *Rhizomucor miehei* both showed lipases and PLA1 activity, hydrolyzing tuberculostearic acid esterified at *sn*-1 position of Gro. This result was expected for *R. miehei* lipase, already described as a PLA1, but was surprising for *C. antarctica* lipase, never described as a phospholipase. It should be noted, however, that an enzyme called *Ustilago maydis* lipase2 (Uml2), 66% identical in sequence to CALB, has phospholipase activity (29), which reinforces our result. *Fusarium solani* cutinase cleaved both glycerol-bound fatty acids of 4Ac-PIM<sub>2</sub>, as previously shown (13), despite being described to have a primary activity on the ester bond in position *sn*-1 (30). The mycobacteriophage lipolytic enzyme Ms6-LysB catalyzed the exclusive hydrolysis of palmitic acid carried by Man-1 of tri- and tetra-acylated PIM<sub>2</sub>. This lipase was previously identified as a carboxyl esterase, capable of hydrolyzing the mycolic acids of the mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex and trehalose 6,6'-

dimycolate (TDM), components of the mycobacterial cell wall (31). The gene encoding LysB is located in the Ms6 lytic cassette, downstream of the endolysin gene, suggesting its role in mycobacterial lysis. Thus, it has been proposed that the activity of LysB, combined with that of LysA acting on peptidoglycan (32), leads to more efficient cell wall disruption (31). Our results extend the mycobacterial substrates of this lipase to PIMs, and further support that the carboester bonds of fatty acids carried by saccharides are specifically hydrolyzed. Logically, we therefore analyzed the ability of LysB to hydrolyze the fatty acids on other mycobacterial multi-acylated glycolipids, namely Mtb-specific sulfoglycolipids (33). However, LysB has no action on di- or tetra-acylated sulfoglycolipids (data not shown). Finally, *Thermomyces lanuginose*, *Mucor javanicus* and *Aspergillus oryzae* lipases are the most effective enzymes that degrade tetra-acylated PIMs, ultimately generating mono-acylated PIMs. It thus displays here both PLA and glycosyl-lipase activities, in agreement with the already described broad range of activities of *Thermomyces lanuginose* lipase (34). *M. javanicus* lipase has also been shown to have phospholipase A1 activity, hydrolyzing the carboxyl ester in position 1 of phosphatidylcholine, in addition to its specificity towards positions 1 and 3 of triacylglycerol (35). This activity was unexpected for *Aspergillus oryzae* lipase, characterized until now as a triacylglycerollipase only (36).

In general, lipases show very low activity for substrates soluble in aqueous buffer and preferentially act at the lipidic surface of insoluble substrates. Indeed, the active site of most lipases, including those here displaying phospholipase activity on PIMs, is covered by a lid. However in presence of a water-lipid interface, the enzyme is activated by the opening of the lid that allows the interaction between enzyme and its substrate (37). Not surprisingly, the highly hydrophobic tetra-acylated PIM<sub>2</sub> were digested by these enzymes after hydration for 30 min with the appropriate buffer and sonication prior to addition of lipase, without the need to include them in unilamellar vesicles, since micelles had to be created by sonication.

Digestion of tetra-acylated PIM<sub>2</sub> by the various lipases yielded three unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms, containing three (3Ac-Enz), two (2Ac-Enz) or one (1Ac-Enz) acyl chains (**Figure 6**), in

sufficient amount for testing TLR2 agonist activity. As expected, 1Ac-Enz was inactive. 3Ac-Enz was a weaker TLR2 agonist than the natural 3Ac-PIM<sub>2</sub>, but as the latter required heterodimerization with TLR1. Surprisingly, 2Ac-Enz, previously found to be generated in lysosomes of antigen presenting cells (13), was not only active, but the strongest TLR2 agonist among all PIM<sub>2</sub> acyl-forms tested. Its activity was dependent on the heterodimerization of TLR2 with TLR6, in agreement with di-acylated lipopeptides being recognized by the TLR2/6 heterodimer (9, 24, 38). We previously found that the binding site for lipoglycans and lipopeptides is overlapping (6). By analogy of the crystal structure of a TLR1/2 heterodimer in complex with the model tri-acylated lipopeptide Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (8), we can assume that tri-acylated PIM<sub>2</sub> (either natural or unconventional) have both fatty acids on Gro unit inserted in the hydrophobic pocket of TLR2 (4). The third acyl chain esterifying either the Man-1 (natural PIM<sub>2</sub>) or Ins(3Ac-Enz) unit is probably inserted in the hydrophobic channel of TLR1 (4). Regarding di-acylated PIM<sub>2</sub>, it is interesting to note that the presence of both acyl chains on Gro (natural PIM<sub>2</sub>) does not allow heterodimerization of TLR2 with TLR6, while the latter can occur when the two acyl chains are located on *myo*Ins and Man-1 units (2Ac-Enz).

Several studies point to a role of TLR6 in the detection of mycobacteria. TLR6 polymorphisms in humans are associated with TB susceptibility (39-41). TLR6 also appears to be an important biomarker for the identification of mycobacteriosis, as it could serve in the discrimination between active TB and latent infection (42, 43). TLR6 deficiency leads to a decreased control of *Mycobacterium avium* infection both in mice and in macrophages (44). Yet, to date, no mycobacterial ligand of TLR6 had been reported in the literature. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 is thought to have evolved to broaden the ligand spectrum, enabling the innate immune system to recognize the many

different structures present in various pathogens (45). Our data suggest that processing of microbial lipids in the endosomal pathway extends the repertoire of these structures beyond those naturally produced by pathogens and broadens TLR usage.

### **Data availability**

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD051087.

All remaining data are contained within the article, or as supplemental.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Dr MingMing Pu (Amherst, Massachusetts, US), Dr Madalena Pimentel(Lisboa, Portugal) and Dr Alain Marty (Toulouse, France) for the kind gift of *Bacillus thuringiensis* PI-PLC, Ms6 LysB and *Yarrowia lipolytica* lipases, respectively. We are grateful to James Shayman and Robert Kelly (Ann Arbor, Michigan, US) for providing anti-LPLA2 antibodies.

### **References**

1. Fitzgerald, K. A., and J. C. Kagan. 2020. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* 180: 1044-1066.
2. Gilleron, M., J. Nigou, D. Nicolle, V. Quesniaux, and G. Puzo. 2006. The acylation state of mycobacterial lipomannans modulates innate immunity response through toll-like receptor 2. *Chem Biol* 13: 39-47.
3. Gilleron, M., V. F. Quesniaux, and G. Puzo. 2003. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response.

J Biol Chem 278: 29880-29889.

4. Ray, A., M. Cot, G. Puzo, M. Gilleron, and J. Nigou. 2013. Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie* 95: 33-42.
5. Gilleron, M., M. Jackson, J. Nigou, and G. Puzo. 2008. Structure, biosynthesis and activities of the Phosphatidyl-myo-Inositol-based lipoglycans. In *The mycobacterial cell envelope*. D. M. a. R. J. M., editor. ASM Press, Washington DC. 75-105.
6. Nigou, J., T. Vasselon, A. Ray, P. Constant, M. Gilleron, G. S. Besra, I. Sutcliffe, G. Tiraby, and G. Puzo. 2008. Mannan chain length controls lipoglycans signaling via and binding to TLR2. *J Immunol* 180: 6696-6702.
7. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169: 10-14.
8. Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee, and J. O. Lee. 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130: 1071-1082.
9. Kang, J. Y., X. Nan, M. S. Jin, S. J. Youn, Y. H. Ryu, S. Mah, S. H. Han, H. Lee, S. G. Paik, and J. O. Lee. 2009. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31: 873-884.

10. Sieling, P. A., D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, M. B. Brenner, M. Kronenberg, P. J. Brennan, and et al. 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269: 227-230.
11. de la Salle, H., S. Mariotti, C. Angenieux, M. Gilleron, L. F. Garcia-Alles, D. Malm, T. Berg, S. Paoletti, B. Maitre, L. Mourey, J. Salamero, J. P. Cazenave, D. Hanau, L. Mori, G. Puzo, and G. De Libero. 2005. Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e. *Science* 310: 1321-1324.
12. Torrelles, J. B., P. A. Sieling, J. Arcos, R. Knaup, C. Bartling, M. V. S. Rajaram, S. Stenger, R. L. Modlin, and L. S. Schlesinger. 2011. Structural differences in lipomannans from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria that impact CD1b-restricted T cell responses. *J Biol Chem* 286:35438-35446.
13. Gilleron, M., M. Lepore, E. Layre, D. Cala-De Paepe, N. Mebarek, J. A. Shayman, S. Canaan, L. Mori, F. Carriere, G. Puzo, and G. De Libero. 2016. Lysosomal Lipases PLRP2 and LPLA2 Process Mycobacterial Multi-acylated Lipids and Generate T Cell Stimulatory Antigens. *Cell Chem Biol* 23: 1147-1156.
14. de Jong, A., V. Pena-Cruz, T. Y. Cheng, R. A. Clark, I. Van Rhijn, and D. B. Moody. 2010. CD1a-autoreactive T cells are a normal component of the human alphabeta T cell repertoire. *Nat Immunol* 11: 1102-1109.
15. DeWitt, W. S., K. K. Q. Yu, D. B. Wilburn, A. Sherwood, M. Vignali, C. L. Day, T. J. Scriba, H. S. Robins, W. J. Swanson, R. O. Emerson, P. H. Bradley, and C. Seshadri. 2018. A Diverse LipidAntigen-Specific TCR Repertoire Is Clonally Expanded during Active Tuberculosis. *J Immunol* 201: 888-896.

16. Vergne, I., R. A. Fratti, P. J. Hill, J. Chua, J. Belisle, and V. Deretic. 2004. Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell* 15: 751-760.
17. Gilleron, M., B. Lindner, and G. Puzo. 2006. MS/MS approach for characterization of the fatty acid distribution on mycobacterial phosphatidyl-myo-inositol mannosides. *Anal Chem* 78: 8543-8548.
18. Gilleron, M., C. Ronet, M. Mempel, B. Monsarrat, G. Gachelin, and G. Puzo. 2001. Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells. *J Biol Chem* 276: 34896-34904.
19. Harding, C. V., and W. H. Boom. 2010. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol* 8: 296-307.
20. Gopalakrishnan, A., and P. Salgame. 2016. Toll-like receptor 2 in host defense against *Mycobacterium tuberculosis*: to be or not to be-that is the question. *Curr Opin Immunol* 42: 76- 82.
21. Mortaz, E., I. M. Adcock, P. Tabarsi, M. R. Masjedi, D. Mansouri, A. A. Velayati, J. L. Casanova, and P. J. Barnes. 2015. Interaction of Pattern Recognition Receptors with *Mycobacterium Tuberculosis*. *J Clin Immunol* 35: 1-10.
22. Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732-736.

23. Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285: 736-739.
24. Jin, M. S., and J. O. Lee. 2008. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29: 182-191.
25. Layre, E. 2020. Trafficking of Mycobacterium tuberculosis Envelope Components and Release Within Extracellular Vesicles: Host-Pathogen Interactions Beyond the Wall. *Front Immunol* 11: 1230.
26. Greene, C. J., J. A. Nguyen, S. M. Cheung, C. R. Arnold, D. R. Balce, Y. T. Wang, A. Soderholm, N. McKenna, D. Aggarwal, R. I. Campden, B. W. Ewanchuk, H. W. Virgin, and R. M. Yates. 2022. Macrophages disseminate pathogen associated molecular patterns through the direct extracellular release of the soluble content of their phagolysosomes. *Nat Commun* 13: 3072.
27. Fischer, K., D. Chatterjee, J. Torrelles, P. J. Brennan, S. H. Kaufmann, and U. E. Schaible. 2001. Mycobacterial lysocardiolipin is exported from phagosomes upon cleavage of cardiolipin by a macrophage-derived lysosomal phospholipase A2. *J Immunol* 167: 2187-2192.
28. Torrelles, J. B., and L. S. Schlesinger. 2010. Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis (Edinb)* 90: 84-93.
29. Buerth, C., F. Kovacic, J. Stock, M. Terfruchte, S. Wilhelm, K. E. Jaeger, M. Feldbrugge, K. Schipper, J. F. Ernst, and D. Tielker. 2014. Uml2 is a novel CalB-type lipase of Ustilago maydis with phospholipase A activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 4963-4973.

30. Schue, M., D. Maurin, R. Dhouib, J. C. Bakala N'Goma, V. Delorme, G. Lambeau, F. Carriere, and S. Canaan. 2010. Two cutinase-like proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis* show very different lipolytic activities reflecting their physiological function. *FASEB J* 24: 1893-1903.
31. Gil, F., A. E. Grzegorzewicz, M. J. Catalao, J. Vital, M. R. McNeil, and M. Pimentel. 2010.  
  
*Mycobacteriophage Ms6 LysB specifically targets the outer membrane of Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 156: 1497-1504.
32. Catalao, M. J., C. Milho, F. Gil, J. Moniz-Pereira, and M. Pimentel. 2011. A second endolysin gene is fully embedded in-frame with the *lysA* gene of mycobacteriophage Ms6. *PLoS One* 6: e20515.
33. Layre, E., D. C. Paepe, G. Larrouy-Maumus, J. Vaubourgeix, S. Mundayoor, B. Lindner, G. Puzo, and M. Gilleron. 2011. Deciphering sulfoglycolipids of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Lipid Res* 52: 1098-1110.
34. Amara, S., D. Lafont, G. Parsiegla, V. Point, A. Chabannes, A. Rousset, and F. Carriere. 2013.  
  
The galactolipase activity of some microbial lipases and pancreatic enzymes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115: 442-451.
35. Ishihara, H., H. Okuyama, H. Ikezawa, and S. Tejima. 1975. Studies on lipase from *Mucor javanicus*. I. Purification and properties. *Biochim Biophys Acta* 388: 413-422.
36. Toida, J., M. Fukuzawa, G. Kobayashi, K. Ito, and J. Sekiguchi. 2000. Cloning and sequencing of the triacylglycerol lipase gene of *Aspergillus oryzae* and its expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 189: 159-164.

37. Khan, F. I., D. Lan, R. Durrani, W. Huan, Z. Zhao, and Y. Wang. 2017. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Front Bioeng Biotechnol* 5: 16.
38. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933-940.
39. Ma, X., Y. Liu, B. B. Gowen, E. A. Graviss, A. G. Clark, and J. M. Musser. 2007. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One* 2: e1318.
40. Noreen, M., and M. Arshad. 2015. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunol Res* 62: 234-252.
41. Shey, M. S., A. K. Randhawa, M. Bowmaker, E. Smith, T. J. Scriba, M. de Kock, H. Mahomed, G. Hussey, T. R. Hawn, and W. A. Hanekom. 2010. Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide- and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion. *Genes Immun* 11: 561-572.
42. Lu, C., J. Wu, H. Wang, S. Wang, N. Diao, F. Wang, Y. Gao, J. Chen, L. Shao, X. Weng, Y. Zhang, and W. Zhang. 2011. Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 6: e24290.
43. Plain, K. M., A. C. Purdie, D. J. Begg, K. de Silva, and R. J. Whittington. 2010. Toll-like receptor(TLR)6 and TLR1 differentiation in gene expression studies of Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 137: 142-148.

44. Marinho, F. A., R. R. de Paula, A. C. Mendes, L. A. de Almeida, M. T. Gomes, N. B. Carvalho, F. S. Oliveira, M. V. Caliari, and S. C. Oliveira. 2013. Toll-like receptor 6 senses *Mycobacterium avium* and is required for efficient control of mycobacterial infection. *Eur J Immunol* 43: 2373- 2385.
45. Farhat, K., S. Riekenberg, H. Heine, J. Debarry, R. Lang, J. Mages, U. Buwitt-Beckmann, K. Roschmann, G. Jung, K. H. Wiesmuller, and A. J. Ulmer. 2008. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* 83: 692-701.

## Tables

**Table 1:** Library of twenty lipolytic enzymes tested for their capacity to hydrolyze Mtb tetra-acylated PIM<sub>2</sub>.

**Table 2:** Fragment ions obtained by MS/MS experiments in positive ion-mode of selected [M- H+2Na]<sup>+</sup> ions. Report to Figure 3 for fragment ions explanations and R1 to R3 fatty acid positions.

**Table 3:** Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C assignment from Mtb 4Ac-PIM<sub>2</sub> and the different purified products of hydrolysis by Lys-B (pattern II), *F. solani pisi* (pattern III) and *T. lanuginosa* (pattern III and IV). Man-1, Man-2, Gro and *myo*-Ins as depicted in Figure 4A.

## Figure legends

### **Figure 1: Preparation of an enzymatically active lysosomal fraction (LF) from THP-1 cells.**

(A) Protocol used to purify a lysosomal fraction (LF). The pellet 3 (P3) which contained the lysosomes was characterized by DLS (B) and transmission electron microscopy (C). The efficiency of fractionation was controlled by immunoblotting (D), using specific cellular protein markers: Lamp-1 and lysosomal phospholipase A2 (LPLA2) for the lysosomes, lamin B1 for the nuclei and Tim-23 for the mitochondria and the enrichment of lysosomal proteins in LF vs L was investigated by proteomic analysis (E). The volcano plot of log significance (paired T-tests) versus log<sub>2</sub> paired ratio of LF/Lysate protein abundance is shown. Proteins marked in red are proteins tagged as “lysosomal” in Human by UniprotKB. Some representative lysosomal proteins are shown in yellow, including Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1 and LAMP-2),  $\beta$ -galactosidase (BGAL), Lysosomal alpha-mannosidase (MA2B1), beta-hexosaminidase (HEXA), Cathepsin D (CATD), Niemann-Pick disease, type C1 (NPC1), Prosaposin (SAP), Phospholipase A2 group XV (PAG15). Grey dots represent proteins with p-value above 0.05. In short, 723 proteins are tagged « lysosomal » in humans by UniprotKB of which 288 were found in the proteomic analysis: 79 proteins had p-values above 0.05, 26 proteins were significantly more abundant in lysate and 183 were significantly enriched in LF. (F)  $\beta$ -hexosaminidase assay using the THP1 cell lysate (L), pellets 1 and 2 (P1 and P2) and LF was realized to test the functional integrity of the fractions. \*\* P<0.01 and \* P<0.05 by T-test.

The results presented here are representative of several independent preparations.

### **Figure 2: Degradation of tetra-palmitoylated PIM<sub>2</sub> by incubation with THP-1 lysosomal fraction**

(A) Structure of synthetic tetra-palmitoylated PIM<sub>2</sub> (4Pam-PIM<sub>2</sub>). (B) MALDI-MS spectra

in negative mode of 4Pam-PIM<sub>2</sub> before or after incubation with LF or heat-treated LF, evidencing the capacity of LF to degrade 4Pam-PIM<sub>2</sub> into tri-palmitoylated PIM<sub>2</sub> (3Pam-PIM<sub>2</sub>). (C) 3Pam-PIM<sub>2</sub> reaction product (3Pam-PIM<sub>2</sub> LF) was further characterized by MALDI-MS/MS analysis in positive mode and fragmentation of the corresponding [M+2Na]<sup>+</sup> ion at m/z 1417.8. The origin of fragments ions(A, A' and B) is explained in Figure 3. (D) Positive MALDI MS/MS spectrum of Mtb 3Ac-PIM<sub>2</sub> (acylated with 2C16/1C19) [M+2Na]<sup>+</sup> molecular ions at m/z 1459.9.

**Figure 3: Fragmentation scheme of Mtb tetra-acylated PIM<sub>2</sub> as [M-H+2Na]<sup>+</sup> ions in positiveMALDI MS/MS.**

Fragments A, A', Ay, Az, A'z and B and their calculated m/z according to their composition in fatty acids are presented. R1 to R4 represent the four fatty acids of 4Ac-PIM<sub>2</sub> (17).

**Figure 4: Patterns of enzymatic degradation of Mtb tetra-acylated PIM<sub>2</sub> by fungal and bacterial lipases.**

Lipases of various origins were tested for their ability to hydrolyze purified Mtb tetra-acylated PIM<sub>2</sub>, 4Ac-PIM<sub>2</sub>. (A) The structure of this molecule is shown with the fatty acids esterifying each position indicated. (B) MALDI mass spectrum in negative-ion mode indicates a mixture of the three major acyl-forms depicted here. (C) Negative-ion mode MALDI-MS analysis of the enzymatic reactionproducts revealed four different patterns: pattern I generated by *Candida Antarctica* and *Rhizomucor miehei* lipases, pattern II by the mycobacteriophage Ms6 LysB, pattern III by *Fusarium solani pisi* lipaseand pattern IV by the lipases of *Mucor javanicus*, *Aspergillus oryzae* and *Thermomyces lanuginosa*. Ions labeled in bold/italic were subjected to subsequent MS/MS analysis (see **Table 3**). Reaction products circled were purified and analyzed by <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC NMR (**Figure 5**). Asterisks (\*) correspond to contaminants.

**Figure 5: 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC NMR analysis of enzymatic reaction products.**

Four products of lipase degradation were characterized by 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC NMR. Spectra are shown for the tri-acylated PIM<sub>2</sub> of pattern II obtained by digestion with Ms6 LysB lipase (**A**), the two di-acylated PIM<sub>2</sub> of patterns III and IV generated independently by both cutinase from *F. solani pisi* lipase (**B**) and *T. lanuginosus* lipase (**C**) and the mono-acylated PIM<sub>2</sub> of pattern IV obtained by digestion with *T. lanuginosus* lipase (**D**). Signals annotated « Ins » correspond to *myo*-inositol protons, those with the letter « G » correspond to glycerol protons, and those with the number « I » or « II » correspond to protons of Man-1 and Man-2, respectively (as depicted in **figure 4A**). The encircled cross-peaks delineate important deshielded correlations highlighting the presence of fatty acids of the corresponding positions.

**Figure 6: TLR dependence of HEK TLR2 cell activation by natural and unconventional PIM<sub>2</sub> acyl-forms.**

Structures of the four natural Mtb (**A**) and five unconventional (**B**) PIM<sub>2</sub> acyl-forms are shown. (**C**, **D**) NF-κB activation in HEK-TLR2 cells by different acyl-forms. For those showing an activity in (**C**), TLR1-, 2- and 6-dependance was tested using blocking antibodies (**D**). Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> and FSL-1 were used as controls of TLR2/1 and TLR2/6 agonists, respectively (**D**). Data are representative of three (**C**) and two (**D**) independent experiments. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed using ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test have been performed with GraphPad Prism to assess statistical significance. \*\*\*\* P<0.0001, \*\*\* P<0.001, \*\* P<0.01 and ns P>0.05

This article contains supplemental data.

