

Université de Montréal

**Expression du CMH de classe I par les cellules épithéliales thymiques et  
extrathymiques : Implication dans la tolérance au soi**

Par

Mohamed Benhammadi

Programme de biologie moléculaire, option biologie des systèmes

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en biologie moléculaire option biologie des systèmes

Décembre, 2021

© Mohamed Benhammadi, 2021

Université de Montréal

Institut de recherche en immunologie et en oncologie de l'Université de Montréal

---

*Cette thèse intitulée*

**Expression du CMH de classe I par les cellules épithéliales thymiques et extrathymiques :  
Implication dans la tolérance au soi**

*Présenté par*

**Mohamed Benhammadi**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Dr Etienne Caron**

Président-rapporteur

**Dr Claude Perreault**

Directeur de recherche

**Dr Moutih Rafei**

Membre du jury

**Dr Albert Descoteaux**

Examineur externe

**Dr Sylvie Marleau**

Représentante de la Doyenne

## Résumé

Le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I) est une glycoprotéine dont le rôle est de présenter des peptides endogènes au récepteur de cellules T (TCR) des cellules T CD8. La régulation de l'expression du CMH I a été exclusivement étudiée chez les cellules hématolymphoïdes. Cependant, ce processus reste peu élucidé chez les cellules épithéliales (ECs) malgré leur rôle important dans la défense de l'hôte contre divers pathogènes. Dans ce présent travail, nous avons effectué une analyse approfondie de l'expression du CMH I dans les ECs primaires fraîchement prélevées du thymus, de la peau, du colon et des poumons. Nos analyses de cytométrie en flux révèlent une grande variabilité de l'expression du CMH I à la surface des ECs primaires. Nous avons démontré que l'expression du CMH I est 10 à 100 fois plus élevée à la surface des ECs thymiques (TECs) que les ECs extrathymiques. Nous avons également observé aussi que l'expression élevée du CMH I à la surface des TECs est principalement due à l'interféron lambda (IFN- $\lambda$ ), produit en conditions physiologiques dans le thymus. Nous avons révélé aussi que l'absence de la voie d'IFN- $\lambda$  induit de l'auto-immunité chez la souris. En effet notre étude ouvre la voie vers une exploration plus approfondie de l'impact de l'IFN- $\lambda$  dans les fonctions thymiques. D'autre part, les ECs subissent continuellement de l'apoptose afin d'éliminer les cellules endommagées et restaurer l'intégrité de l'épithélium. Cependant, les ECs apoptotiques représentent une source majeure d'auto-antigènes (AAg) ce qui en fait une cible indéniable des maladies auto-immunes. Dans ce présent travail, nous avons évalué dans quelle mesure les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) thymiques (TEC médullaires (mTECs) et les cellules dendritiques thymiques (tDCs)) contribuent dans la tolérance centrale à l'égard des antigènes exprimés par les ECs extrathymiques. Nous avons trouvé que les APCs thymiques expriment environ 93% des gènes exprimés dans les ECs extrathymiques. Cependant, nous avons révélé une fraction des gènes (environ 7%) dans le transcriptome des ECs extrathymiques qui n'est pas exprimé par les APCs thymiques. Ces gènes sont capables de générer des peptides associés au CMH I (MAPs) quoique dans une moindre mesure que les gènes partagés avec les APCs thymiques. Dans l'ensemble, cette étude fournit la première tentative de caractérisation du transcriptome des ECs extrathymiques et les APCs thymiques, capables de générer des MAPs.

**Mots-clés :** CMH I, Thymus, Cellules épithéliales, Cellules épithéliales thymiques, Interféron lambda, cellules présentatrice d'antigène thymiques, tolérance centrale, peptides associés au CMH I, auto-immunité.



## Abstract

The major histocompatibility complex class I (MHC I) is a cell surface glycoprotein involved in the presentation of endogenously derived peptides, to the T-cell receptor TCR of CD8 T cells. However, the regulation of the MHC I expression has been studied almost exclusively in hematolymphoid cells and very little is known about this process in epithelial cells (ECs). In the present work, we performed a deep analysis of MHC I expression in primary ECs freshly harvested from the thymus, skin, gut, and lung. In fact, we found that the superior MHC I expression in TECs is driven mainly by interferon lambda (IFN- $\lambda$ ) produced under steady-state conditions in the thymus. Moreover, *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice present autoimmune manifestations. Our study paves the way for a more detailed exploration of the impact of IFN- $\lambda$  signaling in thymic functions.

On the other hand, ECs continually undergo apoptosis to delete damaged cells while restoring the epithelium integrity. However, apoptotic ECs are a major source of autoantigens (AAGs) which makes them an undeniable target for autoimmune attacks. In the present study, we evaluated the extent to which thymic antigen presenting cells APCs (medullary TECs (mTEC) and thymic dendritic cells (tDCs)) contribute to central tolerance against extrathymic ECs-antigens. We report that thymic APCs express about 93.5% of genes expressed in extrathymic ECs whereas 7 % of genes expressed in extrathymic ECs are silent in thymic APCs. We found that these extrathymic ECs- unique genes are efficiently able to produce MHC I-associated peptides (MAPs), albeit to a lower extent than the genes expressed by thymic APCs.

In summary, this study provides the first characterization of the self-transcriptome expressed by extrathymic ECs and thymic APCs (mTECs and tDCs), and able to generate MAPs.

**Keywords:** MHC I, Thymus, Epithelial cells, Thymic epithelial cells, Interferon lambda, Thymic antigen presenting cells, central tolerance, MHC I-associated peptides, autoimmunity.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations .....	xiii
Remerciements .....	xviii
<b>Chapitre 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Avant-propos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I).....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Généralité .....	2
1.2.2 Voie de la présentation antigénique par le CMH de classe I .....	3
1.2.3 Genèse des peptides associés aux molécules du CMH I (MAPs).....	4
1.2.3.1 Sources des MAPs .....	4
1.2.4 Apprêtement et chargement des peptides sur la molécule du CMH I.....	6
1.2.4.1 Dégradation cytosolique des protéines .....	7
1.2.4.2 Transport des peptides cytosoliques dans le RE : Rôle du PLC ( <i>Peptide Loading Complex</i> ) ....	9
1.2.4.3 Présentation antigénique.....	10
1.2.4.3.1 Présentation croisée des antigènes par les molécules du CMH I.....	10
1.2.5 Régulation transcriptionnelle de l'expression du CMH I.....	12
1.2.5.1 Contexte.....	12
1.2.5.2 NLRC5 : régulateur principal de l'expression du CMH I .....	13
1.2.5.3 Facteurs et séquences régulatrices de l'expression génique du CMH I.....	14
1.2.5.3.1 Expression transcriptionnelle constitutive .....	14
1.2.5.3.2 Expression induite par les cytokines.....	15
<b>1.3 Mécanismes moléculaires de la voie d'interféron .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 Propriétés et classification des IFNs .....	18
1.3.1.1 IFN de type I : .....	18
1.3.1.2 IFN de type II.....	19
1.3.1.3 IFN de type III .....	20

1.3.2	Activités biologiques associées aux IFN de type III (IFN- $\lambda$ ).....	20
<b>1.4</b>	<b>Acteurs moléculaires de la réponse lymphocytaire T.....</b>	<b>23</b>
1.4.1	Le récepteur TCR des lymphocytes T.....	23
1.4.1.1	Structure et diversité du TCR.....	23
1.4.1.2	Mécanismes de la reconnaissance génétique.....	23
1.4.2	Les différents sous-types de population de lymphocyte T.....	24
1.4.2.1	Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	24
1.4.2.2	Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	24
1.4.3	Développement des lymphocytes T dans le thymus.....	26
1.4.3.1	Les différentes étapes de développement des lymphocytes T.....	26
1.4.3.2	Tolérance centrale.....	27
1.4.3.2.1	Sélection positive et engagement des lignages.....	27
1.4.3.2.2	La délétion clonale.....	28
1.4.3.3	Les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) thymiques.....	29
1.4.3.3.1	Les mTECs.....	29
1.4.3.3.2	Les cellules dendritiques thymiques.....	30
1.4.3.4	Tolérance périphérique.....	32
1.4.3.4.1	L'anergie.....	32
1.4.3.4.2	Délétion périphérique.....	33
<b>1.5</b>	<b>L'auto-immunité et les cellules épithéliales.....</b>	<b>34</b>
1.5.1	Implications des cellules épithéliales (ECs).....	34
1.5.1.1	L'apoptose des ECs.....	35
1.5.1.2	Les ECs comme une cible d'infection virale.....	35
<b>1.6</b>	<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>37</b>
1.6.1	Objectifs spécifiques.....	37
<b>Chapitre 2</b>	<b>IFN-<math>\lambda</math> Enhances Constitutive Expression of MHC Class I Molecules on</b>	
	<b>Thymic Epithelial Cells.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1</b>	<b>Présentation de l'article.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2</b>	<b>Contribution des auteurs.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>41</b>
<b>2.4</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>43</b>
<b>2.6</b>	<b>Results.....</b>	<b>50</b>

2.6.1	Major heterogeneity in the constitutive expression of MHC I molecules by different types of ECs ..	50
2.6.2	Transcriptional regulation of differential MHC I expression.....	52
2.6.3	Differential MHC I expression is controlled by genes that affect constitutive and inducible MHC I transcription .....	55
2.6.4	Constitutive MHC I expression in TECs is sustained by type III interferon (IFN- $\lambda$ ) .....	58
2.6.5	mTECs are the main source of IFN- $\lambda$ in the thymus.....	60
2.6.6	Ifnlr1-deficient mice show impaired negative selection in the medulla .....	63
2.6.7	Ifnlr1 deficiency leads to autoimmune manifestations .....	67
<b>2.7</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>70</b>
<b>2.8</b>	<b>Acknowledgements .....</b>	<b>72</b>
<b>2.9</b>	<b>Disclosures .....</b>	<b>72</b>
<b>2.10</b>	<b>Footnotes.....</b>	<b>72</b>
<b>2.11</b>	<b>Supplemental Data.....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre 3 Thymic APCs express a sizeable but incomplete fraction of the genes expressed in extrathymic epithelial cells..... 81</b>		
<b>3.1</b>	<b>Présentation de l'article.....</b>	<b>81</b>
<b>3.2</b>	<b>Contribution des auteurs.....</b>	<b>82</b>
<b>3.3</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>84</b>
<b>3.4</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>85</b>
<b>3.5</b>	<b>Materials and Methods.....</b>	<b>87</b>
<b>3.6</b>	<b>Results .....</b>	<b>89</b>
3.6.1	The overlap between genes expressed in extrathymic ECs and thymic APCs (mTECs and thymic cDCs)	89
3.6.2	Genes expressed uniquely in extrathymic ECs are implicated in numerous biological processes .....	92
3.6.3	Genes expressed only in extrathymic ECs have a relatively low expression level.....	97
3.6.4	At the organismal level, genes expressed or not in thymic APCs have distinct expression profiles...	99
3.6.5	Some genes uniquely expressed in extrathymic ECs code for MAPs presented by H2D <sup>b</sup> /K <sup>b</sup> .....	102
<b>3.7</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>105</b>
<b>3.8</b>	<b>Acknowledgments .....</b>	<b>107</b>
<b>3.9</b>	<b>Disclosures .....</b>	<b>107</b>

<b>3.10</b>	<b>Footnotes.....</b>	<b>107</b>
<b>3.11</b>	<b>Supplemental figures .....</b>	<b>108</b>
<b>Chapitre 4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>109</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression du CMH I par les cellules épithéliales thymiques et extrathymiques .....</b>	<b>109</b>
4.1.1	Les cellules épithéliales thymiques présentent le plus haut niveau de CMH I .....	109
4.1.2	Impact de la voie des IFNs dans la régulation de l'expression constitutive du CMH I .....	112
<b>4.2</b>	<b>Impact de l'expression du CMH I sur la tolérance centrale.....</b>	<b>115</b>
4.2.1	Les conséquences de l'absence de la voie de l'IFN- $\lambda$ dans le thymus .....	115
4.2.2	Contribution différentielle des APCs thymiques dans la tolérance centrale .....	117
<b>4.3</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>120</b>
4.3.1	Expression du CMH I par les cellules épithéliales thymiques et extrathymiques .....	121
4.3.2	Impact de l'expression du CMH I sur la tolérance centrale .....	123
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>127</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>150</b>
	<b>Annexe 1.....</b>	<b>150</b>
	<b>Annexe 2.....</b>	<b>155</b>

## Liste des tableaux

Table 1-S1 List of interferon stimulated genes (ISG).....	150
Table 2-S1 List of genes uniquely expressed in extrathymic ECs.....	155
Table 3-S2 List of MAP-source genes translated only in extrathymic ECs .....	186
Table 4-S3 List of MAP-source genes shared exclusively by extrathymic ECs (extraTECs) and thymic DCs (tDCs) .....	187
Table 5-S3 List of MAP-source genes shared exclusively by extrathymic ECs (extraTECs) and mTECs .....	187
Table 6-S3 List of MAP-source genes expressed in extrathymic ECs (extraTECs) and thymic APCs (mTECs and thymic DCs (tDCs)) .....	188

## Liste des figures

Figure 1-1. Représentation schématique de la molécule du CMH I.....	3
Figure 1-2. La voie de présentation antigénique par les CMH de classe I. ....	6
Figure 1-3. Représentation schématique du promoteur des gènes codants pour CMH I.....	14
Figure 1-4. Représentation des récepteurs utilisés par les IFNs de type I, de type II et de type III et la cascade de signalisation induite par la liaison des IFNs.. ....	17
Figure 1-5. Les différents stades de développements des thymocytes dans le thymus. ....	27
Figure 1-6. Le rôle des cellules dendritiques thymiques (tDCs) dans le thymus. ....	31
Figure 2-1 H2K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup> staining intensity on the surface of cells from different tissues.....	51
Figure 2-2 Transcriptomic and flow cytometry analyses of ECs from different sites.....	54
Figure 2-3 Overexpression of MHC I in TECs is driven by IFN signaling.....	56
Figure 2-4 Deletion of <i>Ifnlr1</i> , <i>Stat1</i> or <i>Nlrc5</i> decreases MHC I expression in TECs.....	59
Figure 2-5 mTECs are the main source of IFN- $\lambda$ in the thymus. ....	61
Figure 2-7 <i>Ifnlr1</i> deficiency leads to autoimmune manifestations. ....	68
Figure 3-1 Differential gene expression in thymic APCs (mTECs and thymic cDCs) vs. extrathymic ECs.....	91
Figure 3-2 Pathway enrichment analysis of genes expressed only in extrathymic ECs.....	94
Figure 3-3 Genomic origin of shared and unshared transcripts.....	97
Figure 3-4 Expression profile of genes expressed only in extrathymic ECs vs. genes expressed in both extrathymic ECs and thymic APCs. ....	99
Figure 3-5 Expression profile of shared and unshared transcripts across different tissues using published gene expression data from murine tissues (see Materials and Methods).....	101
Figure 3-6 Generation of MAPs by transcripts unique to extrathymic ECs vs. transcripts shared with thymic APCs. ....	104
Figure 4-1 Le gène clé de la macroautophagie ( <i>Atg7</i> ) est fortement exprimé dans les ECs pulmonaires.....	111
Figure 4-2 Le niveau du CMH I à la surface des TECs doublement déficientes en <i>Stat1</i> et <i>Stat2</i> est similaire aux TECs déficientes en <i>Stat1</i> uniquement .....	113
Figure 4-3 Impact de la voie de l'IFN sur l'expression du CMH I sur les DCs (A) et les cellules endothéliales (B) isolées à partir du thymus et les tissus extrathymiques. ....	114

Figure 4-4 L'absence de la voie d'IFN $\lambda$ n'affecte pas l'expression de Aire. ....	116
Figure 4-5 l'absence de la voie d'IFN- $\lambda$ n'affecte le pourcentage et le nombre des sous-populations majoritaires des TECs.....	117
Figure 4-6 Modèle récapitulatif élucidant les principales découvertes dans le cadre de ce présent travail .....	120
Figure 4-7 Séquences régulatrices dans le promoteur proximal du gène CMH I et CMH II .....	123



## Figures supplémentaires

Supplemental Figure 2 S1 Experimental design used to isolate ECs and evaluate the intracellular load of MHC I molecules in TECs and Lung EC. ....	73
Supplemental Figure 2 S2 H2K <sup>d</sup> /D <sup>d</sup> staining intensity on the surface of cells from different tissues.....	75
Supplemental Figure 2 S3 Overexpression of MHC I in TECs is driven by IFN signaling.....	77
Supplemental Figure 2 S4 Impact of decreased MHC I expression on thymocyte selection. ....	79

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AICD	Mort cellulaire induite par activation
Ag	Antigène
AAg	Auto-antigène
AIRE	Régulateur auto-immun
APC	Cellule présentatrice d'antigène
APECED	Polyendocrinopathie-candidose dystrophie ectodermale autoimmune
ARN	Acide ribonucléique
ATF1	<i>Activating transcription factor 1</i>
B6	Souris C57BL/6
CCR7	Récepteur de chimokine C-C de type 7
cDC1	Cellule dendritique conventionnelle de type 1
cDC2	Cellule dendritique conventionnelle de type 2
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
CD	Marqueur de différenciation
Chd4	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 4</i>
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
CPM	<i>Counts per million reads mapped</i>
CREB 1	<i>cAMP-responsive-element-binding protein 1</i>
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dommages
DC	Cellule dendritique
DEG	Gène différentiellement exprimé
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DN	Thymocytes double négatif CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>
DP	Thymocytes double positif CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
DRIP	Produit ribosomique défectueux
EC	Cellule épithéliale

Endo	Cellule endothéliale
ERAP	<i>Endoplasmic reticulum amino peptidase</i>
FACS	Cytométrie en flux
Fezf2	<i>FEZ Family Zinc Finger 2</i>
FPKM	<i>Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads</i>
GAF	<i>Gamma-activated factor</i>
GAS	<i>Gamma-activated sequence</i>
IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur de l'IFN- $\alpha$
IFNGR	Récepteur de l'IFN- $\gamma$
INFLR	Récepteur de l'IFN- $\lambda$
IL	Interleukine
IRF	Facteur de régulation des interférons
ISG	Gène stimulé par l'interféron
ISGF3	<i>Interferon-Stimulated Gene Factor 3</i>
ISRE	Élément de réponse stimulé par les IFNs
JAK	Janus kinase
LED	Lupus érythémateux disséminé
MAP	Peptide associé au CMH I
MFI	Intensité médiane de fluorescence
mTEC	Cellule épithéliale thymique médullaire
mTEC <sup>hi</sup>	Cellule épithéliale thymique médullaire mature
mTEC <sup>lo</sup>	Cellule épithéliale thymique médullaire immature
mTOR	Cible de la rapamycine des mammifères
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire kappa B
NFY	<i>Nuclear transcription factor Y</i>
NK	Cellule tueuse naturelle
NLR	Récepteurs de répétition riches en leucine de liaison aux nucléotides
NLRC5	<i>NLR family CARD domain-containing 5</i>
NOD	<i>Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins</i>

PD-1	Protéine programmée 1 de mort cellulaire
PD-L1	Ligand de PD-1
PLC	Complexe de chargement des peptides
pGE	<i>Promiscuous gene expression</i>
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RFX5	<i>DNA-binding subunit Regulatory Factor X5</i>
RFXAP	<i>RFX-Associated Protein</i>
RFXANK	<i>RFX containing three Ankyrin repeats</i>
RFX	Complexe régulateur du facteur X
RNA-seq	Séquençage d'ARN
RPKM	<i>Reads per kilobase per million mapped reads</i>
qRT-PCR	Transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative
SM	Thymocytes CD8 semi mature
SOCS	Suppresseur de la signalisation des cytokines
SP	Thymocytes simple positif CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> ou CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>
STAT	Transducteur de signal et activateur de la transcription
tDC	Cellule dendritique thymique
TAP	Transporteur associé au traitement des antigènes
TCR	Récepteur de cellule T
TEC	Cellule épithéliale thymique
T <sub>h</sub>	Lymphocytes T auxiliaires
TLR	Récepteur Toll-like
TRA	Antigène tissulaire restreint
T <sub>reg</sub>	Cellule T régulatrice
Tyk	Tyrosine kinase
UEA1	Ulex europaeus lectin 1
WT	Type sauvage

*« The fool is the precursor to the savior »*

-Carl Gustav Jung

## Remerciements

Il y a des moments dans la vie qui disparaissent en ne laissant aucune trace, et d'autres qui nous habitent, nous transpercent et incrustent notre existence. Mon expérience dans le laboratoire du Dr Perreault fait partie de ces derniers. Arrivant à la fin, les mots me manquent pour exprimer ma profonde gratitude envers ceux qui m'ont accompagné et m'ont épaulé durant mon PhD.