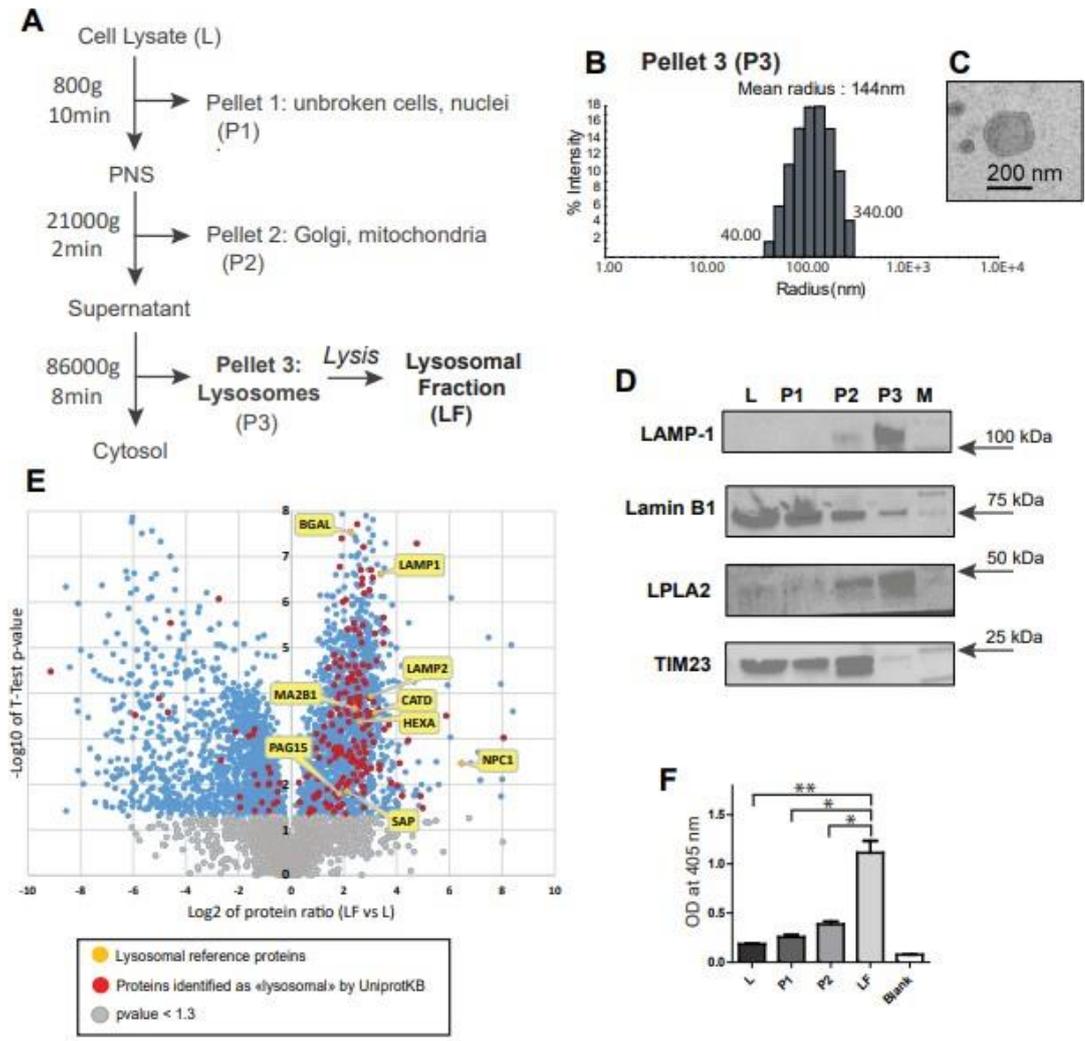


Figure 1

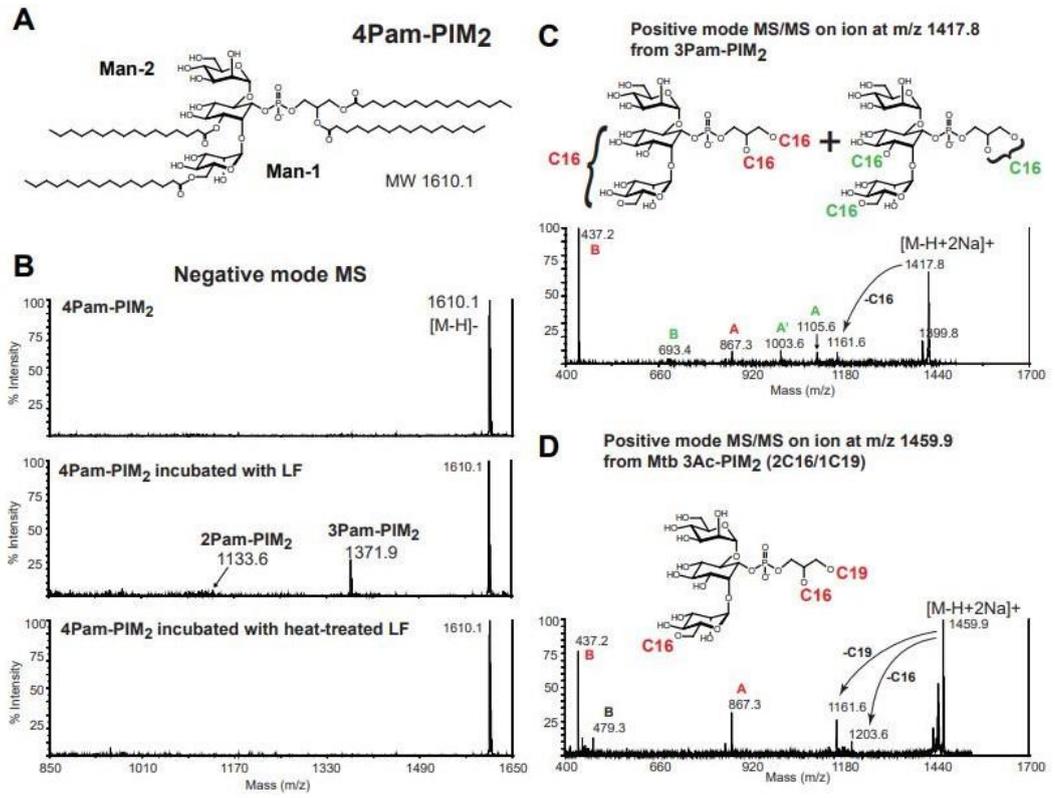


Figure 2

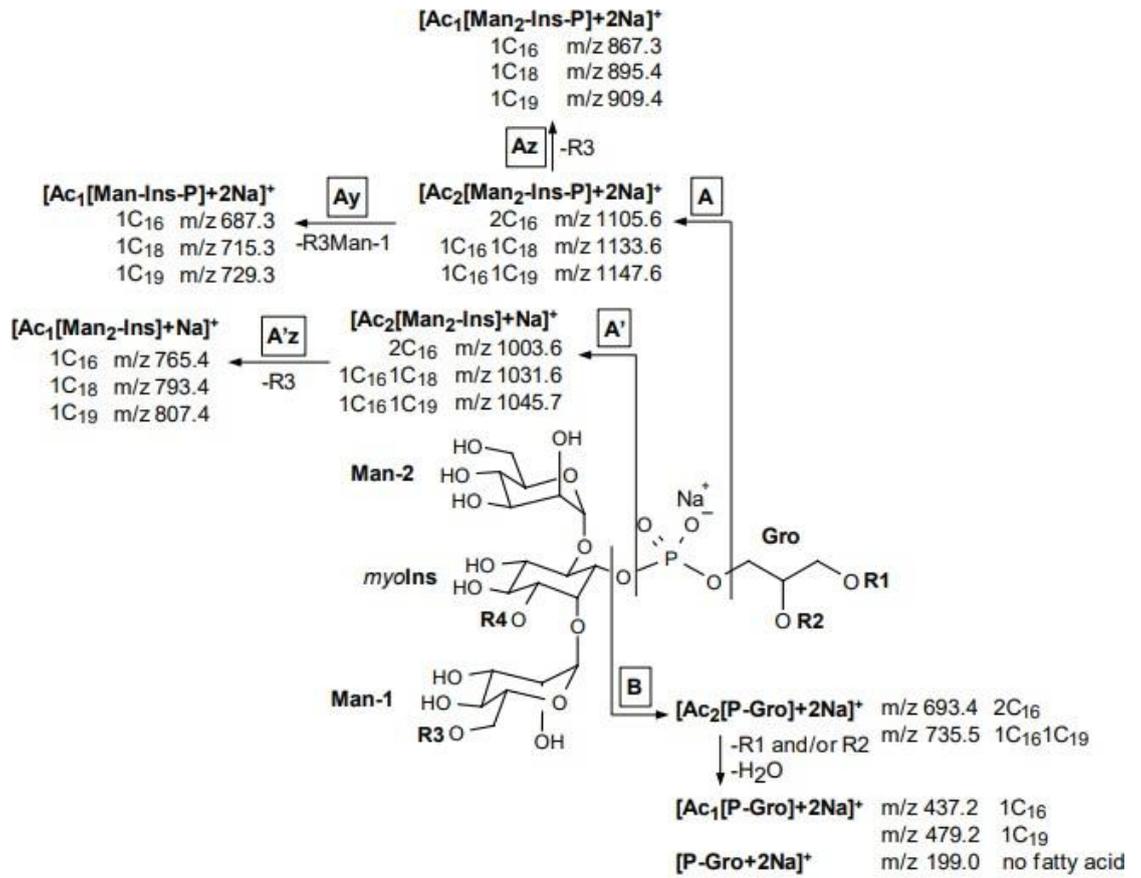


Figure 3

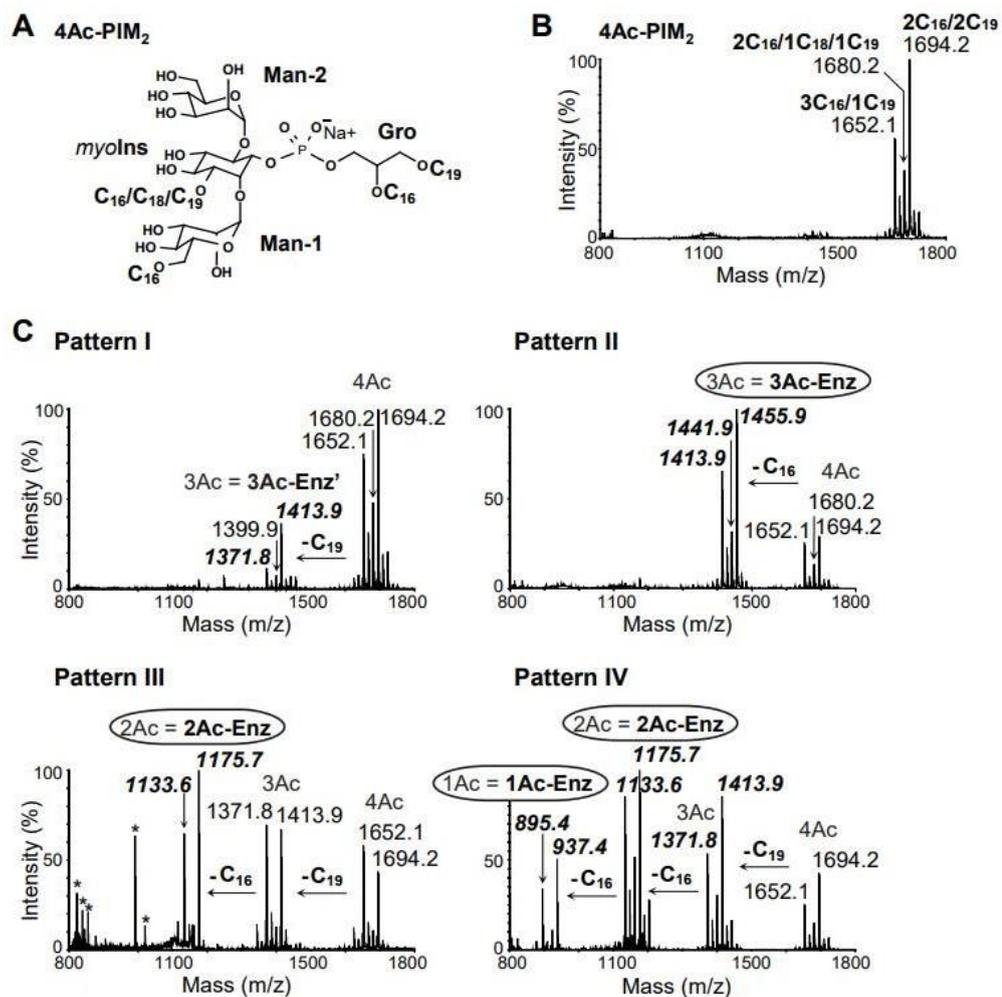


Figure 4

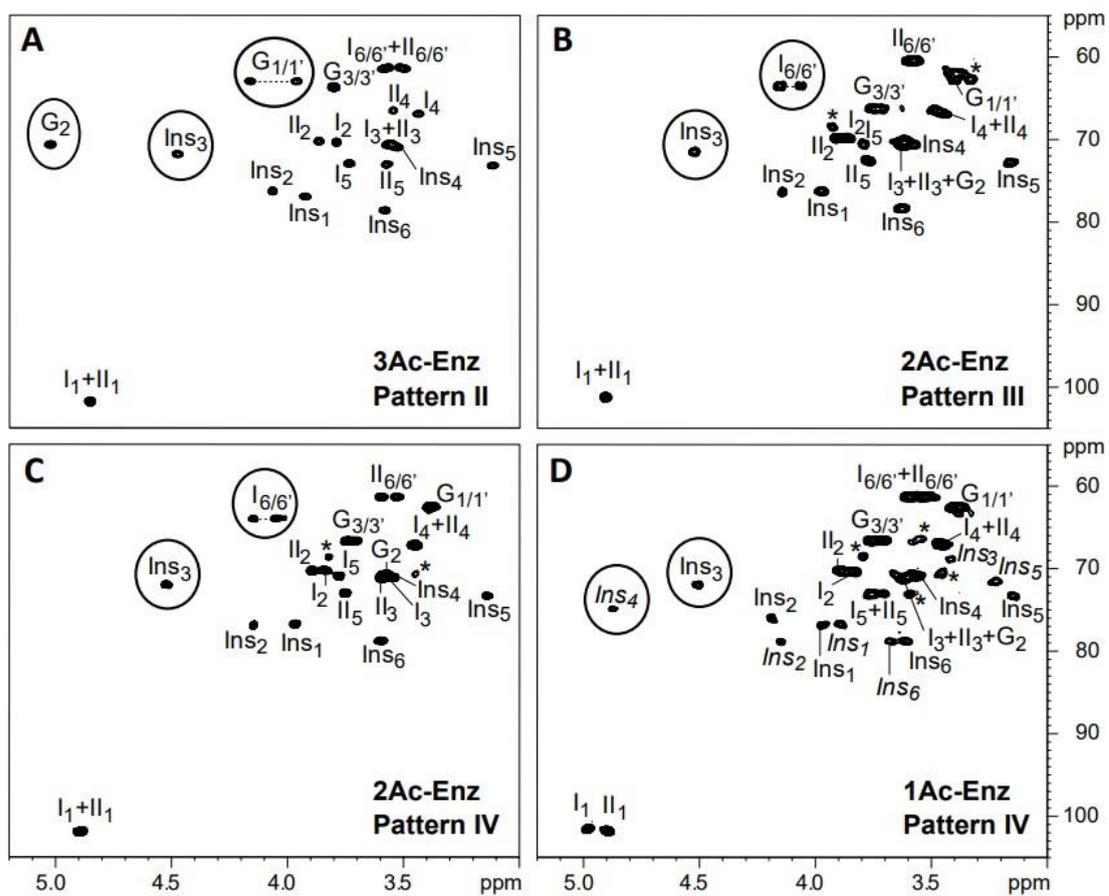


Figure 5

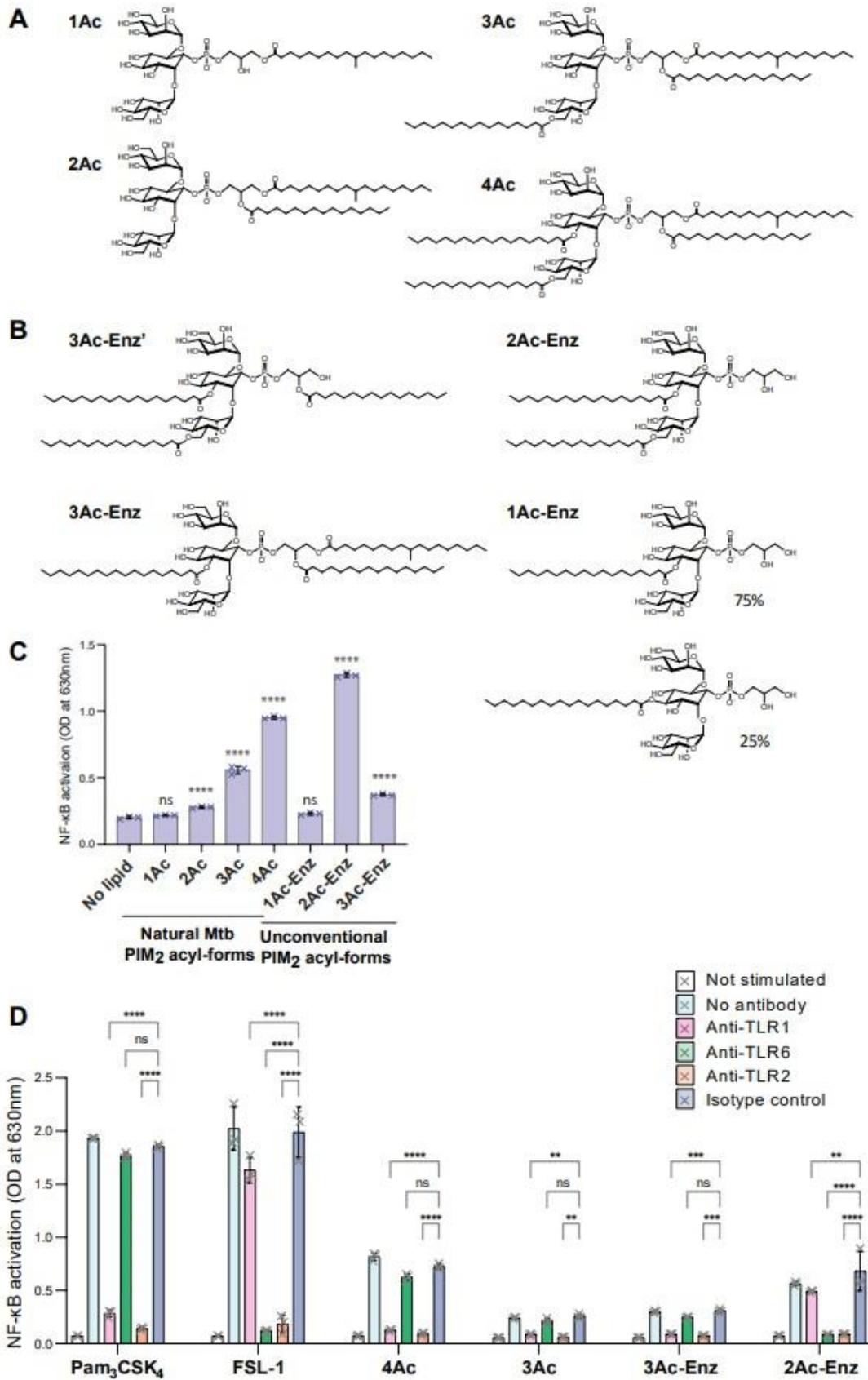


Figure 6

## Matériel et méthodes

### 1) Biologie cellulaire

**Culture cellulaire** : À l'exception des cas où le fournisseur est précisé, tous les réactifs utilisés pour la culture cellulaire proviennent de ThermoFisher (Gibco).

Les lignées cellulaires THP1 et K562 sont cultivées dans un incubateur thermostaté à 37°C avec une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture utilisé est le RPMI (Roswell Park Memorial Institute) enrichi en L-glutamine et en rouge de phénol. Ce milieu est complété par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et 1 % de pénicilline/streptomycine (PS) (ce milieu est appelé RPMI complet).

Les cellules THP-1 sont différenciées en macrophage M0 par ajout de 50 à 100ng/mL de PMA pendant 48h (Thermo scientific).

Les cellules K562 exprimant CD1b ont été obtenues par transfection et les cellules THP-1 exprimant CD1b ont été obtenues par transduction d'un lentivirus (Invivogen).

Les cellules dendritiques humaines sont obtenues après différenciation *in vitro* des monocytes CD14<sup>+</sup> de PBMC humains (Etablissement Français du Sang). Ces monocytes, dans des plaques 6 puits contenant 2x10<sup>6</sup> de cellules par puits dans 2mL de milieu RPMI complet, sont différenciés en cellules dpar ajout de GM-CSF (Miltenyi) à 400IU/mL et d'IL-4 (Miltenyi) à 250 UI/mL pendant 6 jours.

**Lipides** : Les lipides utilisés lors de cette thèse sont les Ac<sub>2</sub>SGL, Ac<sub>4</sub>SGL et GMM qui ont été purifiés dans l'équipe à partir d'extraction lipidique totale de Mtb. Les lipides synthétiques SL37 et PIM2Ac4 ont été synthétisés au sein de l'équipe. Ces lipides secs sont solubilisés en ajoutant 10µL de DMSO, puis par chauffage et agitation sur vortex.

Enfin, le LPS utilisé est le LPS-EK Ultrapure provenant d'Invivogen.

**Expansion des clones de LT CD1b spécifiques** : Les lignées de LT spécifiques de l'Ac<sub>2</sub>SGL (A05) et spécifiques du GMM (G08) nous ont été envoyés par le Pr Seshadri (Université de Washington) et les clones spécifiques du GMM (LDN5) nous ont été envoyés par le Pr Moody (Harvard). Ces clones sont cultivés dans un milieu appelé "T Cell Medium" (TCM), qui correspond au milieu RPMI complet enrichi en acides aminés essentiels et non essentiels (à 0.6%), en HEPES (à 1%), et en β-mercaptoéthanol (à 0.1%). Après décongélation, les lymphocytes sont maintenus dans 25 mL de TCM, disposés dans

des flasques de 25 cm<sup>2</sup> en position verticale, à une densité de 1x10<sup>5</sup> lymphocytes par flasque. Dans chaque flasque sont ajoutées des "feeder cells", constituées d'un mélange de PBMC (25 millions de cellules) et de lymphoblastes JY (5 millions de cellules) irradiées respectivement à 7500 et 5000 Gy (irradiation effectuée au Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse). L'activation des lymphocytes est initiée par l'ajout de 30 ng/mL d'anticorps anti-CD3 (clone OKT-3, Biolegend) et de 2 nM d'IL-2 (Preprotech). Selon la croissance des clones, le milieu est renouvelé et les cellules sont régulièrement divisées.

Les lymphocytes sont maintenus en expansion pendant environ 14 jours avant d'être congelés, avec 10 à 20 millions de cellules par cryotube dans du SVF additionné de 10 % de DMSO.

**Test d'activation des LT CD1b spécifiques :** 5x10<sup>4</sup> CPA (THP-1 CD1b, K562 CD1b, ou CD) et 5x10<sup>4</sup> LT sont répartis dans chaque puits de plaques 96 puits à fonds rond en présence du lipide d'intérêt (Ac2SGL, GMM) avec des concentrations allant de 0 à 10µM. Ces lipides sont solubilisés avec 10µL de DMSO, vortex et chauffage. Ils sont ensuite dilués aux concentrations voulues dans du TCM. Le volume final de chaque puits est de 200µL. Après 24h d'incubation à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>, le surnageant de cette co-culture est récupéré et la concentration d'IFN-γ produite est mesurée par test ELISA (Invitrogen). Afin de s'assurer que l'activation des LT dépend de la présentation par CD1b, un anticorps anti-CD1b (clone BCD1b.3) est ajouté à la co-culture à une concentration de 5µg/mL.