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur Dr Claude Perreault de m'avoir donné la chance d'intégrer son équipe. Votre passion pour la science est vraiment contagieuse ! Votre encadrement et votre rôle maïeutique m'ont été très utiles pour aiguiser mon raisonnement tout en dépassant mes limites. Je me considère exceptionnellement chanceux de vous avoir comme superviseur et effectuer mon cheminement au sein de votre laboratoire m'a été extrêmement gratifiant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens aussi à remercier Sylvie pour le dévouement qu'elle m'a consacré pour l'avancement du mon projet. Merci pour ta générosité et ta disponibilité. Je te suis reconnaissant pour les moments de stimulations intellectuelles que tu m'as dispensés. Un merci particulier à Caroline et Marie-Pierre pour leur travail exceptionnel afin d'assurer une logistique harmonieuse du labo.

J'aimerais aussi exprimer une reconnaissance particulière aussi à Anca. Merci pour ton écoute et ta compassion. Merci aussi pour tes précieuses suggestions et ton aide pour l'approfondissement et l'accomplissement de mon projet.

Je n'aurais pas été capable d'achever cette belle aventure sans l'encouragement perpétuel des membres de l'équipe et je tiens à exprimer mes chaleureux remerciements pour l'ambiance aimable et fraternelle qui règne dans le laboratoire. Merci à Nandita, Erlada, Leslie, Jean-David, Greg, Qingchuan, MaVi, Lucyle, Krystel et Assya. Merci à Justine qui m'a accompagné dans l'élaboration du mon premier article et l'amélioration de la qualité de la thèse.

J'aimerais particulièrement exprimer mon admiration et ma profonde gratitude à mon amie Jalila. Tes conseils m'ont incité à clarifier ma pensée et avoir plus de confiance dans mes hypothèses. Malgré ton agenda chargé, merci d'avoir consacré du temps pour la révision de la thèse.

Je tiens aussi à adresser mes plus chaleureux remerciements à tous les professionnels des plateformes scientifiques à l'IRIC, notamment, la plateforme de cytométrie en flux, de génomique,

de bio-informatique et l'animalerie. Un gros merci pour votre dévouement et d'avoir partagé votre savoir-faire avec générosité.

Merci à tous les chercheurs qui ont consacré du temps pour me suivre et m'encadrer tout au long de mon cheminement. Vos conseils m'ont été très utiles pour bien achever ma formation. Merci à Dr Vincent Archambault, Dr Moutih Rafei et Dr Claude Daniel.

Je tiens remercier, Dr Étienne Caron, Dr Albert Descoteaux, et Dre Sylvie Marleau d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

L'occasion m'est donnée ici pour exprimer ma gratitude pour ceux qui m'ont accordé de l'affectation et de l'encouragement tout au long de cette épreuve fascinante. Merci à Amir et Arwa, Anaïs et Adam pour les bons moments passés ensemble. Je suis béni de vous avoir à mes côtés.

Je suis persuadé qu'un ami est un frère qu'on se choisit. Merci à Morgann et Cloé. Merci à Maude et Tarek de m'avoir accueilli et faciliter mon intégration dans le labo.

Cette liste de remerciement est loin d'être complétée et je déplore sincèrement de ne pouvoir citer toutes les personnes qui ont contribué de façon directe ou non au succès de mon cheminement académique.

Je dois une affectueuse reconnaissance à ma mère et mon père qui m'ont appris l'essence de l'amour inconditionnel et le sens du partage. Merci pour tous les sacrifices déployés pour m'élever dignement. Merci à mes frères. Malgré la distance qui nous sépare, je suis béni d'avoir deux grandes épaules sur lesquelles je peux m'appuyer. Enfin, je dois mon immense reconnaissance à ma conjointe de m'avoir enduré aussi longtemps. Accomplir avec succès mes projets est rendu possible grâce à tes précieux conseils et tes encouragements.

Finalement, je dédie ce travail à mon fils dont la présence a chaviré mon existence avec son sourire débordant de vitalité et d'amour.

# Chapitre 1 Introduction

## 1.1 Avant-propos

Les cellules épithéliales (ECs) sont connues pour jouer un rôle crucial dans la défense de l'hôte contre divers pathogènes. Les ECs tapissent les surfaces internes et externes des organes et jouent divers rôles dépendamment de leur position dans l'organisme. De plus, 80 à 90% des cancers proviennent des ECs et l'immuno-édition du cancer dépend majoritairement des interactions entre les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et le CMH I exprimé par les ECs. Caractérisée presque exclusivement dans les cellules hématolymphoïdes, la régulation de l'expression du CMH I par les ECs est encore peu élucidée. En effet, les travaux de recherche présentés dans cette thèse visent en premier lieu à évaluer les mécanismes régulant l'expression du CMH I par les ECs isolées à partir du thymus, de la peau, du colon et des poumons. De plus, les ECs sont des cibles fréquentes des réactions auto-immunes. Dans ce présent travail, nous avons effectué aussi une analyse comparative du transcriptome des ECs extrathymiques et les APCs thymiques essentielles à la tolérance centrale thymique.

La présente thèse est divisée en quatre chapitres. En introduction, nous présenterons une revue bibliographique dont le but est de fournir les notions scientifiques nécessaires afin d'appréhender les objectifs de la thèse. Le deuxième chapitre de la thèse est constitué d'un premier article publié. Dans cet article, nous avons dévoilé la contribution de l'interféron lambda (IFN- $\lambda$ ) dans l'amplification de l'expression du CMH I dans les ECs thymiques (TECs). Le troisième chapitre représente un deuxième article soumis. Nous avons montré, dans cet article, l'existence d'une fraction des gènes absente dans le transcriptome des APCs thymiques, mais exclusivement exprimée par les ECs extrathymiques. Enfin, le quatrième chapitre est dédié à la discussion des résultats obtenus tout au long de la thèse ainsi qu'à la présentation des perspectives pour nos travaux de recherches. Dans la discussion, des données supplémentaires de l'article présenté dans le chapitre 2 qui n'ont pas été publiées ont été utilisées afin d'approfondir notre raisonnement.



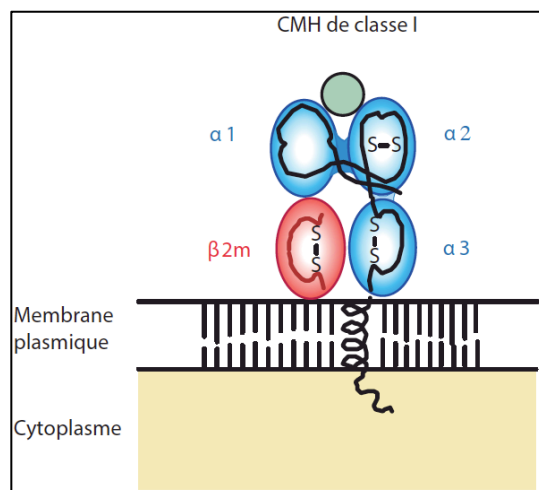
## 1.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I)

### 1.2.1 Généralité

Les molécules de complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) sont des glycoprotéines connues pour leur rôle primordial dans le système immunitaire adaptatif. Ces molécules sont exprimées par presque toutes les cellules nucléées à l'exception des cellules germinales<sup>1</sup>. La densité des molécules du CMH I varie selon le type cellulaire. Par exemple, les molécules du CMH I sont fortement exprimées par les cellules hémato-lymphoïdes<sup>2</sup> alors qu'elles sont peu nombreuses dans les cellules du système nerveux central<sup>3</sup>.

Le complexe majeur d'histocompatibilité, connu chez l'homme par le système HLA et H-2 chez la souris, est composé de trois classes de gènes : les gènes de classe I, les gènes de classe II et les gènes de classe III.

Les gènes du CMH I sont connus pour être polygéniques et extrêmement polymorphes. Chez la souris, le modèle animal de choix dans cette thèse, les trois loci du gène du CMH I sont H2-K, H2-D et H2-L. Les loci du CMH I codent pour une chaîne polymorphe de 44 kDa (chaîne  $\alpha$ ). La chaîne lourde est composée de trois domaines extracellulaires nommés :  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  <sup>4</sup>. Cette chaîne glycosylée est associée de façon non covalente à une chaîne légère de 12 kDa non polymorphe (connu sous le nom  $\beta_2$ -microglobuline) via l'interaction avec la chaîne  $\alpha 3$ . Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 3$  de la chaîne lourde ainsi que la chaîne légère  $\beta_2$ -microglobuline sont stabilisés par des ponts disulfures (Figure 1-1). Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  suscitent le plus d'intérêt dans la structure de la molécule du CMH I. En effet, cette partie forme le sillon de la présentation antigénique dans lequel un peptide, généralement constitué de 8 à 10 acides aminés, est ancré <sup>5</sup>.



**Figure 1-1. Représentation schématique de la molécule du CMH I.** Les structures des domaines extracellulaires, membranaires et cytoplasmiques sont indiquées. Le cercle vert représente le peptide associé au CMH I.