**Tests d'inhibition de l'acidification lysosomale par la monensine :** Dans une plaque 96 puits, 5x10<sup>4</sup> CD ou THP-1 CD1b par puits sont incubées 1h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> en présence de 0, 2 ou 10µg/mL de monensine (MedChemExpress). Les cellules sont pulsées avec 10µM d'Ac2SGL pendant 3h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS, puis fixées 10min à RT avec 100µL de PFA 3,4%. Après trois lavages, 5x10<sup>4</sup> LT A05 sont ajoutés dans la plaque dans un volume final de 200µL de TCM. Après 24h d'incubation à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>, le surnageant de cette co-culture est récupéré et la concentration d'IFN-γ relarguée est mesurée par test ELISA (Invitrogen).

**Tests d'inhibition de la protéine de transfert lipidique NPC1 :** Dans une plaque 96 puits, 5x10<sup>4</sup> cellules dendritiques CD1b+ par puits sont incubées 3h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> en présence de 0, 2 ou 10µg/mL de l'inhibiteur spécifique de NPC1 (U18666A)

(MedChemExpress). Les cellules sont pulsées avec des concentrations d'antigène lipidique (GMM, Ac<sub>2</sub>SGL) allant de 0µM à 10µM pendant 3h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS, puis fixées 10min à RT avec 100µL de PFA 3,4%. Après trois lavages, les LT (A05, G08) (5x10<sup>4</sup> cellules par puits) sont ajoutés dans la plaque dans un volume final de 200µL de TCM. Après 24h d'incubation à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>, le surnageant de cette co-culture est récupéré et la concentration d'IFN-γ relarguée est mesurée par test ELISA (Invitrogen).

**Reconnaissance du complexe CD1b-SL37 par l'anticorps D11 :** Les CPA sont réparties dans une plaque 96 puits à fond rond avec 8x10<sup>4</sup> cellules par puits et sont activées ou non par ajout de 5µg/mL de LPS (LPS-EK Ultrapure, Invivogen), repris dans du milieu RPMI complet pendant 2h. Les cellules sont ensuite pulsées pendant 20h avec 10µg/mL de SL37 dans du milieu RPMI complet à 37 °C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec du PBS et incubées 30min à 4°C avec l'anticorps primaire D11 (Pr Acosta, Universiti Sains Malaysia) spécifique du complexe CD1b-SL37 à une concentration de 10µg/mL et dilué dans du "PBS FACS" (PBS + 0.5% SVF). Après un lavage dans du PBS FACS, les cellules sont incubées 30min à 4°C avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome AF647 et dirigé contre le tag c-myc présent sur l'anticorps D11 (Proteintech), également à une concentration de 10µg/mL. La reconnaissance du complexe est analysée par cytométrie en flux, par le cytomètre BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences). Les données sont exploitées sur le logiciel FlowJo.

**Marquage de la protéine CD1b en surface des cellules :** Pour chaque lignée cellulaire, ainsi que pour les cellules dendritiques humaines, 2x10<sup>5</sup> cellules sont centrifugées à 400g pendant 5 min et lavées 2 fois avec 200 µL de PBS FACS, puis incubées avec un anticorps anti-CD1b (BCD1b3.1) à 5 µg/mL pendant 15 min à 4°C. L'anticorps secondaire utilisé est un PE-anti- mouse (clone RMG-1, Biolegend) dilué dans le PBS FACS à 5 µg/mL. La présence de CD1b en surface des cellules est analysée par cytométrie en flux, par le cytomètre BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences). Les données sont exploitées sur le logiciel FlowJo.

## **2) Obtention et caractérisation de fractions lysosomales :**

**Préparation des fractions lysosomales par centrifugations différentielles :** Environ

$1 \times 10^8$  cellules sont lavées une première fois au PBS puis reprises dans 1 mL de tampon d'homogénéisation (saccharose 250 mM, imidazole 3 mM, EGTA 0,5 mM pH = 7,4, 4°C) avec ajout d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Les cellules sont lysées mécaniquement afin de conserver l'intégrité des organites. La lyse s'effectue par une trentaine de coups dans un homogénéiseur en verre mis dans la glace, le résultat correspond au lysat cellulaire total (L). Le lysat est centrifugé deux fois 10 min à 800g à 4°C afin de se débarrasser des noyaux, débris cellulaires et cellules non lysées (le culot obtenu est nommé C1). Le surnageant est conservé et subit une ultracentrifugation à 21 000g 2 min à 4°C (Optima MAX-130K Ultracentrifuge, Beckman-Coulter). Le culot ainsi obtenu est nommé C2 et contient majoritairement les mitochondries. Le surnageant est ultracentrifugé à 80 000g pendant 8 min. Le culot obtenu est nommé C3 et contient la majorité des lysosomes. Le culot C3 est lavé avec 1mL de tampon d'homogénéisation (86 000g pendant 8 min), et est ensuite repris dans 200µL de tampon à pH acide (acétate de sodium 20 mM, pH = 4,5 ajusté avec de l'acide acétique). Les lysosomes sont lysés par cycles successifs de congélation/décongélation dans de l'azote liquide (-220°C) et au bain-marie (37°C), permettant ainsi la libération des enzymes lysosomales. Les étapes de ce protocole sont soigneusement effectuées à 4°C. Une fraction de chaque échantillon est conservée afin de contrôler l'efficacité de l'enrichissement, par test d'activité, DLS et western blot.

**Dynamic Light Scattering :** La taille des particules contenues dans la FL est analysée par diffusion dynamique de la lumière, à l'aide d'un instrument DynaPro Titan (Wyatt Analytical Technologies, Santa Barbara). 10 acquisitions de 5 secondes à 25°C sont enregistrées par condition dans des cuvettes dédiées.

**Microscopie électronique à transmission :** Une fraction du culot lysosomal P3 est conservé intact dans du PBS et n'est pas lysé par congélation/décongélation. 5µL de cet échantillon est placé sur une grille en cuivre G400 couverte d'un film de carbone et formvar et est mis à sécher pendant 2min. La grille est lavée avec de l'eau distillée et 5µL d'acétate d'uranyl 2% filtré sont déposés sur la grille afin de faire une coloration négative. Les échantillons sont observés sur le microscope Jeol 1400. Les photos sont exploitées sur le logiciel Gatan Microscopy Suite 3.

**Test d'activité de la B-hexosaminidase :** Dans une plaque 96 puits à fonds plat, 1µg de protéines provenant de chaque fraction est déposé dans 80µL du substrat 4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (Sigma) 7.5mM dilué dans du tampon Citrate-phosphate, 100

mM (pH 4.7). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout de 180µL de tampon borate 200 mM (pH 9.8). Le 4-nitrophénol qui est produit est mesuré par absorbance à 405 nm (CLARIOstar Plus Microplate Reader, BMG labtech).

**Western blot / Analyses sur gel SDS-PAGE :** 10µg de protéines de chaque fraction sont dilués dans un tampon Laemmli 5X (0,1 % bleu de bromophenol, 50 % glycérol, 10 % SDS, 25 % β-mercaptoéthanol dans un Tampon Tris-HCl 0.25 M pH=6,8) et chauffés 10 min à 90°C avant d'être déposés sur gel de polyacrylamide composé d'un gel de concentration à 5 % d'acrylamide sur un gel de séparation à 12 % d'acrylamide. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific™). La migration est effectuée dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0,1 % SDS) à 40 V pendant 20 min puis à 160 V pendant 1 h. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad) pendant 30 min à 25 V, et les membranes sont bloquées pendant deux heures à température ambiante dans une solution de blocage (Tris Buffer Saline + 0.01 % tween-20, pH = 7.4 + 5% de lait). Les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C avec les solutions d'anticorps primaires dilués dans du Tris Buffer Saline pH = 7.4 + 3% de lait. Les anticorps utilisés sont dirigés contre : LAMP1 (marqueur des membranes lysosomales) (NSJ bioreagents), LPLA2 (marqueur du lumen lysosomal) (collaboration avec Pr Shayman), TIMM23 (marqueur des mitochondries) (Invitrogen), Lamine (marqueur du noyau) (Abcam), CD1b (Abcam), AOA (Proteintech), PSAP (Proteintech) et GM2AP (Proteintech). Les membranes sont ensuite incubées pendant 2h à RT avec les anticorps secondaires Anti-IgG de lapin conjugué à l'HRP (Invitrogen) ou anti IgG de souris conjugué à l'HRP (Invitrogen). La révélation est effectuée avec le kit Cytiva Amersham™ ECL™ Prime western Blotting Detection Reagent avec un système d'imagerie Chemidoc de Bio-Rad.

**Tests de digestion *in vitro* de lipides mycobactériens par la fraction lysosomale :** 100µg de PIM2 tétra-acylés synthétiques sont séchés sous flux d'azote dans des vials en verre puis solubilisés dans 10µL de DMSO en chauffant et en vortexant. 50µL de FL et 300µL de tampon à pH acide (acétate de sodium 20 mM, pH = 4,5 ajusté avec de l'acide acétique) sont ajoutés et le mélange est incubé à 37°C sous agitation pendant 4j. Les lipides sont extraits par ajout de 500µL de butanol au mélange et centrifugation 2min à 3500g. La phase organique supérieure est récupérée et une seconde extraction est effectuée sur la phase aqueuse avec un nouvel ajout de 500µL de butanol. Le produit d'extraction est séché sous flux d'azote et repris dans 100µL d'un mélange chloroforme-méthanol-eau (60:35:8, v/v/v) afin d'être analysé en spectrométrie de masse MALDI/TOF.

**Spectrométrie de masse MALDI/TOF :** Les analyses en MALDI-Tof sont réalisées en mode négatif et positif en mode réflectron sur un spectromètre AbSciex Tof/Tof 5800. L'ionisation a été obtenue par irradiation avec un laser Nd (349 nm) fonctionnant avec une fréquence de 400 Hz. L'intensité du laser était réglée entre 2000 et 2500 et un mouvement continu de la platine a été utilisé avec une vitesse de 600 µm/sec. En général, les spectres de 2500 à 5000 tirs laser ont été additionnés pour obtenir le spectre final. La matrice utilisée est HABA (2-(4'-Hydroxyphenylazo)benzoic acid) à une concentration de 10mg/mL dans un mélange éthanol/eau 1:1, v/v. La matrice (0.5µL) et les échantillons (0.5µL) sont déposés sur la plaque. La plage de masse sélectionnée va de 500 à 3 000 masse sur charge (m/z) et les données sont exploitées sur le logiciel Data Explorer TM.

### **3) Identification de protéines candidates**

**Identification de protéines partenaires de CD1b intralysosomales par Co-Immunoprécipitation :** Les expériences de co-IP ont été effectuées avec et sans étape de crosslink. Des fractions lysosomales de cellules K562, K562 CD1b ou K562 CD1b-6His (générées précédemment dans l'équipe) ont été obtenues par centrifugations différentielles. Les protéines membranaires du culot lysosomal sont solubilisées dans un tampon de lyse pH 7.4 (1% Dodecyl maltoside (DDM), 150mM NaCl, 20mM Tris-Cl, Inhibiteur de protéase et DNase) pendant 3h sous agitation à 4°C. Les protéines solubilisées sont récupérées dans le surnageant après centrifugation 10mn à 17 000g. La co-IP est effectuée avec les billes Dynabeads™ His-Tag Isolation and Pulldown (Invitrogen), spécifiques du tag histidine.

Pour les conditions avec étape de crosslink, cette étape est réalisée à la fin des centrifugations différentielles, sur le culot lysosomal. Ce culot est incubé 10 min à RT dans 200µL de formaldéhyde 0,5%, puis est lavé deux fois dans du tampon d'homogénéisation avant l'étape de solubilisation. Le protocole est ensuite poursuivi comme décrit.

**Analyses protéomiques :** Les analyses protéomiques des échantillons, qu'il s'agisse des FL des CD et THP-1 CD1b ou des produits d'éluion obtenus après purification sur colonne ou co-IP avec les billes, ont été réalisées par Alexandre Stella, de l'équipe du Dr Odile Schiltz à l'IPBS. Les analyses nécessitaient quatre répliques par condition. Chaque échantillon a été digéré avec 2 µg de trypsine suivant le protocole S-Trap (micros colonnes S-Trap). 50 µg de chaque échantillon ont été séchés dans un SpeedVac (Thermo Fisher Scientific) et resuspendus dans 25µl de SDS à 5 %. Les solutions de protéines ont été réduites et alkylées avec une solution de 100 mM de TCEP et 400 mM de chloroacétamide pendant 5 minutes à 95 °C. Les protéines ont été acidifiées à une concentration finale de 1,2 % d'acide phosphorique et diluées avec sept volumes de tampon S-Trap (90 % de méthanol, 100 mM de bicarbonate de triéthylammonium (TEAB), pH 7,1). Les échantillons ont ensuite été transférés dans des colonnes de centrifugation S-Trap Mico Spin (Protifi), piégés dans le filtre par centrifugation à 4 000g pendant 1 minute, puis lavés trois fois avec 150 µL de tampon S-Trap et centrifugés à 4 000g pendant 1 minute. La protéolyse a été réalisée par l'ajout de 0,8 µg de trypsine dans la cartouche S-Trap (20 µl dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium) et une incubation d'une heure à 47 °C. L'extraction des peptides a été effectuée en trois étapes d'éluion : 80 µL de bicarbonate d'ammonium à 50 mM, 80 µl de forme acide à 0,2 % et 40 µL d'acétonitrile à 50 % / acide formique à 0,2 %, avec des centrifugations à 4 000g. Les analyses ont été acquises sur un instrument de type QExactive Plus. Les extraits peptidiques issus de la digestion tryptique ont été resuspendus dans 17 µl de tampon d'injection Switchos. Pour chacune des analyses, 5 µl d'extrait peptidique ont été injectés dans l'instrument.

Pour l'analyse protéomique comparant les protéines enrichies entre deux échantillons, un test de Student a été appliqué pour évaluer la signification statistique des différences d'abondance. Les résultats sont présentés dans un *volcano plot*, avec la  $-\text{Log}_{10}$  de la *p-value* du test de Student en ordonnée et le  $\text{Log}_2$  du rapport CD1b-6his/WT en abscisse, afin de visualiser les protéines enrichies statistiquement significatives.

## Références bibliographiques

- Aguilo, Nacho, Jesus Gonzalo-Asensio, Samuel Alvarez-Arguedas, Dessislava Marinova, AnaBelen Gomez, Santiago Uranga, Ralf Spallek, et al. 2017. « Reactogenicity to Major Tuberculosis Antigens Absent in BCG Is Linked to Improved Protection against Mycobacterium Tuberculosis ». *Nature Communications* 8 (1): 16085. <https://doi.org/10.1038/ncomms16085>.
- Ahn, Victoria E., Kym F. Faull, Julian P. Whitelegge, Arvan L. Fluharty, et Gilbert G. Privé. 2003. « Crystal Structure of Saposin B Reveals a Dimeric Shell for Lipid Binding ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (1): 38-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0136947100>.
- Allan, Lenka L., Annelein M. Stax, Dong-Jun Zheng, Brian K. Chung, Fred K. Kozak, RusungTan, et Peter Van Den Elzen. 2011. « CD1d and CD1c Expression in Human B Cells Is Regulated by Activation and Retinoic Acid Receptor Signaling ». *The Journal of Immunology* 186 (9): 5261-72. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003615>.
- Ameis, Detlev, Martin Merkel, Christoph Eckerskorn, et Heiner Greten. 1994. « Purification, Characterization and Molecular Cloning of Human Hepatic Lysosomal Acid Lipase ». *European Journal of Biochemistry* 219 (3): 905-14. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18572.x>.
- Angénieux, Catherine, Vincent Fraisier, Blandine Maître, Victor Racine, Nicole Van Der Wel, Dominique Fricker, Fabienne Proamer, et al. 2005. « The Cellular Pathway of CD1e in Immature and Maturing Dendritic Cells ». *Traffic* 6 (4): 286-302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00272.x>.
- Angénieux, Catherine, J. Salamero, Dominique Fricker, Jean-Pierre Cazenave, Bruno Goud, Daniel Hanau, et Henri De La Salle. 2000. « Characterization of CD1e, a Third Type of CD1 Molecule Expressed in Dendritic Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 37757-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007082200>.
- Angénieux, Catherine, François Waharte, Alexandre Gidon, François Signorino-Gelo, Virginie Wurtz, Rim Hojeij, Fabienne Proamer, et al. 2012. « Lysosomal-Associated Transmembrane Protein 5 (LAPTM5) Is a Molecular Partner of CD1e ». Édité par Johan K. Sandberg. *PLoS ONE* 7 (8): e42634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042634>.
- Arbues, Ainhoa, Juan I. Aguilo, Jesus Gonzalo-Asensio, Dessislava Marinova, Santiago Uranga, Eugenia Puentes, Conchita Fernandez, et al. 2013. « Construction, Characterization and Preclinical Evaluation of MTBVAC, the First Live-Attenuated M. Tuberculosis-Based Vaccine to Enter Clinical Trials ». *Vaccine* 31 (42): 4867-73. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.051>.
- Astarie-Dequeker, Catherine, Laurent Le Guyader, Wladimir Malaga, Fam-Ky Seaphanh, Christian Chalut, André Lopez, et Christophe Guilhot. 2009. « Phthiocerol Dimycocerosates of M. Tuberculosis Participate in Macrophage Invasion by Inducing Changes in the Organization of Plasma Membrane Lipids ». Édité par JoAnne L. Flynn. *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000289. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000289>.

- Azuma, N., J.S. Obrien, H.W. Moser, et Y. Kishimoto. 1994. « Stimulation of Acid Ceramidase Activity by Saposin D ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 311 (2): 354-57. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1248>.
- Bagchi, Sreya, Sha Li, et Chyung-Ru Wang. 2016. « CD1b-Autoreactive T Cells Recognize Phospholipid Antigens and Contribute to Antitumor Immunity against a CD1b<sup>+</sup> T Cell Lymphoma ». *OncoImmunology* 5 (9): e1213932. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1213932>.
- Baldwin, Susan L., Sylvie Bertholet, Valerie A. Reese, Lance K. Ching, Steven G. Reed, et Rhea N. Coler. 2012. « The Importance of Adjuvant Formulation in the Development of a Tuberculosis Vaccine ». *The Journal of Immunology* 188 (5): 2189-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102696>.
- Barral, Duarte C, Marco Cavallari, Peter J McCormick, Salil Garg, Anthony I Magee, Juan S Bonifacino, Gennaro De Libero, et Michael B Brenner. 2008. « CD1a and MHC Class I Follow a Similar Endocytic Recycling Pathway ». *Traffic* 9 (9): 1446-57. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00781.x>.
- Battistini, Luca, Falko R. Fischer, Cedric S. Raine, et Celia F. Brosnan. 1996. « CD1b Is Expressed in Multiple Sclerosis Lesions ». *Journal of Neuroimmunology* 67 (2): 145-51. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(96\)00045-8](https://doi.org/10.1016/0165-5728(96)00045-8).
- Batuwangala, Thil, Dawn Shepherd, Stephan D. Gadola, Kevin J. C. Gibson, Nathan R. Zaccai, Alan R. Fersht, Gurdyal S. Besra, Vincenzo Cerundolo, et E. Yvonne Jones. 2004. « The Crystal Structure of Human CD1b with a Bound Bacterial Glycolipid ». *The Journal of Immunology* 172 (4): 2382-88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2382>.
- Bauer, Anton, Robert Hüttinger, Günther Staffler, Cornelia Hansmann, Walter Schmidt, Otto Majdic, Walter Knapp, et Hannes Stockinger. 1997. « Analysis of the Requirement for B2-microglobulin for Expression and Formation of Human CD1 Antigens ». *European Journal of Immunology* 27 (6): 1366-73. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270611>.
- Beckman, E. M., A. Melián, S. M. Behar, P. A. Sieling, D. Chatterjee, S. T. Furlong, R. Matsumoto, J. P. Rosat, R. L. Modlin, et S. A. Porcelli. 1996. « CD1c Restricts Responses of Mycobacteria-Specific T Cells. Evidence for Antigen Presentation by a Second Member of the Human CD1 Family ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (7): 2795-2803.
- Beckman, Evan M., Steven A. Porcelli, Craig T. Morita, Samuel M. Behar, Stephen T. Furlong, et Michael B. Brenner. 1994. « Recognition of a Lipid Antigen by CD1-Restricted A $\beta$ +T Cells ». *Nature* 372 (6507): 691-94. <https://doi.org/10.1038/372691a0>.
- Bedard, Melissa, Dilip Shrestha, David A. Priestman, Yuting Wang, Falk Schneider, Juan D. Matute, Shankar S. Iyer, et al. 2019. « Sterile Activation of Invariant Natural Killer T Cells by ER-Stressed Antigen-Presenting Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (47): 23671-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910097116>.

- Behr, Marcel A., Paul H. Edelstein, et Lalita Ramakrishnan. 2024. « Rethinking the Burden of Latent Tuberculosis to Reprioritize Research ». *Nature Microbiology* 9 (5): 1157-58. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01683-0>.
- Bernstein, J, W A Lott, B A Steinberg, et H L Yale. 1952. « Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds ». *Am Rev Tuberc.*, avril 1952.
- Besra, Gurdyal S., Kay-Hooi Khoo, Michael R. McNeil, Anne Dell, Howard R. Morris, et Patrick J. Brennan. 1995. « A New Interpretation of the Structure of the Mycolyl-Arabinogalactan Complex of Mycobacterium Tuberculosis as Revealed through Characterization of Oligoglycosylalditol Fragments by Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry and <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ». *Biochemistry* 34 (13): 4257-66. <https://doi.org/10.1021/bi00013a015>.
- Birkinshaw, Richard W, Daniel G Pellicci, Tan-Yun Cheng, Andrew N Keller, Maria Sandoval-Romero, Stephanie Gras, Annemieke De Jong, et al. 2015. « Aβ T Cell Antigen Receptor Recognition of CD1a Presenting Self Lipid Ligands ». *Nature Immunology* 16 (3): 258-66. <https://doi.org/10.1038/ni.3098>.
- Bishop, P.J., et G. Neumann. 1970. « The History of the Ziehl-Neelsen Stain ». *Tubercle* 51 (2): 196-206. [https://doi.org/10.1016/0041-3879\(70\)90073-5](https://doi.org/10.1016/0041-3879(70)90073-5).
- Bloom, Barry R. 1994. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. Washington (D.C.): ASM press.
- Böddinghaus, B, T Rogall, T Flohr, H Blöcker, et E C Böttger. 1990. « Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of rRNA ». *Journal of Clinical Microbiology* 28 (8): 1751-59. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.8.1751-1759.1990>.
- Borg, Natalie A., Kwok S. Wun, Lars Kjer-Nielsen, Matthew C. J. Wilce, Daniel G. Pellicci, Ruide Koh, Gurdyal S. Besra, et al. 2007. « CD1d-Lipid-Antigen Recognition by the Semi-Invariant NKT T-Cell Receptor ». *Nature* 448 (7149): 44-49. <https://doi.org/10.1038/nature05907>.
- Bottai, Daria, et Roland Brosch. 2016. « The BCG Strain Pool: Diversity Matters ». *Molecular Therapy* 24 (2): 201-3. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.18>.
- Bourgeois, Elvire A., Sumithra Subramaniam, Tan-Yun Cheng, Annemieke De Jong, Emilie Layre, Dalam Ly, Maryam Salimi, et al. 2015. « Bee Venom Processes Human Skin Lipids for Presentation by CD1a ». *Journal of Experimental Medicine* 212 (2): 149-63. <https://doi.org/10.1084/jem.20141505>.
- Bourinbaiar, Aldar S., Uyanga Batbold, Yuri Efremenko, Munkhburam Sanjagdorj, Dmytro Butov, Narantsetseg Damdinpurev, Elena Grinishina, et al. 2020. « Phase III, Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind Trial of Tableted, Therapeutic TB Vaccine (V7) Containing Heat-Killed M. Vaccae Administered Daily for One Month ». *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* 18 (février):100141. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2019.100141>.