### 1.2.2 Voie de la présentation antigénique par le CMH de classe I

Tel que mentionné précédemment, le sillon de la présentation antigénique de la molécule du CMH I est capable de fixer un peptide ayant une taille de 8 à 10 acides aminés. Les extrémités du sillon de présentation contiennent des résidus tyrosine, ce qui entraîne leur rapprochement et donc une restriction de la taille du peptide présenté. De plus, des analyses de cristallographie aux rayons X, démontrent que le sillon de présentation est formé de 6 poches principales étiquetées de A à F. Généralement, il existe deux poches profondes dans le sillon de la présentation jouant un rôle clé dans la liaison du peptide au CMH I. La poche A qui fixe le deuxième résidu de l'extrémité N-terminal du peptide (position 2, P2) et la poche F dans laquelle l'extrémité carboxy-terminal du peptide s'insère profondément. Ainsi, les acides aminés occupant ces positions possèdent un rôle important dans la liaison du peptide avec CMH I. Ces acides aminés sont connus sous le nom des motifs d'ancrage <sup>6, 7</sup>. Globalement, les extrémités du peptide sont ancrées à l'intérieur des extrémités du sillon de liaison peptidique tandis que le centre du peptide reste bombé pour faciliter son accès aux TCR des lymphocytes T.

De ce fait, une compréhension approfondie des caractéristiques des peptides ayant une haute affinité au sillon de présentation du CMH I est primordiale afin d'assurer une conception efficace des vaccins peptidiques et une bonne prédiction de la réponse des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

## 1.2.3 Genèse des peptides associés aux molécules du CMH I (MAPs)

### 1.2.3.1 Sources des MAPs

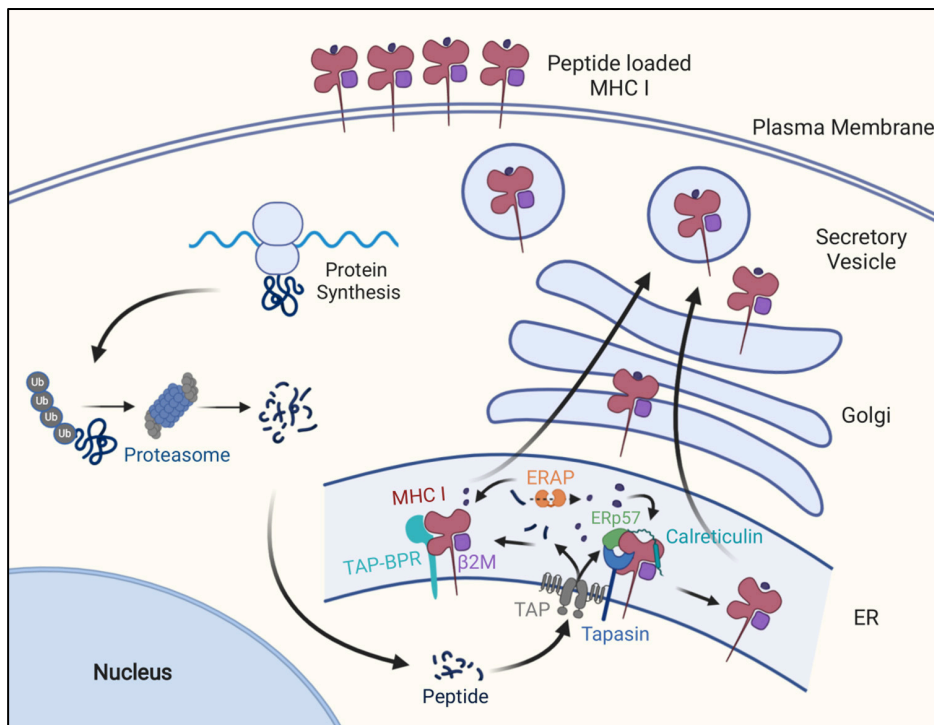
La source et l'origine des peptides présentés par les molécules du CMH I sont un sujet d'une investigation scientifique continue. Les fragments peptidiques présentés par les molécules du CMH I sont issus généralement de la dégradation des peptides endogènes. En effet, les protéines cytosoliques représentent la source principale, mais non exclusive, des peptides présentés par les molécules du CMH I<sup>8</sup>. Les peptides présentés sont généralement soit d'origine virale ou d'origine cellulaire rapidement dégradés après leur synthèse. Schubert et al., ont constaté que 30% ou plus des protéines traduites par l'appareil ribosomique subissent une dégradation rapide et n'atteignent pas leur état fonctionnel (*defective ribosomal products ou DRIP*)<sup>9</sup>. De ce fait, Yewdell et al., ont émis l'hypothèse qu'une grande partie des peptides présentés par les molécules du CMH I dérivent des DRIPs<sup>10</sup>. Cette hypothèse souligne que les DRIPs assurent une présentation presque immédiate des peptides antigéniques après leur synthèse. Étant donné que le répertoire peptidique des cellules est largement influencé par le contexte cellulaire (par exemple : infection virale, tumorigenèse, métabolisme), les DRIPs seraient alors une stratégie efficace pour surveiller ces changements et assurer ainsi une immunosurveillance précoce<sup>11</sup>. En effet, l'étude de Croft et al., révèle une activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'heure suivant l'infection<sup>12</sup> ce qui confirme que les peptides viraux sont déjà présentés par les molécules du CMH I et soutenant ainsi l'hypothèse des DRIPs. Par ailleurs, Fortier et al., se sont interrogés sur l'influence de la composition du transcriptome sur le répertoire peptidique. Les auteurs ont trouvé une corrélation entre le niveau d'ARNm et la présentation des peptides correspondant par les molécules du CMH I. Précisément, les MAPs sont générés à partir des ARNm les plus abondants<sup>13</sup>. Ces données représentent un appui supplémentaire en faveur de l'importance des DRIPs comme une source antigénique pour les MAPs.

La génération des MAPs dépend étroitement du niveau d'expression des transcrits sources. En effet, l'analyse des MAPs isolés des cellules lymphoblastoïdes démontre que l'expression des transcrits sources des MAPs est plus élevée que les transcrits non codants<sup>13, 14</sup>. Les transcrits générant des MAPs sont caractérisés aussi par un nombre élevé d'exons ce qui améliore leur efficacité de traduction<sup>15</sup>. Cependant, des analyses de profilage ribosomique révèlent que les ribosomes sont capables de fixer les transcrits codants pour les protéines et aussi les transcrits non

codants<sup>16</sup>. Cela appuie l'idée que les MAPs peuvent également être générés par des mécanismes de traduction non conventionnels. Ces mécanismes permettent la génération des MAPs issues d'introns, des jonctions intron/exon, de région 5' et 3' non traduites et de cadre de lecture alternatifs<sup>17-19</sup>. L'existence de ces MAPs a été confirmée par spectrométrie de masse. En analysant le cadre de lecture non canonique d'au moins 40 codants, Vanderperre et al., ont identifié l'existence d'un total de 1259 protéines atypiques dans plusieurs tissus et lignées cellulaires<sup>20</sup>. Les protéines identifiées représentent environ 2% du protéome total. Cependant, cette proportion est probablement sous-estimée puisque ces protéines sont caractérisées par un faible poids moléculaire et une petite taille ce qui limite leur détection par spectrométrie de masse. Dans l'ensemble, cette étude prouve clairement que les mécanismes de traduction non conventionnels sont capables de produire des MAPs. Les études de Schwab et al, ont démontré que ces MAPs sont capables de stimuler les cellules T CD8<sup>+</sup> ce qui suggère qu'ils possèdent un rôle important dans la réponse immunitaire<sup>21</sup>. En effet, les MAPs produits par des mécanismes de traduction non conventionnels contribuent à la complexité et la diversité de l'immunopeptidome présenté par les cellules.

### 1.2.4 Apprêtement et chargement des peptides sur la molécule du CMH I

La présentation des peptides par les molécules du CMH I est un processus complexe qui requiert plusieurs étapes successives. Brièvement, ce processus nécessite la génération de peptides ayant l'affinité adéquate, leur transport vers le réticulum endoplasmique (RE), leur chargement sur les molécules du CMH I et leur exportation à la membrane cytoplasmique. Les étapes de la présentation des peptides par les molécules du CMH I seront détaillées dans la partie suivante et illustrées dans la figure 1-2. Une recherche exhaustive de la littérature a été effectuée afin d'identifier les gènes codant les acteurs moléculaires clés dans ce processus. Ces gènes sont représentés dans la figure 2-2 (B) du chapitre 2.



**Figure 1-2. La voie de présentation antigénique par les CMH de classe I.** Les protéines intracellulaires sont dégradées par la voie ubiquitine/protéasome en peptides qui sont transportés dans le RE par l'intermédiaire du TAP. Une fois dans le RE, ces peptides peuvent être dégradés par ERAP. Les peptides ayant la taille et l'affinité adéquate se lient aux molécules du CMH I et ils sont transportés à la surface des cellules. Reproduit avec la permission de Kenneth L. rock <sup>22</sup>

#### 1.2.4.1 Dégradation cytosolique des protéines

Tel que mentionné précédemment, la plupart des peptides présentés par les molécules du CMH I sont issus des DRIPs. Ces derniers sont dégradés par le protéasome qui occupe une place centrale dans le métabolisme des protéines cellulaires. Le protéasome est un complexe enzymatique protéolytique constitué de plusieurs sous-unités. La forme la plus répandue est le protéasome 26S qui contient un cœur catalytique ayant une forme de baril appelé le 20S. Ce dernier est associé par chacun de ses côtés aux deux unités régulatrices 19S. D'autre part, le protéasome permet principalement de dégrader des protéines ayant subi une poly-ubiquitinylation. Ce processus est réalisé de façon coordonnée par trois types d'enzymes E1, E2 et E3. Ces enzymes permettent l'ajout d'une molécule ubiquitine sur le résidu lysine-48 (K48) par un lien covalent. Au moins quatre molécules sont nécessaires pour assurer une dégradation des protéines poly-ubiquitiné par le protéasome<sup>23</sup>.

Le protéasome 20S est constitué de 14 sous unités différentes : 7 sous unités  $\alpha$  extérieures ( $\alpha 1$ -  $\alpha 7$ ) et 7 sous unités  $\beta$  formant l'anneau intérieur ( $\beta 1$ -  $\beta 7$ ). Brièvement, l'activité catalytique du protéasome est gérée par les trois sous unité  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$ . Ces trois sous-unités diffèrent par leur spécificité catalytique.  $\beta 1$  possède une activité de type caspase alors que  $\beta 2$  et  $\beta 5$  sont caractérisées par une activité trypsine et chymotrypsine respectivement<sup>24</sup>. Admettant cette spécificité, presque tous les acides aminés peuvent servir de site de clivage pour le protéasome. Ceci confère au protéasome une grande flexibilité et lui permet de dégrader un large répertoire des protéines. Le protéasome est considéré, généralement, comme la protéase principale impliquée dans la génération des peptides présentés par les molécules du CMH I. Premièrement, la dégradation des protéines par le protéasome produit des peptides d'une longueur comprise entre 8 et 10 acides aminés ce qui représente la taille adéquate pour la liaison au sillon de présentation de la molécule du CMH I. Le protéasome est également capable de produire des peptides ayant une extrémité C terminale hydrophobe ce qui facilite leur liaison au sillon de présentation<sup>25</sup>. Finalement, le recours aux inhibiteurs du protéasome induit une réduction importante de la présentation antigénique par les molécules du CMH I<sup>26, 27</sup>.

Un large répertoire des peptides peut être généré par le protéasome constitutif tel que décrit ci-dessus. D'autre part, le développement du système immunitaire a été marqué par l'évolution des formes alternatives des sous-unités catalytiques du protéasome. En effet, suite à une induction avec l'IFN- $\gamma$ , les cellules s'adaptent de façon plus concrète au contexte cellulaire et les sous unités du

protéasome constitutives seront remplacées par d'autres sous unités catalytiques plus spécifiques ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  et  $\beta 5i$ ) formant ainsi l'immunoprotéasome<sup>28, 29</sup>. Ce dernier est exprimé de façon constitutive notamment par les cellules dendritiques (DCs), les lymphocytes et peut être aussi induit dans toutes les autres cellules par les interférons (par exemple suite à une infection virale)<sup>30, 31</sup>. Récemment, une étude effectuée au sein de notre laboratoire a démontré que l'immunoprotéasome possède un rôle crucial dans la gestion du stress protéotoxique chez les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTECs)<sup>32</sup>. Comparé au protéasome constitutif, l'immunoprotéasome est plus susceptible de produire des peptides antigéniques ayant une extrémité C-terminale hydrophobe<sup>33</sup>. En conséquence, l'immunoprotéasome est capable d'amplifier la présentation antigénique par les molécules du CMH I et élargir ainsi le répertoire des peptides présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

D'ailleurs, dans le thymus, les cellules épithéliales corticales thymiques (cTECs) expriment exclusivement la sous unité catalytique  $\beta 5t$  qui est incorporée avec  $\beta 1i$  et  $\beta 2i$  formant ainsi le thymoprotéasome. Ce type de protéasome est essentiel dans la sélection positive des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en produisant un ensemble unique des peptides associés aux molécules du CMH I présentées par les cTECs<sup>34</sup> (la sélection positive sera détaillée dans la section 1.4.3.2.1).

Il est important de noter qu'une fraction des protéines intracellulaires peuvent subir une dégradation indépendante de protéasome et générer des peptides capables de lier aux molécules du CMH I<sup>35, 36</sup>. Par exemple, les peptides possédant une lysine en position C-terminal ne sont pas préférentiellement dégradés par le protéasome<sup>37</sup>. Cependant, ces peptides peuvent représenter une source d'épitopes essentielle à l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ces peptides pourraient être efficacement dégradés par la tripeptidyl-peptidase 2 (TPPII) caractérisée par sa capacité de cliver après des résidus de lysine. En accord avec cela, la TPPII est la protéase primordiale pour la génération de l'épitope Nef<sub>73-82</sub> du Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) puisque ce peptide possède une lysine en position C-terminale<sup>38</sup>.

Il existe aussi d'autres protéases cytosoliques impliquées dans la dégradation et la génération des peptides capables de lier aux molécules du CMH I. Par exemple, la nardilsyne et la thimet oligopeptidase (TOP) sont deux aminopeptidases impliquées dans la génération de l'épitope MART-1<sup>39</sup>. Cet épitope, appelé également Melan-A, est un antigène de différenciation mélanocytaire et représente une cible antigénique idéale pour l'immunothérapie des mélanomes métastatiques<sup>40</sup>. Cependant, les souris déficientes pour ces protéases cytosoliques ne présentent

pas une perturbation notable de la présentation antigénique <sup>41</sup> ce qui suggère l'existence des mécanismes de compensation.

Les peptides produits dans le cytosol sont ensuite transportés dans RE (étape détaillée dans la section suivante) où ils subissent une dégradation protéolytique à l'extrémité N-terminale pour avoir la taille appropriée. Cette étape est orchestrée par les enzymes ERAP1 et ERAP2. Chez l'homme, les deux aminopeptidases, ERAP1 et ERAP2 sont impliquées dans ce processus alors que la souris n'exprime que ERAP1. Stimulé par l'IFN- $\gamma$  <sup>42</sup>, ERAP1 induit une dégradation peptidique des acides aminés hydrophobes tandis que ERAP2 possède une préférence pour les acides aminés basiques <sup>43</sup>. Il est important de mentionner que l'absence de l'ERAP est associée à une réduction significative de l'expression du CMH I à la surface des cellules B et T<sup>44</sup>. En effet, les souris déficientes pour ERAP1 présentent une altération de la présentation antigénique et ainsi une sensibilité aux infections virales <sup>45</sup>.

#### 1.2.4.2 Transport des peptides cytosoliques dans le RE : Rôle du PLC (*Peptide Loading Complex*)

Les peptides générés par le protéasome ou indépendamment du protéasome sont transportés activement du cytosol dans le RE par l'intermédiaire du TAP (*transporter associated with antigen processing*). Ce complexe hétérodimérique est composé de TAP1 et TAP2 qui sont des membres de la famille des transporteurs ABC. En effet, TAP forme un pore transmembranaire dont l'ouverture et la fermeture dépendent de l'hydrolyse de l'ATP<sup>46, 47</sup>. Le complexe TAP assure efficacement la translocation des peptides ayant une taille entre 8 à 12 et qui possèdent une extrémité C-terminale basique ou hydrophobe. Cependant, les peptides les plus longs peuvent aussi être transportés, mais avec une efficacité réduite <sup>48-50</sup>. Ces peptides seront ensuite coupés par l'aminopeptidase du RE (ERAP1 ou ERAP2) pour produire des peptides avec la taille optimale au sillon de liaison de la molécule du CMH I.

Dans le RE, le peptide fixe la molécule du CMH I grâce l'intervention des protéines chaperons suivantes : la calnexine <sup>51</sup>, la thiol oxydoréductase ERp57<sup>52, 53</sup>, la calréticuline<sup>54</sup> et la tapasine <sup>55, 56</sup>. Ces protéines forment, avec TAP et la molécule du CMH I, le complexe de chargement peptidique (connu sous le nom du PLC). En effet, l'assemblage de ce complexe et le chargement des peptides aux molécules du CMH I sont effectués de façon séquentielle <sup>51-54, 57</sup>.



Après sa synthèse, la chaîne lourde du CMH I fixe en premier lieu la calnexine ce qui assure son repliement correct dans le RE <sup>58</sup>. De plus, le recours à l'oxydoréductase ERp57 assure la formation des ponts disulfures au sein de la chaîne lourde<sup>59</sup>. Ce changement conformationnel favorise son association avec la  $\beta_2$ -microglobuline<sup>60</sup> et le remplacement de la calnexine par la calréticuline<sup>61</sup>. Le complexe ainsi formé se lie aux TAP par l'intermédiaire de la tapasine formant ainsi le PLC. La tapasine n'est pas seulement requise pour le rapprochement des molécules du CMH I au peptide transporté dans le RE. Cette protéine chaperonne, semble jouer un rôle dans la stabilisation de l'hétérodimère  $\beta_2$ -microglobuline et la chaîne lourde du CMH I. De plus, elle optimise aussi le chargement des peptides dans le sillon de la présentation antigénique de la molécule du CMH I <sup>54, 62-64</sup>.

#### 1.2.4.3 Présentation antigénique

La liaison d'un peptide à l'hétérodimère  $\beta_2$ -microglobuline/chaîne lourde du CMH I entraîne la dissociation des protéines chaperons. Ainsi, le complexe peptide-CMH I quitte le RE en transitant via l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique, où il sera accessible aux cellules T CD8<sup>+</sup>.

##### *1.2.4.3.1 Présentation croisée des antigènes par les molécules du CMH I*

Il existe un autre type de présentation antigénique qui est la présentation croisée (*cross-presentation*). Ce processus assure l'accès des antigènes exogènes aux mécanismes moléculaires décrits ci-dessus pour une présentation efficace par les molécules du CMH I<sup>65, 66</sup>. Les DCs représentent les cellules immunitaires les plus efficaces dans cette voie de présentation<sup>67-69</sup>. Les DCs sont omniprésents dans les tissus et les ganglions lymphatiques où elles sont en contact constant avec divers types d'antigènes. Pour induire une réponse immunitaire adaptative, les DCs doivent être capables de charger les peptides dérivés des antigènes internalisés sur les molécules du CMH. Les DCs sont impliqués aussi bien dans la présentation des peptides par les molécules du CMH II aux cellules T CD4<sup>+</sup>, que dans l'induction des cellules T CD8<sup>+</sup> par les peptides associés aux molécules du CMH I. En effet, la présentation croisée médiée par la molécule du CMH I est cruciale pour l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative contre les tumeurs et les virus qui n'infectent pas directement les DCs<sup>70</sup>. De plus, dans le thymus, cette voie de présentation adaptée par les DCs joue un rôle crucial dans l'établissement de la tolérance immunitaire (processus détaillé dans la section 1.4.3.3.2)

Les DCs sont subdivisées en DCs conventionnelles (cDC) et DCs plasmacytoïdes (pDCs). Les cDCs sont, en outre, classées en cDC de type 1 (cDC1) et cDC de type 2 (cDC2)<sup>71</sup>. Bien que cDC2 et pDC sont capables de présenter des antigènes extracellulaires de façon croisée<sup>72, 73</sup>, les cDC1 sont les cellules dendritiques les plus efficaces dans ce processus. Des études chez la souris, ont démontré que les cDC1 qui existent dans les tissus lymphoïdes, les poumons et les intestins sont capables de présenter de manière croisée l'antigène soluble OVA<sup>74-78</sup>. Les cDC1 possèdent les caractéristiques moléculaires requises pour une présentation croisée optimale. En plus d'une faible acidification des endosomes<sup>79, 80</sup>, ces cellules expriment un niveau élevé des gènes impliqués dans la voie de présentation par les molécules du CMH I<sup>81</sup>. De plus, ces cellules sont caractérisées par d'autres propriétés fonctionnelles telles que la phagocytose des cellules apoptotiques<sup>82</sup>.