- Briken, V. 2002. « Intracellular trafficking pathway of newly synthesized CD1b molecules ». *The EMBO Journal* 21 (4): 825-34. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.825>.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, et al. 2002. « A New Evolutionary Scenario for the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (6): 3684-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>.
- Brozovic, Suzana, Takashi Nagaishi, Masaru Yoshida, Stephanie Betz, Azucena Salas, Daohong Chen, Arthur Kaser, et al. 2004. « CD1d Function Is Regulated by Microsomal Triglyceride Transfer Protein ». *Nature Medicine* 10 (5): 535-39. <https://doi.org/10.1038/nm1043>.
- Bulut, Yonca, Kathrin S. Michelsen, Linda Hayrapetian, Yoshikazu Naiki, Ralf Spallek, Mahavir Singh, et Moshe Arditi. 2005. « Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins Use Diverse Toll-like Receptor Pathways to Activate Pro-Inflammatory Signals ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (22): 20961-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411379200>.
- Busch, Martin, Christian Herzmann, Stephanie Kallert, Andreas Zimmermann, Christoph Höfer, Daniel Mayer, Sebastian F. Zenk, et al. 2016. « Lipoarabinomannan-Responsive Polycytotoxic T Cells Are Associated with Protection in Human Tuberculosis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194 (3): 345-55. <https://doi.org/10.1164/rccm.201509-1746OC>.
- Calabi, F., et C. Milstein. 1986. « A Novel Family of Human Major Histocompatibility Complex-Related Genes Not Mapping to Chromosome 6 ». *Nature* 323 (6088): 540-43. <https://doi.org/10.1038/323540a0>.
- Cala-De Paepe, Diane, Emilie Layre, Gaëlle Giacometti, Luis F. Garcia-Alles, Lucia Mori, Daniel Hanau, Gennaro De Libero, Henri De La Salle, Germain Puzo, et Martine Gilleron. 2012. « Deciphering the Role of CD1e Protein in Mycobacterial Phosphatidyl-Myo-Inositol Mannosides (PIM) Processing for Presentation by CD1b to T Lymphocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (37): 31494-502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386300>.
- Camacho, Frank, Ernesto Moreno, Luis F. Garcia-Alles, Glay Chinae Santiago, Martine Gilleron, Aleikar Vasquez, Yee Siew Choong, et al. 2020. « A Direct Role for the CD1b Endogenous Spacer in the Recognition of a Mycobacterium tuberculosis Antigen by T-Cell Receptors ». *Frontiers in Immunology* 11 (octobre):566710. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566710>.
- Camacho, Frank, María E. Sarmiento, Fatima Reyes, Louise Kim, Jim Huggett, Marco Lepore, Oscar Otero, et al. 2016. « Selection of Phage-Displayed Human Antibody Fragments Specific for CD1b Presenting the Mycobacterium Tuberculosis Glycolipid Ac2SGL ». *International Journal of Mycobacteriology* 5 (2): 120-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.12.002>.
- Campomenosi, Paola, Silvia Salis, Christer Lindqvist, Davide Mariani, Tommy Nordström,

- Francesco Acquati, et Roberto Taramelli. 2006. « Characterization of RNASET2, the First Human Member of the Rh/T2/S Family of Glycoproteins ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 449 (1-2): 17-26.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.02.022>.
- Cardona, Pere-Joan. 2006. « RUTI: A New Chance to Shorten the Treatment of Latent Tuberculosis Infection ». *Tuberculosis* 86 (3-4): 273-89.  
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.01.024>.
- Chackerian, Alissa, Jen Alt, Vaji Perera, et Samuel M. Behar. 2002. « Activation of NKT Cells Protects Mice from Tuberculosis ». *Infection and Immunity* 70 (11): 6302-9.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6302-6309.2002>.
- Chan, John, et JoAnne Flynn. 2004. « The Immunological Aspects of Latency in Tuberculosis ». *Clinical Immunology* 110 (1): 2-12. [https://doi.org/10.1016/S1521-6616\(03\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S1521-6616(03)00210-9).
- Chancellor, Andrew, Anna S. Tocheva, Chris Cave-Ayland, Liku Tezera, Andrew White, Juma'a R. Al Dulayymi, John S. Bridgeman, et al. 2017. « CD1b-Restricted GEM T Cell Responses Are Modulated by *Mycobacterium Tuberculosis* Mycolic Acid Meromycolate Chains ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (51).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1708252114>.
- Chandra, Shilpi, James Gray, William B. Kiosses, Archana Khurana, Kaori Hitomi, Catherine M. Crosby, Ashu Chawla, et al. 2018. « Mrp1 Is Involved in Lipid Presentation and iNKT Cell Activation by *Streptococcus Pneumoniae* ». *Nature Communications* 9 (1): 4279.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06646-8>.
- Chatterjee, D., K. Lowell, B. Rivoire, M. R. McNeil, et P. J. Brennan. 1992. « Lipoarabinomannan of *Mycobacterium Tuberculosis*. Capping with Mannosyl Residues in Some Strains ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (9): 6234-39.
- Cheng, Tan-Yun, Miguel Relloso, Ildiko Van Rhijn, David C Young, Gurdyal S Besra, Volker Briken, Dirk M Zajonc, Ian A Wilson, Steven Porcelli, et D Branch Moody. 2006. « Role of lipid trimming and CD1 groove size in cellular antigen presentation ». *The EMBO Journal* 25 (13): 2989-99. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601185>.
- Cheung, Ka Lun, Rachael Jarrett, Sumithra Subramaniam, Maryam Salimi, Danuta Gutowska-Owsiak, Yi-Ling Chen, Clare Hardman, Luzheng Xue, Vincenzo Cerundolo, et Graham Ogg. 2016. « Psoriatic T Cells Recognize Neolipid Antigens Generated by Mast Cell Phospholipase Delivered by Exosomes and Presented by CD1a ». *Journal of Experimental Medicine* 213 (11): 2399-2412. <https://doi.org/10.1084/jem.20160258>.
- Chiu, Ya-Hui, Jayanthi Jayawardena, Angela Weiss, Daniel Lee, Se-Ho Park, Alice Dautry-Varsat, et Albert Bendelac. 1999. « Distinct Subsets of CD1d-Restricted T Cells Recognize Self-Antigens Loaded in Different Cellular Compartments ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (1): 103-10. <https://doi.org/10.1084/jem.189.1.103>.
- Chiu, Ya-Hui, Se-Ho Park, Kamel Benlagha, Claire Forestier, Jayanthi Jayawardena-Wolf,

- Paul B. Savage, Luc Teyton, et Albert Bendelac. 2002. « Multiple Defects in Antigen Presentation and T Cell Development by Mice Expressing Cytoplasmic Tail-Truncated CD1d ». *Nature Immunology* 3 (1): 55-60. <https://doi.org/10.1038/ni740>.
- Cho, Hyun-Woo, Su-Yeon Kim, Dae-Hee Sohn, Min-Ji Lee, Mi-Young Park, Hyun-Jung Sohn, Hyun-Il Cho, et Tai-Gyu Kim. 2016. « Triple Costimulation via CD80, 4-1BB, and CD83 Ligand Elicits the Long-Term Growth of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells in Low Levels of IL-2 ». *Journal of Leukocyte Biology* 99 (4): 521-29. <https://doi.org/10.1189/jlb.1HI0814-409RR>.
- Ciaffoni, Fiorella, Rosa Salvioli, Massimo Tatti, Giuseppe Arancia, Pasqualina Crateri, et AnnaMaria Vaccaro. 2001. « Saposin D Solubilizes Anionic Phospholipid-Containing Membranes ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (34): 31583-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102736200>.
- Ciaffoni, Fiorella, Massimo Tatti, Alessandra Boe, Rosa Salvioli, Arvan Fluharty, Sandro Sonnino, et Anna Maria Vaccaro. 2006. « Saposin B Binds and Transfers Phospholipids ». *Journal of Lipid Research* 47 (5): 1045-53. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500547-JLR200>.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, et al. 1998. « Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence ». *Nature* 393 (6685): 537-44. <https://doi.org/10.1038/31159>.
- Converse, Scott E., Joseph D. Mougous, Michael D. Leavell, Julie A. Leary, Carolyn R. Bertozzi, et Jeffery S. Cox. 2003. « MmpL8 Is Required for Sulfolipid-1 Biosynthesis and Mycobacterium Tuberculosis Virulence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (10): 6121-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1030024100>.
- Conzelmann, Ernst, et Konrad Sandhoff. 1979. « Purification and Characterization of an Activator Protein for the Degradation of Glycolipids G<sub>M2</sub> and G<sub>A2</sub> by Hexosaminidase A ». *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie* 360 (2): 1837-50. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1979.360.2.1837>.
- Cotton, Mark F, Shabir A Madhi, Angelique K Luabeya, Michele Tameris, Anneke C Hesselting, Justin Shenje, Elisma Schoeman, et al. 2022. « Safety and Immunogenicity of VPM1002 versus BCG in South African Newborn Babies: A Randomised, Phase 2 Non-Inferiority Double-Blind Controlled Trial ». *The Lancet Infectious Diseases* 22 (10): 1472-83. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00222-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00222-5).
- Cotton, Rachel N., Tan-Yun Cheng, Marcin Wegrecki, Jérôme Le Nours, Dennis P. Orgill, Bohdan Pomahac, Simon G. Talbot, et al. 2021. « Human Skin Is Colonized by T Cells That Recognize CD1a Independently of Lipid ». *Journal of Clinical Investigation* 131 (1): e140706. <https://doi.org/10.1172/JCI140706>.
- Crick, D. C., S. Mahapatra, et P. J. Brennan. 2001. « Biosynthesis of the Arabinogalactan-Peptidoglycan Complex of Mycobacterium Tuberculosis ». *Glycobiology* 11 (9): 107R-118R. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.9.107R>.
- Cuevas-Zuviría, Bruno, Marina Mínguez-Toral, Araceli Díaz-Perales, María Garrido-

- Arandia, et Luis F. Pacios. 2020. « Dynamic Plasticity of the Lipid Antigen-Binding Site of CD1dIs Crucially Favoured by Acidic pH and Helper Proteins ». *Scientific Reports* 10 (1): 5714. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62833-y>.
- Daffe, M., P. J. Brennan, et M. McNeil. 1990. « Predominant Structural Features of the Cell Wall Arabinogalactan of Mycobacterium Tuberculosis as Revealed through Characterization of Oligoglycosyl Alditol Fragments by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Analyses ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (12): 6734-43.
- Daffé, M., et G. Etienne. 1999. « The Capsule of Mycobacterium Tuberculosis and Its Implications for Pathogenicity ». *Tubercle and Lung Disease* 79 (3): 153-69. <https://doi.org/10.1054/tuld.1998.0200>.
- Darmoise, Alexandre, Patrick Maschmeyer, et Florian Winau. 2010. « The Immunological Functions of Saposins ». In *Advances in Immunology*, 105:25-62. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)05002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05002-9).
- Dascher, C. C. 2003. « Immunization with a Mycobacterial Lipid Vaccine Improves Pulmonary Pathology in the Guinea Pig Model of Tuberculosis ». *International Immunology* 15 (8):915-25. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg091>.
- Dascher, C. C., K. Hiromatsu, J. W. Naylor, P. P. Brauer, K. A. Brown, J. R. Storey, S. M. Behar, et al. 1999. « Conservation of a CD1 Multigene Family in the Guinea Pig ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (10): 5478-88.
- Dascher, Christopher C., et Michael B. Brenner. 2003. « Evolutionary Constraints on CD1 Structure: Insights from Comparative Genomic Analysis ». *Trends in Immunology* 24 (8): 412-18. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00179-0).
- Davis, Warren, Jonathan T Boyd, Kristina E Ile, et Kenneth D Tew. 2004. « Human ATP-Binding Cassette Transporter-2 (ABCA2) Positively Regulates Low-Density Lipoprotein Receptor Expression and Negatively Regulates Cholesterol Esterification in Chinese Hamster Ovary Cells ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1683 (1-3): 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2004.04.009>.
- Day, T. A., Penn-Nicholson, A., Kany Kany Luabeya, A., Fiore-Gartland, A., Du Plessis, N., Loxton, A. G., Vergara, J., Rolf, T. A., Reid, T. D., Toefy, A., Shenje, J., Geldenhuys, H., Tameris, M., Mabwe, S., Bilek, N., Bekker, L.-G., Diacon, A., Walzl, G., Ashman, J., Frevol, A., Sagawa, Z. K., Lindestam Arlehamn, C., Sette, A., Reed, S. G., Coler, R. N., Scriba, T. J., & Hatherill, M. (2021). *Safety and immunogenicity of the adjunct therapeutic vaccine ID93 + GLA-SE in adults who have completed treatment for tuberculosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. The Lancet Respiratory Medicine*, 9(5), 495–505. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00096-5)
- Davis, Warren, et Kenneth D. Tew. 2018. « ATP-Binding Cassette Transporter-2 (ABCA2) as a Therapeutic Target ». *Biochemical Pharmacology* 151 (mai):188-200. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.018>.
- De Jong, Annemieke, Eva Casas Arce, Tan-Yun Cheng, Ruben P. Van Summeren, Ben L.

- Feringa, Vadim Dudkin, David Crich, Isamu Matsunaga, Adriaan J. Minnaard, et D. Branch Moody. 2007. « CD1c Presentation of Synthetic Glycolipid Antigens with Foreign Alkyl Branching Motifs ». *Chemistry & Biology* 14 (11): 1232-42. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.09.010>.
- De Jong, Annemieke, Tan-Yun Cheng, Shouxiong Huang, Stephanie Gras, Richard W Birkinshaw, Anne G Kasmar, Ildiko Van Rhijn, et al. 2014. « CD1a-Autoreactive T Cells Recognize Natural Skin Oils That Function as Headless Antigens ». *Nature Immunology* 15 (2): 177-85. <https://doi.org/10.1038/ni.2790>.
- De Jong, Annemieke, Victor Peña-Cruz, Tan-Yun Cheng, Rachael A Clark, Ildiko Van Rhijn, et D Branch Moody. 2010. « CD1a-Autoreactive T Cells Are a Normal Component of the Human A $\beta$  T Cell Repertoire ». *Nature Immunology* 11 (12): 1102-9. <https://doi.org/10.1038/ni.1956>.
- De La Salle, Henri, Sabrina Mariotti, Catherine Angenieux, Martine Gilleron, Luis-Fernando Garcia-Alles, Dag Malm, Thomas Berg, et al. 2005. « Assistance of Microbial Glycolipid Antigen Processing by CD1e ». *Science* 310 (5752): 1321-24. <https://doi.org/10.1126/science.1115301>.
- De Lalla, Claudia, Marco Lepore, Francesco M. Piccolo, Anna Rinaldi, Andrea Scelfo, Claudio Garavaglia, Lucia Mori, Gennaro De Libero, Paolo Dellabona, et Giulia Casorati. 2011. « High-frequency and Adaptive-like Dynamics of Human CD1 Self-reactive T Cells ». *European Journal of Immunology* 41 (3): 602-10. <https://doi.org/10.1002/eji.201041211>.
- De Libero, Gennaro, et Lucia Mori. 2010. « How the Immune System Detects Lipid Antigens ». *Progress in Lipid Research* 49 (2): 120-27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.10.002>.
- Decout, Alexiane, Sandro Silva-Gomes, Daniel Drocourt, Sophie Barbe, Isabelle André, Francisco J. Cueto, Thierry Lioux, et al. 2017. « Rational Design of Adjuvants Targeting the C-Type Lectin Mincle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (10): 2675-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612421114>.
- Decout, Alexiane, Sandro Silva-Gomes, Daniel Drocourt, Emilyne Blattes, Michel Rivière, Jacques Prandi, Gérald Larrouy-Maumus, et al. 2018. « Deciphering the Molecular Basis of Mycobacteria and Lipoglycan Recognition by the C-Type Lectin Dectin-2 ». *Scientific Reports* 8 (1): 16840. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35393-5>.
- DeWitt, William S., Krystle K. Q. Yu, Damien B. Wilburn, Anna Sherwood, Marissa Vignali, Cheryl L. Day, Thomas J. Scriba, et al. 2018. « A Diverse Lipid Antigen-Specific TCR Repertoire Is Clonally Expanded during Active Tuberculosis ». *The Journal of Immunology* 201 (3): 888-96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800186>.
- Dougan, Stephanie K., Azucena Salas, Paul Rava, Amma Agyemang, Arthur Kaser, Jamin Morrison, Archana Khurana, et al. 2005. « Microsomal Triglyceride Transfer Protein Lipidation and Control of CD1d on Antigen-Presenting Cells ». *The Journal of*

- Experimental Medicine* 202 (4): 529-39. <https://doi.org/10.1084/jem.20050183>.
- Eckhardt, Emmelie, Jan Schinköthe, Marcel Gischke, Julia Sehl-Ewert, Björn Corleis, Anca Dorhoi, Jens Teifke, et al. 2023. « Phosphatidylinositolmannoside Vaccination Induces Lipid-Specific Th1-Responses and Partially Protects Guinea Pigs from Mycobacterium Tuberculosis Challenge ». *Scientific Reports* 13 (1): 18613. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45898-3>.
- Elgner, Fabian, Huimei Ren, Regina Medvedev, Daniela Ploen, Kiyoshi Himmelsbach, Klaus Boller, et Eberhard Hildt. 2016. « The Intracellular Cholesterol Transport Inhibitor U18666A Inhibits the Exosome-Dependent Release of Mature Hepatitis C Virus ». Édité par J.-H. J. Ou. *Journal of Virology* 90 (24): 11181-96. <https://doi.org/10.1128/JVI.01053-16>.
- Elton, Linzy, Sandeep Kasaragod, Helen Donoghue, Hussain A. Safar, Priscilla Amankwah, Alimuddin Zumla, Adam A. Witney, et Timothy D. McHugh. 2023. « Mapping the Phylogeny and Lineage History of Geographically Distinct BCG Vaccine Strains ». *Microbial Genomics* 9 (8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001077>.
- Elzen, Peter Van Den, Salil Garg, Luis León, Manfred Brigl, Elizabeth A. Leadbetter, Jenny E. Gumperz, Chris C. Dascher, et al. 2005. « Apolipoprotein-Mediated Pathways of Lipid Antigen Presentation ». *Nature* 437 (7060): 906-10. <https://doi.org/10.1038/nature04001>.
- Ernst, William A, Juli Maher, Sungae Cho, Kayvan R Niazi, Delphi Chatterjee, D. Branch Moody, Gurdyal S Besra, et al. 1998. « Molecular Interaction of CD1b with Lipoglycan Antigens ». *Immunity* 8 (3): 331-40. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80538-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80538-5).
- Evers, Bret M., Carlos Rodriguez-Navas, Rachel J. Tesla, Janine Prange-Kiel, Catherine R. Wasser, Kyoung Shin Yoo, Jeffrey McDonald, et al. 2017. « Lipidomic and Transcriptomic Basis of Lysosomal Dysfunction in Progranulin Deficiency ». *Cell Reports* 20 (11): 2565-74. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.056>.
- Facciotti, Federica, Marco Cavallari, Catherine Angénieux, Luis F. Garcia-Alles, François Signorino-Gelo, Lena Angman, Martine Gilleron, et al. 2011. « Fine Tuning by Human CD1e of Lipid-Specific Immune Responses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (34): 14228-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108809108>.
- Falkinham, Joseph O. 2002. « Nontuberculous Mycobacteria in the Environment ». *Clinics in Chest Medicine* 23 (3): 529-51. [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(02)00014-X).
- Felio, Kyrie, Hanh Nguyen, Christopher C. Dascher, Hak-Jong Choi, Sha Li, Michael I. Zimmer, Angela Colmone, D. Branch Moody, Michael B. Brenner, et Chyung-Ru Wang. 2009. « CD1-Restricted Adaptive Immune Responses to *Mycobacteria* in Human Group 1 CD1 Transgenic Mice ». *Journal of Experimental Medicine* 206 (11): 2497-2509. <https://doi.org/10.1084/jem.20090898>.
- Fischer, G., et H. Jatzkewitz. 1978. « The Activator of Cerebroside-Sulphatase ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 528 (1): 69-76. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(78\)90053-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(78)90053-X).

- Fletcher, Helen A., et Lewis Schragar. 2016. « TB Vaccine Development and the End TB Strategy: Importance and Current Status ». *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110 (4): 212-18. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw016>.
- Fürst, Werner, et Konrad Sandhoff. 1992. « Activator Proteins and Topology of Lysosomal Sphingolipid Catabolism ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1126 (1): 1-16. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90210-M](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90210-M).
- Gadola, Stephan D., Nathan R. Zaccai, Karl Harlos, Dawn Shepherd, Julio C. Castro-Palomino, Gerd Ritter, Richard R. Schmidt, E. Yvonne Jones, et Vincenzo Cerundolo. 2002. « Structure of Human CD1b with Bound Ligands at 2.3 Å, a Maze for Alkyl Chains ». *Nature Immunology* 3 (8): 721-26. <https://doi.org/10.1038/ni821>.
- Gansert, Jennifer L., Viviane Kießler, Matthias Engele, Frederick Wittke, Martin Röllinghoff, Alan M. Krensky, Steven A. Porcelli, Robert L. Modlin, et Steffen Stenger. 2003. « Human NKT Cells Express Granulysin and Exhibit Antimycobacterial Activity ». *The Journal of Immunology* 170 (6): 3154-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3154>.
- Garcia-Alles, Luis F., Anthony Collmann, Cees Versluis, Buko Lindner, Julie Guiard, Laurent Maveyraud, Emilie Huc, et al. 2011. « Structural Reorganization of the Antigen-Binding Groove of Human CD1b for Presentation of Mycobacterial Sulfolipids ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (43): 17755-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110118108>.
- Garcia-Alles, Luis F., Gaelle Giacometti, Cees Versluis, Laurent Maveyraud, Diane De Paepe, Julie Guiard, Samuel Tranier, et al. 2011. « Crystal Structure of Human CD1e Reveals a Groove Suited for Lipid-Exchange Processes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (32): 13230-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105627108>.
- Garcia-Alles, Luis F., Kees Versluis, Laurent Maveyraud, Ana Tesouro Vallina, Sebastiano Sansano, Nana Fatimath Bello, Hans-Jürgen Guber, et al. 2006. « Endogenous phosphatidylcholine and a long spacer ligand stabilize the lipid-binding groove of CD1b ». *The EMBO Journal* 25 (15): 3684-92. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601244>.
- Gebai, Ahmad, Alexei Gorelik, et Bhushan Nagar. 2018. « Crystal Structure of Saposin D in an Open Conformation ». *Journal of Structural Biology* 204 (2): 145-50. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.07.011>.
- Giabbai, Barbara, Stéphane Sidobre, M. D. Max Crispin, Yovan Sanchez-Ruiz, Angela Bachi, Mitchell Kronenberg, Ian A. Wilson, et Massimo Degano. 2005. « Crystal Structure of Mouse CD1d Bound to the Self Ligand Phosphatidylcholine: A Molecular Basis for NKT Cell Activation ». *The Journal of Immunology* 175 (2): 977-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.977>.
- Gilleron, Martine, Lakshmi Bala, Thérèse Brando, Alain Vercellone, et Germain Puzo.