En général, il existe deux voies principales pour la présentation croisée médiée par la molécule du CMH I : la voie cytosolique et la voie vacuolaire. Dans la voie vacuolaire, la dégradation des antigènes et le chargement des peptides sur la molécule du CMH I sont effectués dans le compartiment endolysosomal sans transiter par le cytosol, ce qui rend cette voie sensible à l'acidification des endosomes<sup>83</sup>. Connue pour être indépendante du protéasome et de TAP, Shen et al., ont démontré que la cathepsine S joue un rôle crucial dans la dégradation des antigènes dans la voie vacuolaire et les peptides générés sont associés directement à la molécule du CMH I dans l'endosome<sup>84</sup>.

Cependant, dans la voie cytosolique, les antigènes internalisés sont transportés de l'endosome vers le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome. Les peptides ainsi générés sont transportés dans RE (ou autre compartiment) via le TAP pour fixer les molécules du CMH I<sup>85-87</sup>. Cette voie est médiée par Sec22b<sup>88</sup> et requiert une dégradation endosomale limitée<sup>89</sup>. Bien que certains antigènes puissent être présentés de manière croisée par la voie vacuolaire, la majorité des études rapportent que la plupart des antigènes internalisés sont présentés par la voie cytosolique, dépendante du TAP et du protéasome<sup>84, 90-93</sup>. La dépendance de la présentation croisée à la dégradation par le protéasome semble être logique. En effet, après la migration des cellules T CD8<sup>+</sup> vers le tissu infecté, leur activation requiert la reconnaissance des peptides présentés à la surface des cellules infectées par la voie classique du CMH I. Toutefois, pour entraîner l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup>, les DCs doivent présenter pratiquement les mêmes épitopes que les cellules infectées. Pour ce faire, la présentation croisée dépendante du protéasome représente le choix par excellence par les DCs.

En accord avec ce raisonnement, Ackerman et al, ont montré que l'absence de l'immunoprotéasome chez les DCs affecte la présentation croisée *in vitro* et *in vivo*<sup>86</sup>.

Dans l'ensemble, les peptides issus des protéines non mutées (protéine du soi) sont généralement ignorés par les cellules T CD8<sup>+</sup> alors que les peptides dérivés des protéines des agents pathogènes (tel que virus) ou des protéines du soi mutées provoquent l'activation de ces cellules. Les cellules T CD8<sup>+</sup> jouent un rôle crucial dans le contrôle des infections virales et aussi dans l'immunosurveillance tumorale. De ce fait, une régulation optimale de l'expression des molécules du CMH I s'avère importante pour l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> et aussi le contrôle de la réponse immunitaire. Les facteurs clés et leur rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes du CMH I seront détaillés dans la section suivante.

## **1.2.5 Régulation transcriptionnelle de l'expression du CMH I**

### 1.2.5.1 Contexte

Tel que mentionné dans les sections précédentes, l'expression des molécules du CMH I est cruciale pour l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Alors que les molécules du CMH I présentent des peptides aux cellules T CD8<sup>+</sup>, les molécules du CMH II sont impliquées dans la présentation des peptides aux cellules T CD4<sup>+</sup>. Malgré cette différence, des études réalisées depuis 1993 suggèrent que les molécules CMH I et CMH II partagent la même machinerie transcriptionnelle. Ces études ont mené à la découverte du transactivateur de classe II (CIITA) qui est un récepteur de type NOD (*Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins*) qui appartient à la famille des NLR (*Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins*)<sup>94</sup>. À la lumière de ces études, CIITA semble jouer un rôle dans régulation de la transcription des gènes du CMH I. Cette notion est appuyée, *in vitro*, par la réduction de l'activité du promoteur des gènes du CMH I dans la lignée cellulaire des lymphocytes B déficientes en CIITA<sup>95</sup>. De même, une augmentation de l'expression du CMH I a été observée dans plusieurs types de lignées cellulaires transfectées par CIITA<sup>96</sup>. Cependant, il a fallu attendre la création des souris déficientes en CIITA, pour confirmer que CIITA n'est pas le régulateur principal de l'expression du CMH I. En effet, ces souris ne présentent pas une diminution de l'expression du CMH I<sup>97-99</sup>. Cependant, cette divergence des résultats est due aux différentes techniques de transfection utilisées. Le recours aux lignées cellulaires différentes avec des fonds génétiques variables représente une source majeure de variabilité. En effet, une étude récente au sein de notre laboratoire révèle une expression

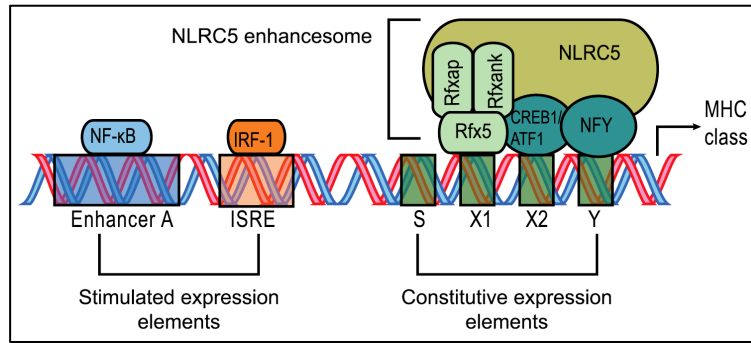
défectueuse de certains allèles du CMH I dans la même lignée cellulaire obtenue à partir de deux biobanques différentes<sup>100</sup>. De ce fait, un choix minutieux du modèle cellulaire, lors des études du CMH I, s'avère crucial afin d'obtenir des résultats rigoureux et fiables.

#### 1.2.5.2 NLRC5 : régulateur principal de l'expression du CMH I

La divergence des résultats, présentés ci-dessus, aboutit finalement à l'identification du NLRC5 (*NLR family CARD Domain Containing 5*) comme un régulateur principal de l'expression des gènes codants pour CMH I. NLRC5 est un récepteur de type NOD qui appartient à la famille des NLR, une famille des protéines intracellulaires. La famille NLR joue un rôle central dans le système immunitaire innée. Ces récepteurs permettent l'induction du mort cellulaire grâce à la reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs)<sup>101</sup>. En revanche, seuls deux membres de cette famille, NLRC5 et CIITA, sont connus pour leur rôle dans la régulation l'immunité adaptative. Cette régulation passe par la modulation de l'expression du CMH I et CMH II respectivement. Chez la souris, il existe 22 membres de la famille NLR dont le rôle de la majorité n'est pas encore élucidé<sup>102</sup>.

Le rôle de NLRC5 a été décrit, en premier lieu par le groupe de Kobayashi comme un facteur crucial dans la régulation de l'expression du CMH I *in vitro*. À la suite de cette découverte, des souris déficientes pour NLRC5 ont été générées indépendamment par 5 groupes. Chez toutes ces souris, l'absence de NLRC5 entraîne une baisse drastique de l'expression du CMH I particulièrement chez les cellules immunitaires<sup>99, 103-105</sup>. L'importance de NLRC5 dans la régulation du CMH I a été appuyée par les études de Neerincx et al, qui démontrent une corrélation entre le niveau d'expression de NLRC5 et l'augmentation de l'expression du CMH I à la surface des cellules<sup>106</sup>. De plus, NLRC5 régule positivement l'expression des gènes impliqués dans la voie de la présentation antigénique par CMH I tels que *B2m*, *Psmb 9* et *Tap1*<sup>107</sup>. Plusieurs études démontrent que NLRC5 possède une expression élevée dans les cellules hématopoïétiques ce qui en fait le modèle cellulaire le plus utilisé pour étudier les mécanismes moléculaires régulant l'expression du CMH I.

Pour induire efficacement l'expression du CMH I, NLRC5 s'associe au promoteur des gènes du CMH I avec plusieurs facteurs de transcription (Figure 1-3).



**Figure 1-3. Représentation schématique du promoteur des gènes codants pour CMH I.** La région promotrice des gènes codant pour le CMH I contient le module SXY qui se lie au complexe multiprotéique *NLRC5 enhanceosome*. Cette région contient aussi un site de fixation de NF- $\kappa$ B et une région ISRE.

### 1.2.5.3 Facteurs et séquences régulatrices de l'expression génique du CMH I

L'expression constitutive et inductible du CMH I est contrôlée principalement au niveau de la transcription par plusieurs éléments régulateurs *cis* dans le promoteur proximal du CMH I (Figure 1-3).

#### 1.2.5.3.1 Expression transcriptionnelle constitutive

La région promotrice du gène codant pour CMH I contient un module SXY qui constitué par les boîtes, S/W, X1, X2 et Y. La boîte X1 est liée par le complexe régulateur du facteur X (RFX) qui est un complexe trimérique formé par RFX 5 (*DNA-binding subunit Regulatory Factor X5*), RFXAP (*RFX-Associated Protein*), RFXANK (*RFX containing three Ankyrin repeats*)<sup>108</sup>. La boîte X2 du module SXY est occupée par l'ensemble des facteurs de transcriptions CREB1 (*cAMP-responsive-element-binding protein 1*) et ATF1 (*activating transcription factor 1*) alors que la boîte Y est liée par le facteur de transcription NFY (*nuclear transcription factor Y*)<sup>95, 109-111</sup>. Jusqu'à date, les facteurs régulateurs fixant la boîte S n'ont pas été encore identifiés. Une fois transloqué dans le noyau, NLRC5 s'associe avec les facteurs liés au module de SXY pour former le complexe multiprotéique *NLRC5 enhanceosome* ce qui permet le recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription constitutive du gène codant pour le CMH I<sup>99, 112</sup>.