2000.  
 « Mycobacterium Tuberculosis H37Rv Parietal and Cellular Lipoarabinomannans ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (1): 677-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.677>.
- Gilleron, Martine, Marco Lepore, Emilie Layre, Diane Cala-De Paepe, Naila Mebarek, James A. Shayman, Stéphane Canaan, et al. 2016. « Lysosomal Lipases PLRP2 and LPLA2 Process Mycobacterial Multi-Acylated Lipids and Generate T Cell Stimulatory Antigens ». *Cell Chemical Biology* 23 (9): 1147-56. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.07.021>.
- Gilleron, Martine, Jérôme Nigou, Bertrand Cahuzac, et Germain Puzo. 1999. « Structural Study of the LipoMannans from Mycobacterium Bovis BCG: Characterisation of Multiacylated Forms of the Phosphatidyl- Myo -Inositol Anchor 1 Edited by A. R. Fersht ». *Journal of Molecular Biology* 285 (5): 2147-60. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2438>.
- Gilleron, Martine, Jérôme Nigou, Delphine Nicolle, Valérie Quesniaux, et Germain Puzo. 2006. « The Acylation State of Mycobacterial Lipomannans Modulates Innate Immunity Response through Toll-like Receptor 2 ». *Chemistry & Biology* 13 (1): 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.10.013>.
- Gilleron, Martine, Valérie F.J. Quesniaux, et Germain Puzo. 2003. « Acylation State of the Phosphatidylinositol Hexamannosides from Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette Guérin and Mycobacterium Tuberculosis H37Rv and Its Implication in Toll-like Receptor Response ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (32): 29880-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303446200>.
- Gilleron, Martine, Catherine Ronet, Martin Mempel, Bernard Monsarrat, Gabriel Gachelin, et Germain Puzo. 2001. « Acylation State of the Phosphatidylinositol Mannosides from Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette Guérin and Ability to Induce Granuloma and Recruit Natural Killer T Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (37): 34896-904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103908200>.
- Gilleron, Martine, Steffen Stenger, Zaima Mazorra, Frederick Wittke, Sabrina Mariotti, Gabriele Böhmer, Jacques Prandi, Lucia Mori, Germain Puzo, et Gennaro De Libero. 2004. « Diacylated Sulfoglycolipids Are Novel Mycobacterial Antigens Stimulating CD1-Restricted T Cells during Infection with *Mycobacterium Tuberculosis* ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (5): 649-59. <https://doi.org/10.1084/jem.20031097>.
- Goonetilleke, Nilu P., Helen McShane, Carolyn M. Hannan, Richard J. Anderson, Roger H. Brookes, et Adrian V. S. Hill. 2003. « Enhanced Immunogenicity and Protective Efficacy Against *Mycobacterium Tuberculosis* of Bacille Calmette-Guérin Vaccine Using Mucosal Administration and Boosting with a Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara ». *The Journal of Immunology* 171 (3): 1602-9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1602>.
- Gorelik, Alexei, Katalin Illes, et Bhushan Nagar. 2018. « Crystal Structure of the Mammalian Lipopolysaccharide Detoxifier ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1719834115>.

- Govindarajan, Srinath, Eveline Verheugen, Koen Venken, Djoere Gaublomme, Margaux Maelegheer, Eva Cloots, Fien Gysens, et al. 2020. « ER Stress in Antigen-presenting Cells Promotes NKT Cell Activation through Endogenous Neutral Lipids ». *EMBO Reports* 21 (6): e48927. <https://doi.org/10.15252/embr.201948927>.
- Graham, John M. 2000. « Isolation of Lysosomes from Tissues and Cells by Differential and Density Gradient Centrifugation ». *Current Protocols in Cell Biology* 7 (1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0306s07>.
- Grant, Ethan P., Evan M. Beckman, Samuel M. Behar, Massimo Degano, Daphney Frederique, Gurdyal S. Besra, Ian A. Wilson, Steven A. Porcelli, Stephen T. Furlong, et Michael B. Brenner. 2002. « Fine Specificity of TCR Complementarity-Determining Region Residues and Lipid Antigen Hydrophilic Moieties in the Recognition of a CD1-Lipid Complex ». *The Journal of Immunology* 168 (8): 3933-40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3933>.
- Gras, Stephanie, Ildiko Van Rhijn, Adam Shahine, Tan-Yun Cheng, Mugdha Bhati, Li Lynn Tan, Hanim Halim, et al. 2016. « T Cell Receptor Recognition of CD1b Presenting a Mycobacterial Glycolipid ». *Nature Communications* 7 (1): 13257. <https://doi.org/10.1038/ncomms13257>.
- Guiard, Julie, Anthony Collmann, Luis Fernando Garcia-Alles, Lionel Mourey, Thérèse Brando, Lucia Mori, Martine Gilleron, Jacques Prandi, Gennaro De Libero, et Germain Puzo. 2009. « Fatty Acyl Structures of *Mycobacterium Tuberculosis* Sulfoglycolipid Govern T Cell Response ». *The Journal of Immunology* 182 (11): 7030-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804044>.
- Gumperz, Jenny E, Christopher Roy, Anna Makowska, Deirdre Lum, Masahiko Sugita, Theresa Podrebarac, Yasuhiko Koezuka, et al. 2000. « Murine CD1d-Restricted T Cell Recognition of Cellular Lipids ». *Immunity* 12 (2): 211-21. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80174-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80174-0).
- Han, M., L.I. Hannick, M. DiBrino, et M.A. Robinson. 1999. « Polymorphism of Human CD1 Genes ». *Tissue Antigens* 54 (2): 122-27. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.1999.540202.x>.
- Hanekom, Willem A., Brian Abel, et Thomas J. Scriba. 2007. « Immunological Protection against Tuberculosis ». *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 97 (10 Pt 2): 973-77.
- Hattori, Yuki, Daisuke Morita, Nagatoshi Fujiwara, Daiki Mori, Takashi Nakamura, Hideyoshi Harashima, Sho Yamasaki, et Masahiko Sugita. 2014. « Glycerol Monomycolate Is a Novel Ligand for the Human, but Not Mouse Macrophage Inducible C-Type Lectin, Mincle ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (22): 15405-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566489>.
- Hayday, A. 1985. « Structure, Organization, and Somatic Rearrangement of T Cell Gamma Genes ». *Cell* 40 (2): 259-69. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90140-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90140-0).

- Hayday, Adrian C. 2000. «  $\Gamma\delta$  Cells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection ». *Annual Review of Immunology* 18 (1): 975-1026. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.975>.
- Herzig, Sébastien, et Reuben J. Shaw. 2018. « AMPK: Guardian of Metabolism and Mitochondrial Homeostasis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (2): 121-35. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>.
- Hill, Chris H., Georgia M. Cook, Samantha J. Spratley, Stuart Fawke, Stephen C. Graham, et Janet E. Deane. 2018. « The Mechanism of Glycosphingolipid Degradation Revealed by a GALC-SapA Complex Structure ». *Nature Communications* 9 (1): 151. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02361-y>.
- Hiromatsu, Kenji, Christopher C. Dascher, Masahiko Sugita, Cindy Gingrich-Baker, Samuel M. Behar, Kenneth P. LeClair, Michael B. Brenner, et Steven A. Porcelli. 2002. « Characterization of Guinea-pig Group 1 CD1 Proteins ». *Immunology* 106 (2): 159-72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01422.x>.
- Hu, Ao, Xue-Tong Zhao, Heng Tu, Ting Xiao, Ting Fu, Yan Wang, Yong Liu, Xiong-Jie Shi, Jie Luo, et Bao-Liang Song. 2018. « PIP4K2A Regulates Intracellular Cholesterol Transport through Modulating PI(4,5)P2 Homeostasis ». *Journal of Lipid Research* 59 (3): 507-14. <https://doi.org/10.1194/jlr.M082149>.
- Huang, Shouxiong, Tan-Yun Cheng, David C. Young, Emilie Layre, Cressida A. Madigan, John Shires, Vincenzo Cerundolo, John D. Altman, et D. Branch Moody. 2011. « Discovery of Deoxyceramides and Diacylglycerols as CD1b Scaffold Lipids among Diverse Groove-Blocking Lipids of the Human CD1 System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (48): 19335-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112969108>.
- Huang, Shouxiong, Adam Shahine, Tan-Yun Cheng, Yi-Ling Chen, Soo Weei Ng, Gautham R. Balaji, Rachel Farquhar, et al. 2023. « CD1 Lipidomes Reveal Lipid-Binding Motifs and Size-Based Antigen-Display Mechanisms ». *Cell* 186 (21): 4583-4596.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.08.022>.
- Hüttinger, Robert, Günther Staffler, Otto Majdic, et Hannes Stockinger. 1999. « Analysis of the Early Biogenesis of CD1b: Involvement of the Chaperones Calnexin and Calreticulin, the Proteasome and B2-Microglobulin ». *International Immunology* 11 (10): 1615-23. <https://doi.org/10.1093/intimm/11.10.1615>.
- Ioannou, Yiannis A. 2000. « The Structure and Function of the Niemann–Pick C1 Protein ». *Molecular Genetics and Metabolism* 71 (1-2): 175-81. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3061>.
- Ishikawa, Eri, Tetsuaki Ishikawa, Yasu S. Morita, Kenji Toyonaga, Hisakata Yamada, Osamu Takeuchi, Taroh Kinoshita, Shizuo Akira, Yasunobu Yoshikai, et Sho Yamasaki. 2009. « Direct Recognition of the Mycobacterial Glycolipid, Trehalose Dimycolate, by C- Type

- Lectin Mincle ». *Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 2879-88. <https://doi.org/10.1084/jem.20091750>.
- Iwai, Naoharu, Tomohiro Katsuya, Toshifumi Mannami, Jitsuo Higaki, Toshio Ogihara, Koichi Kokame, Jun Ogata, et Shunroku Baba. 2002. « Association Between **SAH**, an Acyl-CoA Synthetase Gene, and Hypertriglyceridemia, Obesity, and Hypertension ». *Circulation* 105 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1161/hc0102.101780>.
- Jahng, Alex, Igor Maricic, Carlos Aguilera, Susanna Cardell, Ramesh C. Halder, et Vipin Kumar. 2004. « Prevention of Autoimmunity by Targeting a Distinct, Noninvariant CD1d-Reactive T Cell Population Reactive to Sulfatide ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (7): 947-57. <https://doi.org/10.1084/jem.20031389>.
- James, Charlotte A., Yuexin Xu, Melissa S. Aguilar, Lichen Jing, Erik D. Layton, Martine Gilleron, Adriaan J. Minnaard, et al. 2022. « CD4 and CD8 Co-Receptors Modulate Functional Avidity of CD1b-Restricted T Cells ». *Nature Communications* 13 (1): 78. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27764-w>.
- James, Charlotte A., Krystle K.Q. Yu, Martine Gilleron, Jacques Prandi, Vijayendar R. Yedulla, Zuzanna Z. Moleda, Eleonora Diamanti, et al. 2018. « CD1b Tetramers Identify T Cells That Recognize Natural and Synthetic Diacylated Sulfoglycolipids from Mycobacterium Tuberculosis ». *Cell Chemical Biology* 25 (4): 392-402.e14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.01.006>.
- Jarrett, Rachael, Mariolina Salio, Antonia Lloyd-Lavery, Sumithra Subramaniam, Elvire Bourgeois, Charles Archer, Ka Lun Cheung, et al. 2016. « Filaggrin Inhibits Generation of CD1a Neolipid Antigens by House Dust Mite-Derived Phospholipase ». *Science Translational Medicine* 8 (325). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad6833>.
- Jayawardena-Wolf, Jayanthi, et Albert Bendelac. 2001. « CD1 and Lipid Antigens: Intracellular Pathways for Antigen Presentation ». *Current Opinion in Immunology* 13 (1): 109-13. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00190-4).
- Jian, Jinlong, Qing-Yun Tian, Aubryanna Hettinghouse, Shuai Zhao, Helen Liu, Jianlu Wei, Gabriele Grunig, et al. 2016. « Progranulin Recruits HSP70 to  $\beta$ -Glucocerebrosidase and Is Therapeutic Against Gaucher Disease ». *EBioMedicine* 13 (novembre):212-24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.010>.
- Joao, Ines, Paula Cristovao, Liliana Antunes, Baltazar Nunes, et Luisa Jordao. 2014. « Identification of Nontuberculous Mycobacteria by Partial Gene Sequencing and Public Databases ». *International Journal of Mycobacteriology* 3 (2): 144-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.04.001>.
- Kang, S.-J. 2002. « Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules ». *The EMBO Journal* 21 (7): 1650-60. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1650>.
- Kang, Suk-Jo, et Peter Cresswell. 2002. « Calnexin, Calreticulin, and ERp57 Cooperate in

- Disulfide Bond Formation in Human CD1d Heavy Chain ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44838-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207831200>.
- . 2004. « Saposins Facilitate CD1d-Restricted Presentation of an Exogenous Lipid Antigen to T Cells ». *Nature Immunology* 5 (2): 175-81. <https://doi.org/10.1038/ni1034>.
- Kasinrerk, W., T. Baumruker, O. Majdic, W. Knapp, et H. Stockinger. 1993. « CD1 Molecule Expression on Human Monocytes Induced by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 150 (2): 579-84.
- Kawano, Tetsu, Junqing Cui, Yasuhiko Koezuka, Isao Toura, Yoshikatsu Kaneko, Kazuhiro Motoki, Hitomi Ueno, et al. 1997. « CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of V $\alpha$  14 NKT Cells by Glycosylceramides ». *Science* 278 (5343): 1626-29. <https://doi.org/10.1126/science.278.5343.1626>.
- Kawasaki, Takumi, et Taro Kawai. 2014. « Toll-Like Receptor Signaling Pathways ». *Frontiers in Immunology* 5 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
- Keller, Hansjörg, Abderrahim Mahfoudi, Christine Dreyer, Abdelmadjid K. Hihi, Jeffrey Medin, Keiko Ozato, et Walter Wahli. 1993. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Lipid Metabolism<sup>a</sup> ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 684 (1): 157-73. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb32279.x>.
- Kim, Hyun Sil, Jorge Garcia, Mark Exley, Kevin W. Johnson, Steven P. Balk, et Richard S. Blumberg. 1999. « Biochemical Characterization of CD1d Expression in the Absence of B2-Microglobulin ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (14): 9289-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9289>.
- Kim, Young Kyu, Jeong Ho Hwang, et Hoon Taek Lee. 2022. « Differential Susceptibility to Lipopolysaccharide Affects the Activation of Toll-like-Receptor 4 Signaling in THP-1 Cells and PMA-Differentiated THP-1 Cells ». *Innate Immunity* 28 (3-4): 122-29. <https://doi.org/10.1177/17534259221100170>.
- Kinjo, Yuki, Emmanuel Tupin, Douglass Wu, Masakazu Fujio, Raquel Garcia-Navarro, Mohammed Rafii-El-Idrissi Benhnia, Dirk M Zajonc, et al. 2006. « Natural Killer T Cells Recognize Diacylglycerol Antigens from Pathogenic Bacteria ». *Nature Immunology* 7 (9): 978-86. <https://doi.org/10.1038/ni1380>.
- Kinjo, Yuki, Douglass Wu, Gisen Kim, Guo-Wen Xing, Michael A. Poles, David D. Ho, Moriya Tsuji, Kazuyoshi Kawahara, Chi-Huey Wong, et Mitchell Kronenberg. 2005. « Recognition of Bacterial Glycosphingolipids by Natural Killer T Cells ». *Nature* 434 (7032): 520-25. <https://doi.org/10.1038/nature03407>.
- Kishimoto, Y., M. Hiraiwa, et J. S. O'Brien. 1992. « Saposins: Structure, Function, Distribution, and Molecular Genetics ». *Journal of Lipid Research* 33 (9): 1255-67.
- Klein, Eva, Farkas Vánky, Hannah Ben-Bassat, Hava Neumann, Peter Ralph, Jesper Zeuthen, et Aaron Polliack. 1976. « Properties of the K562 Cell Line, Derived from a

- Patient with Chronic Myeloid Leukemia ». *International Journal of Cancer* 18 (4): 421-31. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910180405>.
- Koch, Michael, Victoria S Stronge, Dawn Shepherd, Stephan D Gadola, Bini Mathew, Gerd Ritter, Alan R Fersht, et al. 2005. « The Crystal Structure of Human CD1d with and without  $\alpha$ -Galactosylceramide ». *Nature Immunology* 6 (8): 819-26. <https://doi.org/10.1038/ni1225>.
- Kruh-Garcia, Nicole A., Lisa M. Wolfe, et Karen M. Dobos. 2015. « Deciphering the Role of Exosomes in Tuberculosis ». *Tuberculosis* 95 (1): 26-30. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.10.010>.
- Lahey, Timothy, Dominick Laddy, Krystal Hill, Jacqueline Schaeffer, Alison Hogg, James Keeble, Belinda Dagg, Mei Mei Ho, Robert D. Arbeit, et C. Fordham Von Reyn. 2016. « Immunogenicity and Protective Efficacy of the DAR-901 Booster Vaccine in a Murine Model of Tuberculosis ». Édité par Thomas Jens Scriba. *PLOS ONE* 11 (12): e0168521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168521>.
- Lang, Roland. 2013. « Recognition of the mycobacterial cord factor by Mincle: relevance for granuloma formation and resistance to tuberculosis ». *Frontiers in Immunology* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00005>.
- Lantz, O, et A Bendelac. 1994. « An Invariant T Cell Receptor Alpha Chain Is Used by a Unique Subset of Major Histocompatibility Complex Class I-Specific CD4+ and CD4-8- T Cells in Mice and Humans. » *The Journal of Experimental Medicine* 180 (3): 1097-1106. <https://doi.org/10.1084/jem.180.3.1097>.
- Larrouy-Maumus, Gérald, Emilie Layre, Simon Clark, Jacques Prandi, Emma Rayner, Marco Lepore, Gennaro De Libero, Ann Williams, Germain Puzo, et Martine Gilleron. 2017. « Protective Efficacy of a Lipid Antigen Vaccine in a Guinea Pig Model of Tuberculosis ». *Vaccine* 35 (10): 1395-1402. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.01.079>.
- Law, Cheh Tat, Frank Camacho, Luis F. Garcia-Alles, Martine Gilleron, Maria E. Sarmiento, Mohd Nor Norazmi, Armando Acosta, et Yee Siew Choong. 2019. « Interactions of Domain Antibody (dAbk11) with Mycobacterium Tuberculosis Ac2SGL in Complex with CD1b ». *Tuberculosis* 114 (janvier):9-16. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.11.002>.
- Layre, Emilie, Diane Cala-De Paepe, Gérald Larrouy-Maumus, Julien Vaubourgeix, Sathish Mundayoor, Buko Lindner, Germain Puzo, et Martine Gilleron. 2011. « Deciphering Sulfoglycolipids of Mycobacterium Tuberculosis ». *Journal of Lipid Research* 52 (6): 1098-1110. <https://doi.org/10.1194/jlr.M013482>.
- Layre, Emilie, Anthony Collmann, Max Bastian, Sabrina Mariotti, Jerzy Czaplicki, Jacques Prandi, Lucia Mori, et al. 2009. « Mycolic Acids Constitute a Scaffold for Mycobacterial Lipid Antigens Stimulating CD1-Restricted T Cells ». *Chemistry & Biology* 16 (1): 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.11.008>.

- Layton, Erik D., Soumik Barman, Damien B. Wilburn, Krystle K. Q. Yu, Malisa T. Smith, John D. Altman, Thomas J. Scriba, et al. 2021. « T Cells Specific for a Mycobacterial Glycolipid Expand after Intravenous Bacillus Calmette–Guérin Vaccination ». *The Journal of Immunology* 206 (6): 1240-50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001065>.
- Lee, Myungsun, Jongseok Lee, Matthew W. Carroll, Hongjo Choi, Seonyeong Min, Taeksun Song, Laura E. Via, et al. 2012. « Linezolid for Treatment of Chronic Extensively Drug-Resistant Tuberculosis ». *New England Journal of Medicine* 367 (16): 1508-18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1201964>.
- Lee, Sujin, et Minh Trang Nguyen. 2015. « Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases ». *Immune Network* 15 (2): 51. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>.
- León, Luis, Raju V. V. Tatituri, Rosa Grenha, Ying Sun, Duarte C. Barral, Adriaan J. Minnaard, Veemal Bhowruth, et al. 2012. « Saposins Utilize Two Strategies for Lipid Transfer and CD1 Antigen Presentation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (12): 4357-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200764109>.
- Leslie, David S., Christopher C. Dascher, Katherine Cembrola, Maria A. Townes, David L. Hava, Lynne C. Hugendubler, Elisabetta Mueller, et al. 2008. « Serum Lipids Regulate Dendritic Cell CD1 Expression and Function ». *Immunology* 125 (3): 289-301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02842.x>.
- Li, S. C., H. Kihara, S. Serizawa, Y. T. Li, A. L. Fluharty, J. S. Mayes, et L. J. Shapiro. 1985. « Activator Protein Required for the Enzymatic Hydrolysis of Cerebroside Sulfate. Deficiency in Urine of Patients Affected with Cerebroside Sulfatase Activator Deficiency and Identity with Activators for the Enzymatic Hydrolysis of GM1 Ganglioside and Globotriaosylceramide ». *The Journal of Biological Chemistry* 260 (3): 1867-71.
- Li, Sha, Hak-Jong Choi, Kyrie Felio, et Chyung-Ru Wang. 2011. « Autoreactive CD1b-Restricted T Cells: A New Innate-like T-Cell Population That Contributes to Immunity against Infection ». *Blood* 118 (14): 3870-78. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-341941>.
- Linke, Thomas, Gundo Wilkening, Stephanie Lansmann, Heidi Moczall, Oliver Bartelsen, Judith Weisgerber, et Konrad Sandhoff. 2001. « Stimulation of Acid Sphingomyelinase Activity by Lysosomal Lipids and Sphingolipid Activator Proteins ». *Biological Chemistry* 382 (2). <https://doi.org/10.1515/BC.2001.035>.
- Liou, Heng-Ling, Sayali S. Dixit, Sujuan Xu, G. Stephen Tint, Ann M. Stock, et Peter Lobel. 2006. « NPC2, the Protein Deficient in Niemann-Pick C2 Disease, Consists of Multiple Glycoforms That Bind a Variety of Sterols ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (48): 36710-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608743200>.
- Locatelli-Hoops, Silvia, Natascha Remmel, Ralf Klingenstein, Bernadette Breiden, Maksim Rossocha, Maike Schoeniger, Christine Koenigs, Wolfram Saenger, et Konrad Sandhoff.