#### 1.2.5.3.2 Expression induite par les cytokines

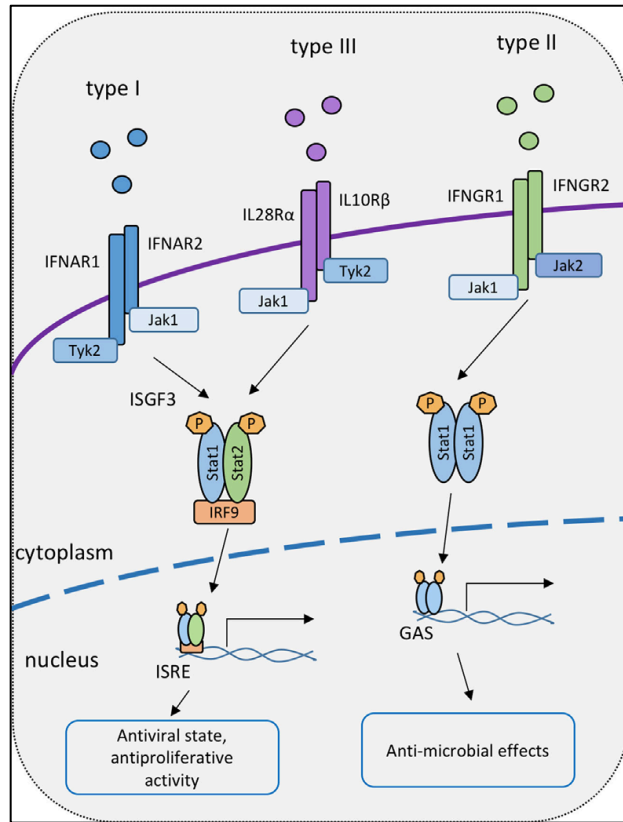
En plus du module de SXY, le promoteur proximal des gènes du CMH I contient un *Enhancer A* et une région ISRE (*IFN-stimulated response element*), qui est un élément de réponse stimulé par les IFNs. Alors que NFκB interagit avec *Enhancer A*, l'élément ISRE est fixé par IRF1 qui un facteur de transcription induit par les IFNs <sup>113</sup>. En outre, la stimulation par la voie des IFNs n'induit pas uniquement l'expression génique du CMH I. En effet, Gobbin et al., ont démontré que le promoteur du gène B2m codant pour la β<sub>2</sub>-microglobuline, contient également l'élément ISRE <sup>95</sup>. De même, la voie des IFNs stimule l'expression du NLRC5 puisque le promoteur de ce dernier contient aussi l'élément ISRE <sup>114</sup>. Ceux-ci confirment le rôle central du NLRC5 dans l'expression constitutive et aussi induite du CMH I. En effet, les souris dépourvues de NLRC5 sont sensibles aux infections et possèdent une activité cytotoxique réduite des cellules T CD8<sup>+</sup> <sup>103-105</sup>. Les mécanismes moléculaires orchestrant l'effet des IFNs sur les cellules sont détaillés dans la section suivante.

### 1.3 Mécanismes moléculaires de la voie d'interféron

Les interférons (IFNs) sont des protéines appartenant à la famille de cytokines. Le rôle des IFNs a été décrit pour la première fois à la fin des années 1950. Ils ont été nommés d'après leur capacité d'interférer avec la réplication virale<sup>115, 116</sup>. Depuis lors, les recherches sur l'impact biologique des IFNs ont été multipliées et leur rôle n'est plus associé uniquement à l'infection virale. En plus d'être impliqués dans les maladies auto-immunes et cancéreuses, les IFNs contribuent aussi à l'hémostase immunitaire. En effet, les IFNs sont considérés comme des immunomodulateurs importants et ils possèdent un rôle crucial dans le développement et le maintien de l'immunité innée et adaptative. Après l'induction des récepteurs de reconnaissances PRR (*Pattern Recognition Receptor*) par des motifs moléculaires associées aux dommages (DAMP), les IFNs sont capables d'agir de manière autocrine ou paracrine sur les cellules cibles exprimant les récepteurs correspondants. En effet, comme toutes cytokines, la capacité d'une cellule à répondre à l'action d'un IFN dépend entièrement de la présence de son récepteur correspondant à sa surface. À date, trois classes d'IFNs ont été décrites : les IFN de type I, II et III qui se distinguent par la structure unique de leurs récepteurs<sup>117</sup>.

Suite à leur fixation sur leur récepteur correspondant, les IFNs induisent une cascade de signalisation impliquée dans le maintien du système immunitaire et la défense contre les agents pathogènes. Ainsi, le niveau d'expression des récepteurs représente un des mécanismes importants dans la régulation de la réactivité des cellules cibles aux IFNs.

La liaison de l'IFN à son récepteur induit une cascade de signalisation complexe. Cette signalisation est répartie en deux branches : une signalisation canonique et une signalisation non canonique de l'IFN. La voie de signalisation canonique implique la phosphorylation des STATs (*Signal transducer and activator of transcription 1*) sur les résidus tyrosines par les kinases de la famille JAK. La phosphorylation des STATs entraîne leur dimérisation et l'induction des gènes stimulés par l'IFN (ISGs) (voir la section 1.3.1). Cependant, la voie non canonique comporte généralement le recours aux STAT non phosphorylés et aussi la redondance entre les membres de la famille STAT<sup>118</sup>.



**Figure 1-4. Représentation des récepteurs utilisés par les IFNs de type I, de type II et de type III et la cascade de signalisation induite par la liaison des IFNs.** La liaison des IFNs à leurs récepteurs correspondants induit une cascade de signalisation qui requiert la phosphorylation des récepteurs et l'activation des STATs. Les IFNs de type I et de type III entraînent l'expression des gènes dont le promoteur contient les éléments ISRE et GAS alors que l'IFN de type II induit exclusivement l'expression des gènes contenant l'élément GAS. Reproduit avec la permission Thomas Decker <sup>118</sup>.



### 1.3.1 Propriétés et classification des IFNs

Tel que mentionné ci-dessus les IFNs sont une famille de cytokines secrétées par les cellules hôtes pour répondre à des agents pathogènes généralement des virus. En général, les IFNs sont composés de 130 à 170 acides aminés et possèdent un poids moléculaire de 20 à 100 kDa<sup>119</sup>. Les IFNs sont dégradés rapidement par diverses protéases et quelques solvants organiques tels que l'acétone et l'éther diéthylique. La stabilité thermique des IFNs varie dépendamment de leur source. Comparés aux autres espèces, les IFNs humains sont généralement moins stables. En effet, une heure d'incubation à 56-60 °C induit une réduction drastique de l'activité biologique des IFNs humains<sup>120, 121</sup>.

Dans le passé, les IFNs étaient classés en fonction de leur origine cellulaire ce qui en découle trois types d'IFNs ; IFN- $\alpha$  secrété par les leucocytes infectés, IFN- $\beta$  produit par les fibroblastes infectés et IFN- $\gamma$  secrété par les cellules T actif. Cependant, l'IFN- $\lambda$  découvert en 2003, n'entre pas dans les catégories susmentionnées. De plus, ce type d'IFN utilise un récepteur structurellement distinct<sup>122, 123</sup>. De ce fait, une nouvelle classification a été introduite et les IFNs- $\alpha$ , IFNs- $\beta$ , IFNs- $\gamma$  et IFN- $\lambda$  sont maintenant classés en fonction de leur récepteur en IFN de type I, II et III respectivement (Figure 4-1).

#### 1.3.1.1 IFN de type I :

Chez les mammifères, il existe neuf sous type d'IFN de type I dont IFN- $\alpha$ , lui-même divisé en 13 sous types. Les formes uniques d'IFN de type I sont IFN- $\beta$ , IFN- $\varepsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\nu$ , IFN- $\zeta$ . Ces cytokines sont caractérisées par une homologie allant de 20% (entre sous types d'IFN  $\alpha$ , IFN- $\beta$  et IFN- $\varepsilon$ ) jusqu'au 100% (entre certain sous types d'IFN- $\alpha$ ). Bien que IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  représentent les deux sous-types les plus étudiés, plusieurs études suggèrent que les autres sous type d'IFN de type I peuvent avoir des rôles uniques et spécifiques au tissu<sup>124</sup>. Malgré leurs différences structurelles, tous les IFNs de type I signalent par l'intermédiaire d'un seul récepteur hétérodimérique composé de sous unités IFNAR1 et IFNAR2<sup>125</sup>. Il existe trois isoformes pour l'IFNAR2 (IFNAR2a, IFNAR2b and IFNAR2c). La forme la plus étudiée reste IFNAR2c qui est composée d'un long domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire nécessaire pour l'activation de la voie de transduction du signal JAK-STAT<sup>126</sup>. La forme IFNAR2b est caractérisée par un court domaine transmembranaire dépourvue du domaine intracellulaire. L'expression de cette forme inhibe l'activité biologique de l'IFN de type I<sup>127</sup> et son expression est limitée à quelques

cellules. D'autre part, la forme IFNAR2a est une forme soluble tronquée au niveau du domaine transmembranaire. Les études de Hardy et al, révèlent que cette forme circule dans le sang, mais son rôle n'est pas encore complètement élucidé<sup>128</sup>.

Une question légitime à poser concernant la fonctionnalité du récepteur de type I est comment autant de ligands peuvent induire une transduction de signal via le même récepteur tout en conduisant à des réponses biologiques différentes. Bien que IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  peuvent entrer en compétition pour le récepteur d'IFN de type I, la liaison au récepteur se fait de manière spécifique à chaque type d'IFN<sup>129-131</sup>. Les conséquences des modes de liaison propre à chaque type d'IFN se traduit par la stimulation des différentes familles gènes ce qui induit une réponse biologique unique<sup>132</sup>.