2006. « Saposin A Mobilizes Lipids from Low Cholesterol and High Bis(Monoacylglycerol)Phosphate-Containing Membranes ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (43): 32451-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607281200>.
- Lopez, Kattya, Sarah K. Iwany, Sara Suliman, Josephine F. Reijneveld, Tonatiuh A. Ocampo, Judith Jimenez, Roger Calderon, et al. 2020. « CD1b Tetramers Broadly Detect T Cells That Correlate With Mycobacterial Exposure but Not Tuberculosis Disease State ». *Frontiers in Immunology* 11 (février):199. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00199>.
- Lu, Feiran, Qiren Liang, Lina Abi-Mosleh, Akash Das, Jef K De Brabander, Joseph L Goldstein, et Michael S Brown. 2015. « Identification of NPC1 as the Target of U18666A, an Inhibitor of Lysosomal Cholesterol Export and Ebola Infection ». *eLife* 4 (décembre). <https://doi.org/10.7554/elife.12177>.
- Luoma, Adrienne M., Caitlin D. Castro, et Erin J. Adams. 2014. «  $\Gamma\delta$  T Cell Surveillance via CD1 Molecules ». *Trends in Immunology* 35 (12): 613-21. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.09.003>.
- Luquin, M, V Ausina, F López Calahorra, F Belda, M García Barceló, C Celma, et G Prats. 1991. « Evaluation of Practical Chromatographic Procedures for Identification of Clinical Isolates of Mycobacteria ». *Journal of Clinical Microbiology* 29 (1): 120-30. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.1.120-130.1991>.
- Ly, Dalam, Anne G. Kasmar, Tan-Yun Cheng, Annemieke De Jong, Shouxiong Huang, Sobhan Roy, Apoorva Bhatt, et al. 2013. « CD1c Tetramers Detect Ex Vivo T Cell Responses to Processed Phosphomycoketide Antigens ». *Journal of Experimental Medicine* 210 (4): 729-41. <https://doi.org/10.1084/jem.20120624>.
- Ly, Dalam, et D. Branch Moody. 2014. « The CD1 Size Problem: Lipid Antigens, Ligands, and Scaffolds ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (16): 3069-79. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1603-6>.
- Macedo, Maria Fatima, Rui Quinta, Catia Sofia Pereira, et Maria Clara Sa Miranda. 2012. « Enzyme Replacement Therapy Partially Prevents Invariant Natural Killer T Cell Deficiency in the Fabry Disease Mouse Model ». *Molecular Genetics and Metabolism* 106 (1): 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.02.014>.
- Maeda, Norihiro, Jérôme Nigou, Jean-Louis Herrmann, Mary Jackson, Ali Amara, Philippe Henri Lagrange, Germain Puzo, Brigitte Gicquel, et Olivier Neyrolles. 2003. « The Cell Surface Receptor DC-SIGN Discriminates between Mycobacterium Species through Selective Recognition of the Mannose Caps on Lipoarabinomannan ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 5513-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200586200>.
- Maggi, N., C.R. Pasqualucci, R. Ballotta, et P. Sensi. 1966. « Rifampicin: A New Orally Active Rifamycin ». *Chemotherapy* 11 (5): 285-92. <https://doi.org/10.1159/000220462>.
- Maître, Blandine, Catherine Angénieux, Jean Salamero, Daniel Hanau, Dominique Fricker, François Signorino, Fabienne Proamer, et al. 2008. « Control of the Intracellular Pathway of CD1e ». *Traffic* 9 (4): 431-45. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00707.x>.

- Maître, Blandine, Catherine Angénioux, Virginie Wurtz, Emilie Layre, Martine Gilleron, Anthony Collmann, Sabrina Mariotti, et al. 2009. « The Assembly of CD1e Is Controlled by an N-Terminal Propeptide Which Is Processed in Endosomal Compartments ». *Biochemical Journal* 419 (3): 661-68. <https://doi.org/10.1042/BJ20082204>.
- Malone, L., A. Schurr, H. Lindh, D. McKENZIE, J. S. Kiser, et J. H. Williams. 1952. « The Effect of Pyrazinamide (Aldinamide) on Experimental Tuberculosis in Mice ». *American Review of Tuberculosis* 65 (5): 511-18.
- Manolova, Vania, Magdalena Kistowska, Samantha Paoletti, Gabriel M. Baltariu, Huguette Bausinger, Daniel Hanau, Lucia Mori, et Gennaro De Libero. 2006. « Functional CD1aIs Stabilized by Exogenous Lipids ». *European Journal of Immunology* 36 (5): 1083-92. <https://doi.org/10.1002/eji.200535544>.
- Marrakchi, Hedia, Marie-Antoinette Lanéelle, et Mamadou Daffé. 2014. « Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond ». *Chemistry & Biology* 21 (1): 67-85. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>.
- Matsuda, J. 2001. « A mutation in the saposin A domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene results in a late-onset, chronic form of globoid cell leukodystrophy in the mouse ». *Human Molecular Genetics* 10 (11): 1191-99. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.11.1191>.
- Matsumura, Yoshihiro, Nobuhiro Ban, et Nobuya Inagaki. 2008. « Aberrant Catalytic Cycle and Impaired Lipid Transport into Intracellular Vesicles in ABCA3 Mutants Associated with Nonfatal Pediatric Interstitial Lung Disease ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295 (4): L698-707. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90352.2008>.
- Mattner, Jochen, Kristin L. DeBord, Nahed Ismail, Randal D. Goff, Carlos Cantu, Dapeng Zhou, Pierre Saint-Mezard, et al. 2005. « Exogenous and Endogenous Glycolipid Antigens Activate NKT Cells during Microbial Infections ». *Nature* 434 (7032): 525-29. <https://doi.org/10.1038/nature03408>.
- McNeil, M., M. Daffe, et P. J. Brennan. 1990. « Evidence for the Nature of the Link between the Arabinogalactan and Peptidoglycan of Mycobacterial Cell Walls ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (30): 18200-206.
- Mehl, E., et H. Jatzkewitz. 1964. « [A cerebrosidesulfatase from swine kidney] ». *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 339 (1): 260-76.
- Mellman, Ira. 1989. « Organelles Observed: *Lysosomes* . Eric Holtzman. Plenum, New York, 1989. Xiv, 439 Pp., Illus. \$59.50. Cellular Organelles. » *Science* 244 (4906): 853-54. <https://doi.org/10.1126/science.244.4906.853>.
- Mendoza, L., J. Bubeník, M. Indrová, J. Bieblová, V. Vonka, et J. Símová. 2002. « Freezing and Thawing of Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Does Not Alter Their Immunophenotype and Antigen Presentation Characteristics ». *Folia Biologica* 48 (6):

- Minnikin, D. E., G. Dobson, D. Sesardic, et M. Ridell. 1985. « Mycolipenates and Mycolipanolates of Trehalose from Mycobacterium Tuberculosis ». *Microbiology* 131 (6): 1369-74. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-6-1369>.
- Mitchison, Denis A. 2005. « The Diagnosis and Therapy of Tuberculosis During the Past 100 Years ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171 (7): 699-706. <https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1603OE>.
- Montamat-Sicotte, Damien J., Kerry A. Millington, Carrie R. Willcox, Suzie Hingley-Wilson, Sarah Hackforth, John Innes, Onn Min Kon, et al. 2011. « A Mycolic Acid-Specific CD1-Restricted T Cell Population Contributes to Acute and Memory Immune Responses in Human Tuberculosis Infection ». *Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2493-2503. <https://doi.org/10.1172/JCI46216>.
- Moody, D. Branch, Gurtyal S. Besra, Ian A. Wilson, et Steven A. Porcelli. 1999. « The Molecular Basis of CD 1 -mediated Presentation of Lipid Antigens ». *Immunological Reviews* 172 (1): 285-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01373.x>.
- Moody, D. Branch, Volker Briken, Tan-Yun Cheng, Carme Roura-Mir, Mark R. Guy, David H. Geho, Mark L. Tykocinski, Gurdyal S. Besra, et Steven A. Porcelli. 2002. « Lipid Length Controls Antigen Entry into Endosomal and Nonendosomal Pathways for CD1b Presentation ». *Nature Immunology* 3 (5): 435-42. <https://doi.org/10.1038/ni780>.
- Moody, D Branch, et Rachel N Cotton. 2017. « Four Pathways of CD1 Antigen Presentation to T Cells ». *Current Opinion in Immunology* 46 (juin):127-33. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.013>.
- Moody, D. Branch, Bruce B. Reinhold, Mark R. Guy, Evan M. Beckman, Daphney E. Frederique, Stephen T. Furlong, Song Ye, et al. 1997. « Structural Requirements for Glycolipid Antigen Recognition by CD1b-Restricted T Cells ». *Science* 278 (5336): 283-86. <https://doi.org/10.1126/science.278.5336.283>.
- Moody, D. Branch, David C. Young, Tan-Yun Cheng, Jean-Pierre Rosat, Carme Roura-mir, Peter B. O'Connor, Dirk M. Zajonc, et al. 2004. « T Cell Activation by Lipopeptide Antigens ». *Science* 303 (5657): 527-31. <https://doi.org/10.1126/science.1089353>.
- Morgun, Eva, Jennifer Zhu, Sultan Almunif, Sharan Bobbala, Melissa S Aguilar, Junzhong Wang, Kathleen Conner, et al. 2023. « Vaccination with Mycobacterial Lipid Loaded Nanoparticle Leads to Lipid Antigen Persistence and Memory Differentiation of Antigen-Specific T Cells ». *eLife* 12 (octobre):RP87431. <https://doi.org/10.7554/eLife.87431>.
- Morimoto, S, B M Martin, Y Yamamoto, K A Kretz, J S O'Brien, et Y Kishimoto. 1989. « Saposin A: Second Cerebrosidase Activator Protein. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (9): 3389-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.9.3389>.
- Morita, Masahiro, Kazuhiro Motoki, Kohji Akimoto, Takenori Natori, Teruyuki Sakai, Eiji Sawa, Kazuo Yamaji, Yasuhiko Koezuka, Eiichi Kobayashi, et Hideaki Fukushima.

1995. « Structure-Activity Relationship of .Alpha.-Galactosylceramides against B16-Bearing Mice ». *Journal of Medicinal Chemistry* 38 (12): 2176-87. <https://doi.org/10.1021/jm00012a018>.
- Morita, Masashi, Mikinori Kurisu, Yoshinori Kashiwayama, Sadaki Yokota, et Tsuneo Imanaka. 2006. « ATP-Binding and -Hydrolysis Activities of ALDP (ABCD1) and ALDRP (ABCD2), Human Peroxisomal ABC Proteins, Overexpressed in Sf21 Cells ». *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (9): 1836-42. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1836>.
- Mukherjee, Sushmita, Thwe Thwe Soe, et Frederick R. Maxfield. 1999. « Endocytic Sorting of Lipid Analogues Differing Solely in the Chemistry of Their Hydrophobic Tails ». *The Journal of Cell Biology* 144 (6): 1271-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.6.1271>.
- Munford, R. S., et J. P. Hunter. 1992. « Acyloxyacyl Hydrolase, a Leukocyte Enzyme That Deacylates Bacterial Lipopolysaccharides, Has Phospholipase, Lysophospholipase, Diacylglycerolipase, and Acyltransferase Activities in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (14): 10116-21.
- Munford, R. S., P. O. Sheppard, et P. J. O'Hara. 1995. « Saposin-like Proteins (SAPLIP) Carryout Diverse Functions on a Common Backbone Structure ». *Journal of Lipid Research* 36 (8): 1653-63.
- Munseri, Patricia, Jamila Said, Maryam Amour, Albert Magohe, Mecky Matee, Christiaan A. Rees, Todd Mackenzie, et al. 2020. « DAR-901 Vaccine for the Prevention of Infection with Mycobacterium Tuberculosis among BCG-Immunized Adolescents in Tanzania: A Randomized Controlled, Double-Blind Phase 2b Trial ». *Vaccine* 38 (46): 7239-45. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.09.055>.
- Muthukottiappan, Pathma, et Dominic Winter. 2021. « A Proteomic View on Lysosomes ». *Molecular Omics* 17 (6): 842-59. <https://doi.org/10.1039/D1MO00205H>.
- Nell, Andre S., Eva D'Iom, Patrick Bouic, Montserrat Sabaté, Ramon Bosser, Jordi Picas, Mercè Amat, Gavin Churchyard, et Pere-Joan Cardona. 2014. « Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the Novel Antituberculous Vaccine RUTI: Randomized, Placebo-Controlled Phase II Clinical Trial in Patients with Latent Tuberculosis Infection ». Édité par Ray Borrow. *PLoS ONE* 9 (2): e89612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089612>.
- Nguyen, Thi Kim Anh, Ad P. Koets, Wiebren J. Santema, Willem Van Eden, Victor P.M.G. Rutten, et Ildiko Van Rhijn. 2009. « The Mycobacterial Glycolipid Glucose Monomycolate Induces a Memory T Cell Response Comparable to a Model Protein Antigen and No B Cell Response upon Experimental Vaccination of Cattle ». *Vaccine* 27 (35): 4818-25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.078>.
- Nieuwenhuis, Edward E.S., Tetsuya Matsumoto, Mark Exley, Robbert A. Schleipman, Jonathan Glickman, Dan T. Bailey, Nadia Corazza, Sean P. Colgan, Andrew B. Onderdonk, et Richard S. Blumberg. 2002. « CD1d-Dependent Macrophage-Mediated Clearance of Pseudomonas Aeruginosa from Lung ». *Nature Medicine* 8 (6): 588-93. <https://doi.org/10.1038/nm0602-588>.

- Nigou, J. 2003. « Lipoarabinomannans: From Structure to Biosynthesis ». *Biochimie* 85 (1-2):153-66. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00048-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00048-8).
- Nigou, Jérôme, Martine Gilleron, Mauricio Rojas, Luis F. García, Martin Thurnher, et Germain Puzo. 2002. « Mycobacterial Lipoarabinomannans: Modulators of Dendritic Cell Function and the Apoptotic Response ». *Microbes and Infection* 4 (9): 945-53. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01621-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01621-0).
- Nigou, Jérôme, Claudia Zelle-Rieser, Martine Gilleron, Martin Thurnher, et Germain Puzo. 2001. « Mannosylated Lipoarabinomannans Inhibit IL-12 Production by Human Dendritic Cells: Evidence for a Negative Signal Delivered Through the Mannose Receptor ». *The Journal of Immunology* 166 (12): 7477-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7477>.
- Nishio, Kumiko, Lise Pasquet, Kaddy Camara, Julia DiSapio, Kevin S. Hsu, Shingo Kato, Anja Bloom, et al. 2024. « Lysosomal Processing of Sulfatide Analogs Alters Target NKT Cell Specificity and Immune Responses in Cancer ». *Journal of Clinical Investigation* 134 (4): e165281. <https://doi.org/10.1172/JCI165281>.
- O'Brien, J. S., S. Okada, M. W. Ho, D. L. Fillerup, M. L. Veath, et K. Adams. 1971. « Ganglioside Storage Diseases ». *Federation Proceedings* 30 (3): 956-69.
- O'Brien, John S., Keith A. Kretz, Nazneen Dewji, David A. Wenger, Fred Esch, et Arvan L. Fluharty. 1988. « Coding of Two Sphingolipid Activator Proteins (SAP-1 and SAP-2) by Same Genetic Locus ». *Science* 241 (4869): 1098-1101. <https://doi.org/10.1126/science.2842863>.
- OMS. s. d. « OMS, Global tuberculosis report, 2023 ».
- OMS « Lignes directrices consolidées de l'OMS pour le traitement de la tuberculose pharmacorésistante, 2019 ».
- Ortalo-Magné, Annick, Åse B. Andersen, et Mamadou Daffé. 1996. « The Outermost Capsular Arabinomannans and Other Mannoconjugates of Virulent and Avirulent Tubercle Bacilli ». *Microbiology* 142 (4): 927-35. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-927>.
- Ottenhoff. 2020. « A Trial of M72/AS01<sub>E</sub> Vaccine to Prevent Tuberculosis ». *New England Journal of Medicine* 382 (16): 1576-77. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001364>.
- Ozinsky, Adrian, David M. Underhill, Jason D. Fontenot, Adeline M. Hajjar, Kelly D. Smith, Christopher B. Wilson, Lea Schroeder, et Alan Aderem. 2000. « The Repertoire for Pattern Recognition of Pathogens by the Innate Immune System Is Defined by Cooperation between Toll-like Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (25): 13766-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.250476497>.
- Pabst, M. J., J. M. Gross, J. P. Brozna, et M. B. Goren. 1988. « Inhibition of Macrophage Priming by Sulfatide from Mycobacterium Tuberculosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 140 (2): 634-40.

- Paduraru, Crina, Jelena S. Bezbradica, Amit Kunte, Robert Kelly, James A. Shayman, Natacha Veerapen, Liam R. Cox, Gurdyal S. Besra, et Peter Cresswell. 2013. « Role for Lysosomal Phospholipase A2 in iNKT Cell-Mediated CD1d Recognition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (13): 5097-5102. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302923110>.
- Park, Jaehun, Hongmin Kim, Kee Woong Kwon, Hong-Hee Choi, Soon Myung Kang, Jung Joo Hong, et Sung Jae Shin. 2020. « Toll-like Receptor 4 Signaling-Mediated Responses Are Critically Engaged in Optimal Host Protection against Highly Virulent *Mycobacterium Tuberculosis* K Infection ». *Virulence* 11 (1): 430-45. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1766401>.
- Pasquale, Alberta, Scott Preiss, Fernanda Silva, et Nathalie Garçon. 2015. « Vaccine Adjuvants: From 1920 to 2015 and Beyond ». *Vaccines* 3 (2): 320-43. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>.
- Peña-Cruz, Victor, Susumu Ito, Christopher C. Dascher, Michael B. Brenner, et Masahiko Sugita. 2003. « Epidermal Langerhans Cells Efficiently Mediate CD1a-Dependent Presentation of Microbial Lipid Antigens to T Cells ». *Journal of Investigative Dermatology* 121 (3): 517-21. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12429.x>.
- Penn-Nicholson, Adam, Michele Tameris, Erica Smit, Tracey A Day, Munyaradzi Musvosvi, Lakshmi Jayashankar, Julie Vergara, et al. 2018. « Safety and Immunogenicity of the Novel Tuberculosis Vaccine ID93 + GLA-SE in BCG-Vaccinated Healthy Adults in South Africa: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1 Trial ». *The Lancet Respiratory Medicine* 6 (4): 287-98. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30077-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30077-8).
- Pereira, Catia S., et M. Fatima Macedo. 2016. « CD1-Restricted T Cells at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity ». *Journal of Immunology Research* 2016:1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/2876275>.
- Pethe, Kevin, Dana L. Swenson, Sylvie Alonso, Jennifer Anderson, Carren Wang, et David G. Russell. 2004. « Isolation of *Mycobacterium Tuberculosis* Mutants Defective in the Arrest of Phagosome Maturation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (37): 13642-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401657101>.
- Petry, Frauke, André Kotthaus, et Karen I Hirsch-Ernst. 2003. « Cloning of Human and Rat ABCA5/Abca5 and Detection of a Human Splice Variant ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 (2): 343-50. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02827-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02827-9).
- Pitarque, Sylvain, Jean-Louis Herrmann, Jean-Luc Duteyrat, Mary Jackson, Graham R. Stewart, François Lecointe, Bruno Payre, et al. 2005. « Deciphering the Molecular Bases of *Mycobacterium Tuberculosis* Binding to the Lectin DC-SIGN Reveals an Underestimated Complexity ». *Biochemical Journal* 392 (3): 615-24. <https://doi.org/10.1042/BJ20050709>.
- Pitarque, Sylvain, Gérald Larrouy-Maumus, Bruno Payré, Mary Jackson, Germain Puzo, et

- Jérôme Nigou. 2008. « The Immunomodulatory Lipoglycans, Lipoarabinomannan and Lipomannan, Are Exposed at the Mycobacterial Cell Surface ». *Tuberculosis* 88 (6): 560-65. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.04.002>.
- Porcelli, Steven, Michael B. Brenner, Julia L. Greenstein, Cox Terhorst, Steven P. Balk, et Paul A. Bleicher. 1989. « Recognition of Cluster of Differentiation 1 Antigens by Human CD4-CD8<sup>+</sup> Cytolytic T Lymphocyte ». *Nature* 341 (6241): 447-50. <https://doi.org/10.1038/341447a0>.
- Porcelli, Steven, Craig T. Morita, et Michael B. Brenner. 1992. « CD1b Restricts the Response of Human CD4-8<sup>+</sup>T Lymphocytes to a Microbial Antigen ». *Nature* 360 (6404): 593-97. <https://doi.org/10.1038/360593a0>.
- Porcelli, Steven, Courtland E. Yockey, Michael B. Brenner, et Steven P. Balk. 2014. « Pillars Article: Analysis of T Cell Antigen Receptor (TCR) Expression by Human Peripheral Blood CD4-8<sup>+</sup>  $\alpha/\beta$  T Cells Demonstrates Preferential Use of Several V $\beta$  Genes and an Invariant TCR  $\alpha$  Chain. *J. Exp. Med.* 193 (3): 977-92. *J. Exp. Med.* 193 (3): 977-92.
- Prigozy, Theodore I., Olga Naidenko, Pankaj Qasba, Dirk Elewaut, Laurent Brossay, Archana Khurana, Takenori Natori, Yasuhiko Koezuka, Ashok Kulkarni, et Mitchell
- Kronenberg. 2001. « Glycolipid Antigen Processing for Presentation by CD1d Molecules ». *Science* 291 (5504): 664-67. <https://doi.org/10.1126/science.291.5504.664>.
- Principi, Nicola, et Susanna Esposito. 2015. « The Present and Future of Tuberculosis Vaccinations ». *Tuberculosis* 95 (1): 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.10.004>.
- Puzo, Germain. 1990. « The Carbohydrate- and Lipid-Containing Cell Wall of Mycobacteria, Phenolic Glycolipids: Structure and Immunological Properties ». *Critical Reviews in Microbiology* 17 (4): 305-27. <https://doi.org/10.3109/10408419009105730>.
- Rajwani, Rahim, Sheeba Shehzad, et Gilman Kit Hang Siu. 2018. « MIRU-Profiler: A Rapid Tool for Determination of 24-Loci MIRU-VNTR Profiles from Assembled Genomes of *Mycobacterium Tuberculosis* ». *PeerJ* 6 (juillet):e5090. <https://doi.org/10.7717/peerj.5090>.
- Ray, Aurélie, Marlène Cot, Germain Puzo, Martine Gilleron, et Jérôme Nigou. 2013. « Bacterial Cell Wall Macroamphiphiles: Pathogen-/Microbe-Associated Molecular Patterns Detected by Mammalian Innate Immune System ». *Biochimie* 95 (1): 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.007>.
- Reed, Steven G., Rhea N. Coler, Wilfried Dalemans, Esterlina V. Tan, Eduardo C. DeLa Cruz, Randall J. Basaraba, Ian M. Orme, et al. 2009. « Defined Tuberculosis Vaccine, Mtb72F/AS02A, Evidence of Protection in Cynomolgus Monkeys ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (7): 2301-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712077106>.
- Reijneveld, Josephine F., Mira Holzheimer, David C. Young, Katty Lopez, Sara Suliman,

- Judith Jimenez, Roger Calderon, et al. 2021. « Synthetic Mycobacterial Diacyl Trehaloses Reveal Differential Recognition by Human T Cell Receptors and the C-Type Lectin Mincle ». *Scientific Reports* 11 (1): 2010. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81474-3>.
- Reijneveld, Josephine F., Tonatiuh A. Ocampo, Adam Shahine, Benjamin S. Gully, Pierre Vantourout, Adrian C. Hayday, Jamie Rossjohn, D. Branch Moody, et Ildiko Van Rhijn. 2020. « Human  $\Gamma\delta$  T Cells Recognize CD1b by Two Distinct Mechanisms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (37): 22944-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010545117>.
- Reinink, Peter, Michael N. T. Souter, Tan-Yun Cheng, Tamara Van Gorkom, Stefanie Lenz, Joanna Kubler-Kielb, Klemen Strle, et al. 2019. « CD1b Presents Self and *Borrelia Burgdorferi* Diacylglycerols to Human T Cells ». *European Journal of Immunology* 49 (5): 737-46. <https://doi.org/10.1002/eji.201847949>.
- Relloso, Miguel, Tan-Yun Cheng, Jin S. Im, Emilio Parisini, Carme Roura-Mir, Charles DeBono, Dirk M. Zajonc, et al. 2008. « pH-Dependent Interdomain Tethers of CD1b Regulate Its Antigen Capture ». *Immunity* 28 (6): 774-86. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.017>.
- Rezwan, Mandana, Marie-Antoinette Lanéelle, Peter Sander, et Mamadou Daffé. 2007. « Breaking down the Wall: Fractionation of Mycobacteria ». *Journal of Microbiological Methods* 68 (1): 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.016>.
- Riese, Richard J., Guo-Ping Shi, Jose Villadangos, Daniel Stetson, Christoph Driessen, Ana-Maria Lennon-Dumenil, Ching-Liang Chu, et al. 2001. « Regulation of CD1 Function and NK1.1+ T Cell Selection and Maturation by Cathepsin S ». *Immunity* 15 (6): 909-19. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00247-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00247-3).
- Roermund, Carlo W. T., Wouter F. Visser, Lodewijk IJlst, Arno Cruchten, Maxim Boek, Wim Kulik, Hans R. Waterham, et Ronald J. A. Wanders. 2008. « The Human Peroxisomal ABC Half Transporter ALDP Functions as a Homodimer and Accepts Acyl-CoA Esters ». *The FASEB Journal* 22 (12): 4201-8. <https://doi.org/10.1096/fj.08-110866>.
- Rofe, Adam P., et Paul R. Pryor. 2016. « Purification of Lysosomes Using Supraparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (4): pdb.prot084822. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot084822>.
- Rojas, Mauricio, Luis F. García, Jérôme Nigou, Germain Puzo, et Martin Olivier. 2000. « Mannosylated Lipoarabinomannan Antagonizes *Mycobacterium Tuberculosis*-Induced Macrophage Apoptosis by Altering  $Ca^{+2}$ -Dependent Cell Signaling ». *The Journal of Infectious Diseases* 182 (1): 240-51. <https://doi.org/10.1086/315676>.
- Rothchild, Alissa C., Pushpa Jayaraman, Cláudio Nunes-Alves, et Samuel M. Behar. 2014. « iNKT Cell Production of GM-CSF Controls Mycobacterium Tuberculosis ». Édité par David M. Lewinsohn. *PLoS Pathogens* 10 (1): e1003805. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003805>.

- Rothfuchs, Antonio Gigliotti, Andre Bafica, Carl G. Feng, Jackson G. Egen, David L. Williams, Gordon D. Brown, et Alan Sher. 2007. « Dectin-1 Interaction with *Mycobacterium Tuberculosis* Leads to Enhanced IL-12p40 Production by Splenic Dendritic Cells ». *The Journal of Immunology* 179 (6): 3463-71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3463>.
- Roura-Mir, Carme, Marta Catálfamo, Tan-Yun Cheng, Ellen Marqusee, Gurdyal S. Besra, Dolores Jaraquemada, et D. Branch Moody. 2005. « CD1a and CD1c Activate Intrathyroidal T Cells during Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis ». *The Journal of Immunology* 174 (6): 3773-80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3773>.
- Rousseau, Cecile, Nathalie Winter, Elisabeth Pivert, Yann Bordat, Olivier Neyrolles, Patrick Ave, Michel Huerre, Brigitte Gicquel, et Mary Jackson. 2004. « Production of Phthiocerol Dimycocerosates Protects *Mycobacterium Tuberculosis* from the Cidal Activity of Reactive Nitrogen Intermediates Produced by Macrophages and Modulates the Early Immune Response to Infection ». *Cellular Microbiology* 6 (3): 277-87. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2004.00368.x>.
- Roy, Sobhan, Dalam Ly, Caitlin D. Castro, Nan-Sheng Li, Andrew J. Hawk, John D. Altman, Stephen C. Meredith, Joseph A. Piccirilli, D. Branch Moody, et Erin J. Adams. 2016. « Molecular Analysis of Lipid-Reactive V $\delta$ 1  $\Gamma\delta$  T Cells Identified by CD1c Tetramers ». *The Journal of Immunology* 196 (4): 1933-42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502202>.
- Roy, Sobhan, Dalam Ly, Nan-Sheng Li, John D. Altman, Joseph A. Piccirilli, D. Branch Moody, et Erin J. Adams. 2014. « Molecular Basis of Mycobacterial Lipid Antigen Presentation by CD1c and Its Recognition by A $\beta$  T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (43). <https://doi.org/10.1073/pnas.1408549111>.
- Russell, Matthew Robert Geoffrey, Daniel Patrick Nickerson, et Greg Odorizzi. 2006. « Molecular Mechanisms of Late Endosome Morphology, Identity and Sorting ». *Current Opinion in Cell Biology* 18 (4): 422-28. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.06.002>.
- Sagiv, Yuval, Kelly Hudspeth, Jochen Mattner, Nicolas Schrantz, Randi K. Stern, Dapeng Zhou, Paul B. Savage, Luc Teyton, et Albert Bendelac. 2006. « Cutting Edge: Impaired Glycosphingolipid Trafficking and NKT Cell Development in Mice Lacking Niemann-Pick Type C1 Protein ». *The Journal of Immunology* 177 (1): 26-30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.26>.
- Sakai, Hiromichi, Yukiko Tanaka, Makoto Tanaka, Nobuhiro Ban, Katsuya Yamada, Yoshihiro Matsumura, Daisuke Watanabe, Mayumi Sasaki, Toru Kita, et Nobuya Inagaki. 2007. « ABCA2 Deficiency Results in Abnormal Sphingolipid Metabolism in Mouse Brain ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (27): 19692-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611056200>.
- Salazar, Gloria, Branch Craige, Bruce H. Wainer, Jun Guo, Pietro De Camilli, et Victor Faundez. 2005. « Phosphatidylinositol-4-Kinase Type II  $\alpha$  Is a Component of Adaptor

- Protein-3-Derived Vesicles ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (8): 3692-3704. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-01-0020>.
- Salgame, Padmini. 2005. « Host Innate and Th1 Responses and the Bacterial Factors That Control Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *Current Opinion in Immunology* 17 (4): 374-80. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.006>.
- Salio, Mariolina, Jonathan D. Silk, E. Yvonne Jones, et Vincenzo Cerundolo. 2014. « Biology of CD1- and MR1-Restricted T Cells ». *Annual Review of Immunology* 32 (1): 323-66. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120243>.
- Salio, Mariolina, Anneliese O. Speak, Dawn Shepherd, Paolo Polzella, Petr A. Illarionov, Natacha Veerapen, Gurdyal S. Besra, Frances M. Platt, et Vincenzo Cerundolo. 2007. « Modulation of Human Natural Killer T Cell Ligands on TLR-Mediated Antigen-Presenting Cell Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (51): 20490-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710145104>.
- Sani, Musa, Edith N. G. Houben, Jeroen Geurtsen, Jason Pierson, Karin De Punder, Maaïke Van Zon, Brigitte Wever, et al. 2010. « Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins ». Édité par Lalita Ramakrishnan. *PLoS Pathogens* 6 (3): e1000794. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000794>.
- Sardiello, Marco, Michela Palmieri, Alberto Di Ronza, Diego Luis Medina, Marta Valenza, Vincenzo Alessandro Gennarino, Chiara Di Malta, et al. 2009. « A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function ». *Science* 325 (5939): 473-77. <https://doi.org/10.1126/science.1174447>.
- Schaible, Ulrich E, Florian Winau, Peter A Sieling, Karsten Fischer, Helen L Collins, Kristine Hagens, Robert L Modlin, Volker Brinkmann, et Stefan H E Kaufmann. 2003. « Apoptosis Facilitates Antigen Presentation to T Lymphocytes through MHC-I and CD1 in Tuberculosis ». *Nature Medicine* 9 (8): 1039-46. <https://doi.org/10.1038/nm906>.
- Scharf, Louise, Nan-Sheng Li, Andrew J. Hawk, Diana Garzón, Tejia Zhang, Lisa M. Fox, Allison R. Kazen, et al. 2010. « The 2.5 Å Structure of CD1c in Complex with a Mycobacterial Lipid Reveals an Open Groove Ideally Suited for Diverse Antigen Presentation ». *Immunity* 33 (6): 853-62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.026>.
- Schlesinger, L. S., S. R. Hull, et T. M. Kaufman. 1994. « Binding of the Terminal Mannosyl Units of Lipoarabinomannan from a Virulent Strain of Mycobacterium Tuberculosis to Human Macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 152 (8): 4070-79.
- Schoenen, Hanne, Barbara Bodendorfer, Kelly Hitchens, Silvia Manzanero, Kerstin Werninghaus, Falk Nimmerjahn, Else Marie Agger, et al. 2010. « Cutting Edge: Mincle Is Essential for Recognition and Adjuvanticity of the Mycobacterial Cord Factor and Its Synthetic Analog Trehalose-Dibehenate ». *The Journal of Immunology* 184 (6): 2756-60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904013>.
- Schonteich, Eric, Gayle M. Wilson, Jemima Burden, Colin R. Hopkins, Keith Anderson, James

- R. Goldenring, et Rytis Prekeris. 2008. « The Rip11/Rab11-FIP5 and Kinesin II Complex Regulates Endocytic Protein Recycling ». *Journal of Cell Science* 121 (22): 3824-33. <https://doi.org/10.1242/jcs.032441>.
- Schorey, Jeffrey S, Yong Cheng, Prachi P Singh, et Victoria L Smith. 2015. « Exosomes and Other Extracellular Vesicles in Host–Pathogen Interactions ». *EMBO Reports* 16 (1): 24-43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>.
- Schrantz, Nicolas, Yuval Sagiv, Yang Liu, Paul B. Savage, Albert Bendelac, et Luc Teyton. 2007. « The Niemann-Pick Type C2 Protein Loads Isoglobotrihexosylceramide onto CD1d Molecules and Contributes to the Thymic Selection of NKT Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (4): 841-52. <https://doi.org/10.1084/jem.20061562>.
- Schröter, Christian J, Manuela Braun, Johannes Englert, Hermann Beck, Heide Schmid, et Hubert Kalbacher. 1999. « A Rapid Method to Separate Endosomes from Lysosomal Contents Using Differential Centrifugation and Hypotonic Lysis of Lysosomes ». *Journal of Immunological Methods* 227 (1-2): 161-68. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00079-4).
- Scriba, Thomas J., Michele Tameris, Nazma Mansoor, Erica Smit, Linda Van Der Merwe, Fatima Isaacs, Alana Keyser, et al. 2010. « Modified Vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a Novel Tuberculosis Vaccine, Is Safe in Adolescents and Children, and Induces Polyfunctional CD4<sup>+</sup> T Cells ». *European Journal of Immunology* 40 (1): 279-90. <https://doi.org/10.1002/eji.200939754>.
- Shahine, Adam, Ildiko Van Rhijn, Tan-Yun Cheng, Sarah Iwany, Stephanie Gras, D. Branch Moody, et Jamie Rossjohn. 2017. « A Molecular Basis of Human T Cell Receptor Autoreactivity toward Self-Phospholipids ». *Science Immunology* 2 (16): eaao1384. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aao1384>.
- Shamin, Maria, Tomasz H. Benedyk, Stephen C. Graham, et Janet E. Deane. 2019. « The Lipid Transfer Protein Saposin B Does Not Directly Bind CD1d for Lipid Antigen Loading ». *Wellcome Open Research* 4 (octobre):117. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15368.2>.
- Shamshiev, A., A. Donda, I. Carena, L. Mori, L. Kappos, et G. De Libero. 1999. « Self Glycolipids as T-Cell Autoantigens ». *European Journal of Immunology* 29 (5): 1667-75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199905\)29:05<1667::AID-IMMU1667>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1667::AID-IMMU1667>3.0.CO;2-U).
- Shamshiev, A., H.-J. Gober, A. Donda, Z. Mazorra, L. Mori, et G. De Libero. 2002. « Presentation of the Same Glycolipid by Different CD1 Molecules ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (8): 1013-21. <https://doi.org/10.1084/jem.20011963>.
- Shimamura, Michio, Shin-ichi Kamijo, et Petr Illarionov. 2023. « C-type Lectin Mincle-dependent and -independent Activation of Invariant NKT Cells by Exposure to *Helicobacter Pylori* A-cholesteryl Glucosides ». *The FEBS Journal* 290 (1): 134-47. <https://doi.org/10.1111/febs.16588>.

- Siegers, Gabrielle M., Emeline J. Ribot, Armand Keating, et Paula J. Foster. 2013. « Extensive Expansion of Primary Human Gamma Delta T Cells Generates Cytotoxic Effector Memory Cells That Can Be Labeled with Feraheme for Cellular MRI ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62 (3): 571-83. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1353-y>.
- Sieling, P. A., D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, et al. 1995. « CD1-Restricted T Cell Recognition of Microbial Lipoglycan Antigens ». *Science* 269 (5221): 227-30. <https://doi.org/10.1126/science.7542404>.
- Sieling, P. A., D. Jullien, M. Dahlem, T. F. Tedder, T. H. Rea, R. L. Modlin, et S. A. Porcelli. 1999. « CD1 Expression by Dendritic Cells in Human Leprosy Lesions: Correlation with Effective Host Immunity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (3): 1851-58.
- Sieling, Peter A., Steven A. Porcelli, Baochau T. Duong, Franca Spada, Barry R. Bloom, Betty Diamond, et Bevra H. Hahn. 2000. « Human Double-Negative T Cells in Systemic Lupus Erythematosus Provide Help for IgG and Are Restricted by CD1c ». *The Journal of Immunology* 165 (9): 5338-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5338>.
- Singh, Jasjot, Hadeer Elhabashy, Pathma Muthukottiappan, Markus Stepath, Martin Eisenacher, Oliver Kohlbacher, Volkmar Gieselmann, et Dominic Winter. 2022. « Cross-Linking of the Endolysosomal System Reveals Potential Flotillin Structures and Cargo ». *Nature Communications* 13 (1): 6212. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33951-0>.
- Sinkevicius, Kerstin W., Thomas R. Morrison, Praveen Kulkarni, Martha K. Caffrey Cagliostro, Sade Iriah, Samantha Malmberg, Julia Sabrick, et al. 2018. « RNaseT2 Knockout Rats Exhibit Hippocampal Neuropathology and Deficits in Memory ». *Disease Models & Mechanisms*, janvier, dmm.032631. <https://doi.org/10.1242/dmm.032631>.
- Skeiky, Yasir A. W., Mark R. Alderson, Pamela J. Owendale, Jeffrey A. Guderian, Lise Brandt, Davin C. Dillon, Antonio Campos-Neto, et al. 2004. « Differential Immune Responses and Protective Efficacy Induced by Components of a Tuberculosis Polyprotein Vaccine, Mtb72F, Delivered as Naked DNA or Recombinant Protein ». *The Journal of Immunology* 172 (12): 7618-28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7618>.
- Small, T N, R W Knowles, C Kever, N A Kernan, N Collins, R J O'Reilly, B Dupont, et N Flomenberg. 1987. « M241 (CD1) Expression on B Lymphocytes. ». *The Journal of Immunology* 138 (9): 2864-68. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.138.9.2864>.
- Song, Byeongwoon. 2022. « The Cholesterol Transport Inhibitor U18666A Interferes with Pseudorabies Virus Infection ». *Viruses* 14 (7): 1539. <https://doi.org/10.3390/v14071539>.
- Spargo, B J, L M Crowe, T Ionedá, B L Beaman, et J H Crowe. 1991. « Cord Factor (Alpha, Alpha-Trehalose 6,6'-Dimycolate) Inhibits Fusion between Phospholipid Vesicles. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (3): 737-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.3.737>.

- Speak, A. O., Platt, N., Salio, M., Taylor te Vruchte, D., Smith, D. A., Shepherd, D., Veerapen, N., Besra, G., Yanjanin, N. M., Simmons, L., Imrie, J., Wraith, J. E., Lachmann, R., Hartung, R., Runz, H., Mengel, E., Beck, M., Hendriksz, C. J., Porter, F. D., Cerundolo, V., & Platt, F. M. (2012). Invariant Natural Killer T cells are not affected by lysosomal storage in patients with Niemann-Pick disease type C. *European Journal of Immunology*, 42(7), 1886–1892. <https://doi.org/10.1002/eji.201141821>
- Spiegel, Ronen, Gideon Bach, Vivi Sury, Getu Mengistu, Bela Meidan, Stavit Shalev, Yona Shneor, Hanna Mandel, et Marsha Zeigler. 2005. « A Mutation in the Saposin A Coding Region of the Prosaposin Gene in an Infant Presenting as Krabbe Disease: First Report of Saposin A Deficiency in Humans ». *Molecular Genetics and Metabolism* 84 (2): 160-66. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.10.004>.
- Staab, J. F., D. L. Ginkel, G. B. Rosenberg, et R. S. Munford. 1994. « A Saposin-like Domain Influences the Intracellular Localization, Stability, and Catalytic Activity of Human Acyloxyacyl Hydrolase ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (38): 23736-42.
- Stenger, Steffen, et Robert L Modlin. 2002. « Control of Mycobacterium Tuberculosis through Mammalian Toll-like Receptors ». *Current Opinion in Immunology* 14 (4): 452-57. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00355-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00355-2).
- Sugita, M., S. A. Porcelli, et M. B. Brenner. 1997. « Assembly and Retention of CD1b Heavy Chains in the Endoplasmic Reticulum ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (5): 2358-65.
- Sugita, Masahiko, Xiaochun Cao, Gerald F.M. Watts, Rick A. Rogers, Juan S. Bonifacino, et Michael B. Brenner. 2002. « Failure of Trafficking and Antigen Presentation by CD1 in AP-3-Deficient Cells ». *Immunity* 16 (5): 697-706. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00311-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00311-4).
- Sugita, Masahiko, Robin M. Jackman, Elly Van Donselaar, Samuel M. Behar, Rick A. Rogers, Peter J. Peters, Michael B. Brenner, et Steven A. Porcelli. 1996. « Cytoplasmic Tail- Dependent Localization of CD1b Antigen-Presenting Molecules to MIICs ». *Science* 273 (5273): 349-52. <https://doi.org/10.1126/science.273.5273.349>.
- Sugita, Masahiko, Peter J. Peters, et Michael B. Brenner. 2000. « Pathways for Lipid Antigen Presentation by CD1 Molecules: Nowhere for Intracellular Pathogens to Hide ». *Traffic* 1 (4): 295-300. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010401.x>.
- Sun, Y., D. P. Witte, H. Ran, M. Zamzow, S. Barnes, H. Cheng, X. Han, et al. 2008. « Neurological Deficits and Glycosphingolipid Accumulation in Saposin B Deficient Mice ». *Human Molecular Genetics* 17 (15): 2345-56. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn135>.
- Sun, Yong-Jiang, Richard Bellamy, Ann S. G. Lee, Sze Ta Ng, Sindhu Ravindran, Sin-Yew Wong, Camille Loch, Philip Supply, et Nicholas I. Paton. 2004. « Use of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing To Examine Genetic Diversity of *Mycobacterium Tuberculosis* in Singapore ». *Journal of Clinical Microbiology* 42 (5): 1986-93. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1986-1993.2004>.

Szakacs, Gergely, et Rupert Abele. 2020. « An Inventory of Lysosomal ABC Transporters ». *FEBS Letters* 594 (23): 3965-85. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13967>.

Szatmari, Istvan, Peter Gogolak, Jin Seol Im, Balazs Dezso, Eva Rajnavolgyi, et Laszlo Nagy. 2004. « Activation of PPAR $\gamma$  Specifies a Dendritic Cell Subtype Capable of Enhanced Induction of iNKT Cell Expansion ». *Immunity* 21 (1): 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.003>.

Szatmari, Istvan, Attila Pap, Ralph Rühl, Jiang-Xing Ma, Petr A. Illarionov, Gurdyal S. Besra, Eva Rajnavolgyi, Balazs Dezso, et Laszlo Nagy. 2006. « PPAR $\gamma$  Controls CD1d Expression by Turning on Retinoic Acid Synthesis in Developing Human Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (10): 2351-62. <https://doi.org/10.1084/jem.20060141>.

Tailleux, Ludovic, Olivier Schwartz, Jean-Louis Herrmann, Elisabeth Pivert, Mary Jackson, Ali Amara, Luc Legres, et al. 2003. « DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium Tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 197 (1): 121-27. <https://doi.org/10.1084/jem.20021468>.

Tait, Dereck R., Mark Hatherill, Olivier Van Der Meeren, Ann M. Ginsberg, Elana Van Brakel, Bruno Salaun, Thomas J. Scriba, et al. 2019. « Final Analysis of a Trial of M72/AS01<sub>E</sub> Vaccine to Prevent Tuberculosis ». *New England Journal of Medicine* 381 (25): 2429-39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1909953>.

Tameris, Michele D, Mark Hatherill, Bernard S Landry, Thomas J Scriba, Margaret Ann Snowden, Stephen Lockhart, Jacqueline E Shea, et al. 2013. « Safety and Efficacy of MVA85A, a New Tuberculosis Vaccine, in Infants Previously Vaccinated with BCG: A Randomised, Placebo-Controlled Phase 2b Trial ». *The Lancet* 381 (9871): 1021-28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60177-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60177-4).

Thomas, J. P., C. O. Baughn, R. G. Wilkinson, et R. G. Shepherd. 1961. « A New Synthetic Compound with Antituberculous Activity in Mice: Ethambutol (Dextro-2,2'-(Ethylenediimino)-Di-1-Butanol) ». *The American Review of Respiratory Disease* 83 (juin):891-93. <https://doi.org/10.1164/arrd.1961.83.6.891>.

Tortoli, Enrico. 2003. « Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: The New Mycobacteria of the 1990s ». *Clinical Microbiology Reviews* 16 (2): 319-54. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.319-354.2003>.

Tortoli 2006. « The New Mycobacteria: An Update ». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 48 (2): 159-78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00123.x>.

Tourne, Sylvie, Blandine Maitre, Anthony Collmann, Emilie Layre, Sabrina Mariotti, François Signorino-Gelo, Caroline Loch, et al. 2008. « Cutting Edge: A Naturally Occurring Mutation in CD1e Impairs Lipid Antigen Presentation ». *The Journal of Immunology* 180 (6): 3642-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3642>.

Tsuchiya, Shigeru, Michiko Yamabe, Yoshiko Yamaguchi, Yasuko Kobayashi, Tasuke Konno, et Kei-ya Tada. 1980. « Establishment and Characterization of a Human Acute

- Monocytic Leukemia Cell Line (THP-1) ». *International Journal of Cancer* 26 (2): 171-76. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>.
- Ulrichs, Timo, et Stefan He Kaufmann. 2006. « New Insights into the Function of Granulomas in Human Tuberculosis ». *The Journal of Pathology* 208 (2): 261-69. <https://doi.org/10.1002/path.1906>.
- Vaccaro, A. M., M. Motta, M. Tatti, S. Scarpa, L. Masuelli, M. Bhat, M. T. Vanier, A. Tytki-Szymanska, et R. Salvioli. 2010. « Saposin C Mutations in Gaucher Disease Patients Resulting in Lysosomal Lipid Accumulation, Saposin C Deficiency, but Normal Prosaposin Processing and Sorting ». *Human Molecular Genetics* 19 (15): 2987-97. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq204>.
- Van De Griend, R.J., B.A. Van Krimpen, S.J.L. Bol, A. Thompson, et R.L.H. Bolhuis. 1984. « Rapid Expansion of Human Cytotoxic T Cell Clones: Growth Promotion by a Heat- Labile Serum Component and by Various Types of Feeder Cells ». *Journal of Immunological Methods* 66 (2): 285-98. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90340-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90340-5).
- Van De Wal, Yvonne, Nadia Corazza, Matthieu Allez, Lloyd F Mayer, Hideki Iijima, Mark Ryan, Steven Cornwall, et al. 2003. « Delineation of a CD1d-Restricted Antigen Presentation Pathway Associated with Human and Mouse Intestinal Epithelial Cells ». *Gastroenterology* 124 (5): 1420-31. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00219-1](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00219-1).
- Van Der Meeren, Olivier, Mark Hatherill, Videlis Nduba, Robert J. Wilkinson, Monde Muyoyeta, Elana Van Brakel, Helen M. Ayles, et al. 2018. « Phase 2b Controlled Trial of M72/AS01 E Vaccine to Prevent Tuberculosis ». *New England Journal of Medicine* 379 (17): 1621-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal803484>.
- Van Der Wel, Nicole N., Masahiko Sugita, Donna M. Fluitsma, Xiaochun Cao, Gerty Schreibelt, Michael B. Brenner, et Peter J. Peters. 2003. « CD1 and Major Histocompatibility Complex II Molecules Follow a Different Course during Dendritic Cell Maturation ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (8): 3378-88. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0744>.
- Van Rhijn, Ildiko, Nicholas A. Gherardin, Anne Kasmar, Wilco De Jager, Daniel G. Pellicci, Lyudmila Kostenko, Li Lynn Tan, et al. 2014. « TCR Bias and Affinity Define Two Compartments of the CD1b–Glycolipid-Specific T Cell Repertoire ». *The Journal of Immunology* 192 (9): 4054-60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400158>.
- Van Rhijn, Ildiko, Sarah K. Iwany, Peter Fodran, Tan-Yun Cheng, Laurent Gapin, Adriaan J. Minnaard, et D. Branch Moody. 2017. « CD1b-mycolic Acid Tetramers Demonstrate T-cell Fine Specificity for Mycobacterial Lipid Tails ». *European Journal of Immunology* 47 (9): 1525-34. <https://doi.org/10.1002/eji.201747062>.
- Van Rhijn, Ildiko, Anne Kasmar, Annemieke De Jong, Stephanie Gras, Mugdha Bhati, MariekeE Doorenspleet, Niek De Vries, et al. 2013. « A Conserved Human T Cell Population Targets Mycobacterial Antigens Presented by CD1b ». *Nature Immunology* 14 (7): 706-13. <https://doi.org/10.1038/ni.2630>.

- Van Rhijn, Ildiko, Twan Van Berlo, Tamara Hilmenyuk, Tan-Yun Cheng, Benjamin J. Wolf, Raju V. V. Tatituri, Adam P. Uldrich, et al. 2016. « Human Autoreactive T Cells Recognize CD1b and Phospholipids ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (2): 380-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520947112>.
- Van Rhijn, Ildiko, David C. Young, Annemieke De Jong, Jenny Vazquez, Tan-Yun Cheng, Rahul Talekar, Duarte C. Barral, et al. 2009. « CD1c Bypasses Lysosomes to Present a Lipopeptide Antigen with 12 Amino Acids ». *Journal of Experimental Medicine* 206 (6): 1409-22. <https://doi.org/10.1084/jem.20082480>.
- Van Roermund, Carlo W.T., Lodewijk IJlst, Tom Wagemans, Ronald J.A. Wanders, et Hans R. Waterham. 2014. « A Role for the Human Peroxisomal Half-Transporter ABCD3 in the Oxidation of Dicarboxylic Acids ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (4): 563-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.001>.
- Venisse, Anne, Jean-Marc Berjeaud, Pierre Chaurand, Martine Gilleron, et Germain Puzo. 1993. « Structural Features of Lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG ». *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 15 juin 1993.
- Venisse, Anne, Jean-Jacques Fournié, et Germain Puzo. 1995. « Mannosylated Lipoarabinomannan Interacts with Phagocytes ». *European Journal of Biochemistry* 231 (2): 440-47. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0440e.x>.
- Vergne, Isabelle, Jennifer Chua, Sudha B. Singh, et Vojo Deretic. 2004. « CELL BIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* PHAGOSOME ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (1): 367-94. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.114015>.
- Verreck, Frank A. W., Richard A. W. Vervenne, Ivanela Kondova, Klaas W. Van Kralingen, Edmond J. Remarque, Gerco Braskamp, Nicole M. Van Der Werff, et al. 2009. « MVA.85A Boosting of BCG and an Attenuated, *phoP* Deficient *M. Tuberculosis* Vaccine Both Show Protective Efficacy Against Tuberculosis in Rhesus Macaques ». Édité par Niyaz Ahmed. *PLoS ONE* 4 (4): e5264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005264>.
- Vignal, Cécile, Yann Guérardel, Laurent Kremer, Maryse Masson, Dominique Legrand, Joël Mazurier, et Elisabeth Ellass. 2003. « Lipomannans, But Not Lipoarabinomannans, Purified from *Mycobacterium Chelonae* and *Mycobacterium Kansasii* Induce TNF- $\alpha$  and IL-8 Secretion by a CD14-Toll-Like Receptor 2-Dependent Mechanism ». *The Journal of Immunology* 171 (4): 2014-23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.2014>.
- Viljoen, Albertus, Alain Vercellone, Myriam Chimen, Gérald Gaibelet, Serge Mazères, Jérôme Nigou, et Yves F. Dufrêne. 2023. « Nanoscale Clustering of Mycobacterial Ligands and DC-SIGN Host Receptors Are Key Determinants for Pathogen Recognition ». *Science Advances* 9 (20): eadf9498. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf9498>.
- Visvabharathy, Lavanya, Samantha Genardi, Liang Cao, Ying He, Francis Alonzo, Evgeny

- Berdyshev, et Chyung-Ru Wang. 2020. « Group 1 CD1-Restricted T Cells Contribute to Control of Systemic Staphylococcus Aureus Infection ». Édité par David M. Lewinsohn. *PLOS Pathogens* 16 (4): e1008443. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008443>.
- Vogel, A., G. Schwarzmann, et K. Sandhoff. 1991. « Glycosphingolipid Specificity of the Human Sulfatide Activator Protein ». *European Journal of Biochemistry* 200 (2): 591-97. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16222.x>.
- Wagener, Matthew, J. Claire Hoving, HlUMANI Ndlovu, et Mohlopheni J. Marakalala. 2018. « Dectin-1-Syk-CARD9 Signaling Pathway in TB Immunity ». *Frontiers in Immunology* 9 (février):225. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00225>.
- Wang, Jing, Yali Li, Yuki Kinjo, Thien-Thi Mac, Darren Gibson, Gavin F. Painter, Mitchell Kronenberg, et Dirk M. Zajonc. 2010. « Lipid Binding Orientation within CD1d Affects Recognition of *Borrelia burgdorferi* Antigens by NKT Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (4): 1535-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909479107>.
- Webb, Tonya J., Gregory B. Carey, James E. East, Wenji Sun, Dominique R. Bollino, Amy S. Kimball, et Randy R. Brutkiewicz. 2016. « Alterations in Cellular Metabolism Modulate CD1d-Mediated NKT-Cell Responses ». Édité par Martin Flajnik. *Pathogens and Disease* 74 (6): ftw055. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw055>.
- Ween, Miranda P., Jake B. White, Hai B. Tran, Violet Mukaro, Charles Jones, Matthew Macowan, Gregory Hodge, Paul J. Trim, Marten F. Snel, et Sandra J. Hodge. 2021. « The Role of Oxidised Self-Lipids and Alveolar Macrophage CD1b Expression in COPD ». *Scientific Reports* 11 (1): 4106. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82481-0>.
- Wei, Xiaoqin, Jiazhen Dong, Chin-Chen Cheng, Mingjun Ji, Lei Yu, Shengqiu Luo, Shuwen Wu, Lei Bai, et Ke Lan. 2020. « Host RAB11FIP5 Protein Inhibits the Release of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Particles by Promoting Lysosomal Degradation of ORF45 ». Édité par Pinghui Feng. *PLOS Pathogens* 16 (12): e1009099. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009099>.
- Wei, Yong, Zi Jian Xiong, Jun Li, Chunxia Zou, Christopher W. Cairo, John S. Klassen, et Gilbert G. Privé. 2019. « Crystal Structures of Human Lysosomal EPDR1 Reveal Homology with the Superfamily of Bacterial Lipoprotein Transporters ». *Communications Biology* 2 (1): 52. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0262-9>.
- Wendeler, Michaela, et Konrad Sandhoff. 2009. « Hexosaminidase Assays ». *Glycoconjugate Journal* 26 (8): 945-52. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9137-5>.
- Whittaker, Elizabeth, Mark P. Nicol, Heather J. Zar, Nontobeko G. Tena-Coki, et Beate Kampmann. 2018. « Age-Related Waning of Immune Responses to BCG in Healthy Children Supports the Need for a Booster Dose of BCG in TB Endemic Countries ». *Scientific Reports* 8 (1): 15309. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33499-4>.
- Wilkening, Gundo, Thomas Linke, et Konrad Sandhoff. 1998. « Lysosomal Degradation on

- Vesicular Membrane Surfaces ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30271-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30271>.
- Wilkening, Gundo, Thomas Linke, Gunther Uhlhorn-Dierks, et Konrad Sandhoff. 2000. « Degradation of Membrane-Bound Ganglioside GM1 ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (46): 35814-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006568200>.
- Wilkie, Morven, Iman Satti, Alice Minhinnick, Stephanie Harris, Michael Riste, Raquel LopezRamon, Sharon Sheehan, et al. 2020. « A Phase I Trial Evaluating the Safety and Immunogenicity of a Candidate Tuberculosis Vaccination Regimen, ChAdOx1 85A Prime – MVA85A Boost in Healthy UK Adults ». *Vaccine* 38 (4): 779-89. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.102>.
- Williams, A., N. P. Goonetilleke, H. McShane, Simon O. Clark, Graham Hatch, S. C. Gilbert, et A. V. S. Hill. 2005. « Boosting with Poxviruses Enhances *Mycobacterium Bovis* BCG Efficacy against Tuberculosis in Guinea Pigs ». *Infection and Immunity* 73 (6): 3814-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3814-3816.2005>.
- Willnow, Thomas E., Anders Nykjaer, et Joachim Herz. 1999. « Lipoprotein Receptors: New Roles for Ancient Proteins ». *Nature Cell Biology* 1 (6): E157-62. <https://doi.org/10.1038/14109>.
- Winau, Florian, Vera Schwierzeck, Robert Hurwitz, Natascha Rimmel, Peter A Sieling, Robert L Modlin, Steven A Porcelli, et al. 2004. « Saposin C Is Required for Lipid Presentation by Human CD1b ». *Nature Immunology* 5 (2): 169-74. <https://doi.org/10.1038/ni1035>.
- Winau, Florian, Stephan Weber, Subash Sad, Juana De Diego, Silvia Locatelli Hoops, Bernadette Breiden, Konrad Sandhoff, Volker Brinkmann, Stefan H.E. Kaufmann, et Ulrich E. Schaible. 2006. « Apoptotic Vesicles Crossprime CD8 T Cells and Protect against Tuberculosis ». *Immunity* 24 (1): 105-17. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.001>.
- Wright, Christine Schubert, Qiang Zhao, et Fraydoon Rastinejad. 2003. « Structural Analysis of Lipid Complexes of GM2-Activator Protein ». *Journal of Molecular Biology* 331 (4): 951-64. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00794-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00794-0).
- Wun, Kwok S., Josephine F. Reijneveld, Tan-Yun Cheng, Kristin Ladell, Adam P. Uldrich, Jérôme Le Nours, Kelly L. Miners, et al. 2018. « T Cell Autoreactivity Directed toward CD1c Itself Rather than toward Carried Self Lipids ». *Nature Immunology* 19 (4): 397-406. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0065-7>.
- Yates Iii, John R., Annalyn Gilchrist, Kathryn E. Howell, et John J. M. Bergeron. 2005. « Proteomics of Organelles and Large Cellular Structures ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (9): 702-14. <https://doi.org/10.1038/nrm1711>.
- Yonekawa, Akiko, Shinobu Saijo, Yoshihiko Hoshino, Yasunobu Miyake, Eri Ishikawa, Maho Suzukawa, Hiromasa Inoue, et al. 2014. « Dectin-2 Is a Direct Receptor for Mannose-Capped Lipoarabinomannan of Mycobacteria ». *Immunity* 41 (3): 402-13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.005>.

- Young, David C., Anne Kasmar, Garrett Moraski, Tan-Yun Cheng, Andrew J. Walz, Jingdan Hu, Yanping Xu, et al. 2009. « Synthesis of Dideoxymycobactin Antigens Presented by CD1a Reveals T Cell Fine Specificity for Natural Lipopeptide Structures ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (37): 25087-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000802>.
- Yuan, Weiming, Xiaoyang Qi, Pansy Tsang, Suk-Jo Kang, Petr A. Illarionov, Gurdyal S. Besra, Jenny Gumperz, et Peter Cresswell. 2007. « Saposin B Is the Dominant Saposin That Facilitates Lipid Binding to Human CD1d Molecules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (13): 5551-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700617104>.
- Zajonc, Dirk M, Carlos Cantu, Jochen Mattner, Dapeng Zhou, Paul B Savage, Albert Bendelac, Ian A Wilson, et Luc Teyton. 2005. « Structure and Function of a Potent Agonist for the Semi-Invariant Natural Killer T Cell Receptor ». *Nature Immunology* 6 (8): 810-18. <https://doi.org/10.1038/ni1224>.
- Zajonc, Dirk M, Marc A Elsliger, Luc Teyton, et Ian A Wilson. 2003. « Crystal Structure of CD1a in Complex with a Sulfatide Self Antigen at a Resolution of 2.15 Å ». *Nature Immunology* 4 (8): 808-15. <https://doi.org/10.1038/ni948>.
- Zajonc, Dirk M., Paul B. Savage, Albert Bendelac, Ian A. Wilson, et Luc Teyton. 2008. « Crystal Structures of Mouse CD1d-iGb3 Complex and Its Cognate V $\alpha$ 14 T Cell Receptor Suggest a Model for Dual Recognition of Foreign and Self Glycolipids ». *Journal of Molecular Biology* 377 (4): 1104-16. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.061>.
- Zeng, Z.-H., A. R. Castaño, B. W. Segelke, E. A. Stura, P. A. Peterson, et I. A. Wilson. 1997. « Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove ». *Science* 277 (5324): 339-45. <https://doi.org/10.1126/science.277.5324.339>.
- Zhang, Jiyuan, Weizhong Zeng, Yan Han, Wan-Ru Lee, Jen Liou, et Youxing Jiang. 2023. « Lysosomal LAMP Proteins Regulate Lysosomal pH by Direct Inhibition of the TMEM175 Channel ». *Molecular Cell* 83 (14): 2524-2539.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.06.004>.
- Zhang, Ying, Jin-chuan Xu, Zhi-dong Hu, et Xiao-yong Fan. 2023. « Advances in protein subunit vaccines against tuberculosis ». *Frontiers in Immunology* 14 (août):1238586. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1238586>.
- Zhao, Jie, Sarah Siddiqui, Shaobin Shang, Yao Bian, Sreya Bagchi, Ying He, et Chyung-Ru Wang. 2015. « Mycolic Acid-Specific T Cells Protect against Mycobacterium Tuberculosis Infection in a Humanized Transgenic Mouse Model ». *eLife* 4 (décembre):e08525. <https://doi.org/10.7554/eLife.08525>.
- Zhou, Dapeng, Carlos Cantu, Yuval Sagiv, Nicolas Schrantz, Ashok B. Kulkarni, Xiaoyang Qi, Don J. Mahuran, et al. 2004. « Editing of CD1d-Bound Lipid Antigens by Endosomal Lipid Transfer Proteins ». *Science* 303 (5657): 523-27. <https://doi.org/10.1126/science.1092009>.

Zhou, Xiaolai, Lirong Sun, Oliver Bracko, Ji Whae Choi, Yan Jia, Alissa L. Nana, Owen Adam Brady, et al. 2017. « Impaired Prosaposin Lysosomal Trafficking in Frontotemporal Lobar Degeneration Due to Progranulin Mutations ». *Nature Communications* 8 (1): 15277. <https://doi.org/10.1038/ncomms15277>.

Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilchèze, C., & Jacobs, W. R. Jr. (2000). Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine*, 6(9), 1043–1047. <https://doi.org/10.1038/79548>

**Titre :** Recherche d'acteurs lysosomaux impliqués dans la présentation de lipides mycobactériens par CD1b aux lymphocytes T

**Mots clés :** mycobacterium tuberculosis, protéines CD1, glycolipides, lymphocyte T, lysosome

**Résumé :** Les lipides peuvent être antigéniques et présentés en surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces lipides, généralement amphiphiles, sont présentés par les protéines CD1 (CD1a à CD1d), des protéines proches structurellement de la protéine du CMH de classe I, avec pour principale différence le site de liaison des antigènes. Cette présentation mène à une réponse immunitaire spécifique médiée par des lymphocytes T non conventionnels. Mycobacterium tuberculosis (Mtb), agent causal de la tuberculose, possède dans son enveloppe des lipides antigènes présentés par les protéines CD1, et particulièrement par l'isoforme CD1b. Ces lipides sont chargés sur CD1b au niveau du lysosome des cellules dendritiques (CD), dans leur état natif ou après un apprêtement. Cet apprêtement nécessite des protéines de transfert de lipides (LTP), telles que CD1e et les saposines, mais aussi des enzymes (hydrolases), permettant de digérer les parties polaire ou apolaires des lipides. Peu de LTP et hydrolases lysosomales ont à l'heure actuelle été identifiés, il est donc nécessaire de caractériser d'autres acteurs lysosomaux impliqués dans la présentation des antigènes lipidiques mycobactériens par CD1b. Les objectifs de ces travaux étaient de mettre en place des stratégies pour rechercher et identifier ces acteurs.

Ainsi, dans le but d'identifier de nouveaux acteurs lysosomaux impliqués dans le transport ou la maturation des glycolipides de Mtb, deux approches complémentaires ont été mises en place. La première, plus globale, nous a conduit à préparer des fractions enrichies en lysosomes provenant de CPA. Pour valider le protocole d'obtention de ces fractions, elles ont été caractérisées morphologiquement ainsi que par la présence de marqueurs protéiques. Elles ont également servi à réaliser des tests de dégradation de lipides mycobactériens in vitro, confirmant l'action des lipases précédemment caractérisées. Enfin, l'analyse protéomique du contenu de ces fractions a contribué à l'élaboration d'une liste de cinq protéines candidates, possiblement impliquées dans l'apprêtement. Parmi elles, certaines n'ont jamais été décrites dans le contexte de présentation de lipides antigènes, et d'autres sont déjà connues pour contribuer à la présentation de lipides par CD1d. La seconde approche a consisté à définir l'interactome de CD1b dans le lysosome, en réalisant une coimmunoprécipitation de CD1b à partir de fractions lysosomales. L'analyse protéomique des partenaires a permis de proposer quatre autres protéines candidates, toutes non décrites à ce jour dans le cadre de la présentation d'antigènes lipidiques. L'expression de certaines de ces protéines candidates, sera par la suite inactivée pour étudier l'impact de cette inactivation sur la présentation des complexes CD1b-lipides. Parmi ces protéines, la protéine NPC1 (« Niemann-Pick disease C1 »), déjà connue pour être impliquée dans la présentation de lipides par l'isoforme CD1d chez la souris, a retenu notre intérêt. Des essais d'inactivation ont été réalisés grâce à un inhibiteur spécifique, avant d'envisager une inactivation de l'expression par utilisation de siRNA ou CRISPR/Cas9.

Dans le but d'apprécier les effets de cette inactivation, il est nécessaire de posséder des outils biologiques capables d'évaluer la participation du candidat dans la présentation d'un lipide particulier. Lors de cette étude, deux outils ont été validés : 1) des anticorps recombinants spécifiques de CD1 présentant le sulfoglycolipide diacylé mycobactérien (Ac2SGL), et 2) différents clones lymphocytaires spécifiques de CD1b en complexe avec divers glycolipides mycobactériens.

**Title:** Searching for lysosomal actors involved in mycobacterial lipids presentation by CD1b to T cells

**Key words:** mycobacterium tuberculosis, CD1 proteins, glycolipids, T lymphocytes, lysosome

**Abstract:** Lipids can be antigenic and presented on the surface of antigen-presenting cells (APCs). These lipids, generally amphiphilic, are presented by CD1 proteins (CD1a to CD1d), which are structurally similar to class I MHC proteins, with the main difference being in the antigen-binding site. This presentation leads to a specific immune response mediated by unconventional T lymphocytes.

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), the causative agent of tuberculosis, has antigenic lipids in its envelope that are presented by CD1 proteins, particularly by the CD1b isoform. These lipids are loaded onto CD1b in the lysosome of dendritic cells (DCs), either in their native state or after processing. This processing requires lipid transfer proteins (LTPs), such as CD1e and saposins, as well as enzymes (hydrolases) that digest the polar or lipidic parts of the lipids. Few lysosomal LTPs and hydrolases have been identified so far, making it necessary to characterize other lysosomal actors involved in the presentation of mycobacterial lipid antigens by CD1b. The objectives of this work were to develop strategies to search for and identify these actors.

To identify new lysosomal actors involved in the transport or maturation of Mtb glycolipids, two complementary approaches were implemented. The first, more global approach, involved preparing lysosome-enriched fractions from APCs. To validate the protocol for obtaining these fractions, they were characterized morphologically and by the presence of protein markers. They were also used to perform in vitro degradation tests of mycobacterial lipids, confirming the action of previously characterized lipases. Finally, proteomic analysis of the contents of these fractions led to the elaboration of a list of five candidate proteins that may be involved in processing. Among them, some have never been described in the context of lipid antigen presentation, while others are already known to contribute to lipid presentation by CD1d. The second approach involved defining the interactome of CD1b in the lysosome by performing co-immunoprecipitation of CD1b from lysosomal fractions. Proteomic analysis of the partners identified four other candidate proteins, none of which have been described to date in the context of lipid antigen presentation. The expression of some of these candidate proteins will subsequently be knocked out to study

the impact of this inactivation on the presentation of CD1b-lipid complexes. Among these proteins, NPC1 (“Niemann-Pick disease C1”), already known to be involved in lipid presentation by the CD1d isoform in mice, was considered interesting. Inactivation tests were performed using a specific inhibitor, before considering inactivation of expression using siRNA or CRISPR/Cas9.

To evaluate the effects of this inactivation, it is necessary to have biological tools capable of assessing the candidate's role in the presentation of a particular lipid. In this study, two tools were validated: 1) recombinant antibodies specific to CD1 presenting the mycobacterial diacylated sulfoglycolipid (Ac2SGL), and 2) different lymphocyte clones specific to CD1b in complex with various mycobacterial glycolipids.