Pour assurer la transduction du signal via la voie JAK-STAT, le monomère IFNAR1 est associé à la tyrosine kinase 2 (Tyk2) alors que IFNAR2 est couplé au JAK1. Cela assure le recrutement et la phosphorylation des STATs pour induire une réponse antivirale adéquate<sup>124</sup>. La cascade de signalisation canonique pour l'IFN de type I est caractérisée par la phosphorylation de STAT 2 et STAT1 qui s'associe avec IRF9 pour former le complexe ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*). Ce complexe est nécessaire pour induire la transcription des ISGs en s'associant avec l'élément ISRE qui existe dans la séquence promotrice de ces gènes<sup>133</sup>.

#### 1.3.1.2 IFN de type II

Contrairement aux IFNs de type I, il existe un seul type d'IFN de type II (IFN- $\gamma$ ). Le récepteur de l'IFN de type II est un complexe composé de 4 domaines transmembranaires. Deux chaînes pour IFNGR1 et deux chaînes IFNGR2<sup>124</sup>. Il a été démontré que l'IFNGR1 est pré-associé aux IFNGR2 et la fixation de l'IFN- $\gamma$  induit un changement conformationnel pour les deux chaînes<sup>134</sup>. Bien que IFNGR1 et IFNGR2 ne sont pas toujours conjointement exprimés à la surface des cellules, la présence des deux chaînes est essentielle pour induire l'activité de l'IFN- $\gamma$ <sup>135</sup>.

Pour assurer la traduction de signal via la voie JAK/STAT, IFNGR1 est lié au JAK1 alors que IFNGR2 est associé au JAK2. La présence de ces deux kinases est nécessaire pour la transduction du signal<sup>136</sup>. Cependant, les études de Krause et al, ont montré que la présence d'uniquement de JAK1 est capable d'induire la signalisation de l'IFN- $\gamma$ <sup>134</sup>. La liaison de l'IFN- $\gamma$  à son récepteur tétramérique induit la phosphorylation et l'activation de JAK1 et JAK2 ce qui entraîne par la suite la phosphorylation des résidus tyrosine du récepteur d'IFN de type II. Ces résidus tyrosine

phosphorylés assurent le recrutement de STAT1, mais pas STAT2. Dans l'ensemble, la liaison de l'IFN- $\gamma$  à son récepteur aboutit spécifiquement à la phosphorylation de la tyrosine de STAT1 et la formation d'homodimère STAT1 connue sous le nom de GAF (*Gamma-activated factor*). L'homodimère STAT1 est capable d'être transloqué dans le noyau et de fixer efficacement l'élément GAS (*Gamma-activated sequence*) pour activer la transcription des ISGs<sup>133, 137</sup>.

### 1.3.1.3 IFN de type III

Chez l'homme, les IFNs de type III sont composés de quatre membres : IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A), IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) et IFN- $\lambda$ 4. Alors que chez la souris il existe uniquement deux gènes codant pour IFN- $\lambda$  : IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 3<sup>138</sup>. Les séquences d'acides aminés de l'IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 3 sont pratiquement identiques (94%) alors que IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 4 présentent une homologie de 66%<sup>139</sup>. Tous les sous types d'IFN- $\lambda$  partagent le même récepteur qui est constitué de INFLR1 (connue aussi sous le nom d'IL-28R1) et IL-10R2. Ce dernier forme également le récepteur pour IL-10, IL-22 et IL-26<sup>140</sup>.

La fixation de l'IFN- $\lambda$  sur son récepteur correspondant entraîne l'activation des tyrosines kinase JAK1 et Tyk2 qui sont associés au récepteur. Cela entraîne le recrutement et la phosphorylation des STAT1 et STAT2. Ainsi les STAT phosphorylés recrutent IRF9 (*Interferon Regulatory Factor 9*) et forme ensemble ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*). Ce complexe sera ensuite transloqué dans le noyau et entraîne l'activation des ISGs<sup>141</sup>.

L'IFN- $\lambda$  pourrait être considéré comme un pont entre les cytokines de type IL-10 et l'IFN de type I. L'IFN- $\lambda$  possède une structure tridimensionnelle similaire aux IL-10 et partage aussi leur récepteur alors que la réponse transcriptionnelle de l'IFN- $\lambda$  est proche de l'IFN de type I.

## 1.3.2 Activités biologiques associées aux IFN de type III (IFN- $\lambda$ )

Tel que mentionné ci-dessus, la cascade de signalisation induite par l'IFN de type III est très similaire à celle de l'IFN de type I. Ainsi, les deux types d'IFNs induisent des activités biologiques similaires telles que l'activité antivirale. Il a été démontré que l'IFN- $\lambda$  possède une activité antivirale contre plusieurs types de virus comme le virus de l'encéphalomyocardite et le virus de la stomatite vésiculaire<sup>122, 123, 142</sup>. De plus, plusieurs études ont démontré que l'IFN- $\lambda$  inhibe efficacement la répllication du virus de l'hépatite B et l'hépatite C<sup>143</sup>. L'activité antivirale de l'IFN- $\lambda$  est caractérisée par l'induction de l'expression de plusieurs agents antiviraux comme les

protéines Mx<sup>123</sup>. Par exemple, la protéine MX1 est capable de bloquer la réplication de nombreux virus à ARN (comme le virus Influenza A) et certain virus d'ADN (comme le virus d'hépatite B)<sup>144, 145</sup>. De plus, cette protéine est capable de fixer certaines protéines structurales des virus cibles telles que la nucléoprotéine du virus Influenza A<sup>146</sup>.

D'autre part, Brand et al., ont démontré que l'expression de MX1 est inhibée par SOCS-1 (*Suppressor of Cytokine Signaling-1*)<sup>147</sup>. De même, l'IFN- $\lambda$  est capable de réguler positivement l'expression de SOCS-3 ce qui laisse suggérer l'existence d'un mécanisme rétrocontrôle négatif de la voie d'IFN- $\lambda$ <sup>148</sup>. Cependant, certains virus ont développé la capacité de contourner la voie de l'IFN- $\lambda$  et échapper à la réponse du système immunitaire. Par exemple, le virus de la maladie de Yaba (*Yaba-like disease virus*) inhibe la signalisation des IFNs de type I et de type III en sécrétant une glycoprotéine connue sous le nom de Y136. Cette protéine est capable de fixer les récepteurs des IFNs de type I et type III bloquant ainsi les activités biologiques induites par ces deux IFNs<sup>149</sup>.

Bien que les ISGs induits par l'IFN de type I et IFN de type III soit largement similaire, l'ampleur de la réponse induite par l'IFN de type I est souvent plus importante que celle induite par l'IFN- $\lambda$ . En effet, la réponse de l'IFN- $\lambda$  est moins puissante et sa cinétique est plus lente que celle de l'IFN de type I<sup>150</sup>. De plus, la réponse de l'IFN- $\lambda$  est prédominante au niveau des surfaces épithéliales telles que les voies respiratoires et gastro-intestinales ce qui laisse suggérer que la voie d'IFN de type III assure la première ligne de défense des tissus épithéliaux contre les agents pathogènes<sup>151</sup>.

Pratiquement tous les types cellulaires sont capables de sécréter de l'IFN- $\lambda$  à la suite d'une infection virale. Par exemple, il a été démontré que plusieurs différentes lignées cellulaires infectées par 4 différents virus induisent la coexpression de l'IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 3<sup>123</sup>. De même, l'infection des cellules épithéliales humaines par le virus respiratoire syncytial entraîne l'expression de l'IFN de type III et aussi l'IFN de type I<sup>152</sup>. L'infection virale peut également induire l'expression de l'IFN- $\lambda$  chez les cellules hématoïdes. En effet, plusieurs études ont démontré que l'infection des DCs par le virus de la grippe et le virus Sendai entraîne l'expression de l'IFN- $\lambda$ <sup>153, 154</sup>. De même, l'infection par ces deux virus induit aussi l'expression de l'IFN- $\alpha$  qui régule positivement aussi la voie de signalisation de l'IFN- $\lambda$ <sup>152</sup>. L'amplification de l'expression de l'IFN- $\lambda$  par l'IFN- $\alpha$  est peut-être due par l'induction du gène IRF7<sup>154-156</sup>. De plus, les cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs) sont également capables de produire de l'IFN- $\lambda$  suite à une stimulation de leur récepteur TLR-9 avec les séquences CpG<sup>153</sup>.

Il est important de noter que l'activation de la voie de signalisation de l'IFN de type I et l'IFN de type III est induite de façon indépendante. En effet, l'inhibition de la transduction de signal par les anticorps neutralisant anti-IFNAR1 n'affecte pas la signalisation de l'IFN- $\lambda$ . De même, l'inhibition de la voie de signalisation de l'IFN- $\lambda$  par les anticorps anti-IL-10R2 ne bloque pas la transduction du signal par le récepteur de l'IFN de type I. Ces résultats laissent suggérer que la similarité qui existe entre les deux voies de signalisation est due à ISGF3 et l'induction de la même famille des ISGs. Bien que l'IFN de type I est capable d'exercer une activité antiproliférative sur plusieurs types cellulaires, la capacité antiproliférative de l'IFN- $\lambda$  est spécifique aux cellules épithéliales<sup>157</sup>. L'activité antiproliférative de l'IFN- $\lambda$  dépend du niveau de l'expression de l'IFNLR1. En effet, il a été démontré que l'IFN- $\lambda$  est capable d'inhiber la prolifération des cellules dont l'expression du gène IFNLR1 est surexprimé<sup>158</sup>.

En plus de son activité antivirale, l'IFN de type I est connu aussi pour son activité anti-tumorale. L'IFN- $\alpha$  est utilisé en clinique pour traiter plusieurs types de cancer tels que mélanome métastatique, cancer rénal et le sarcome de Kaposi<sup>124, 159, 160</sup>. Puisque l'activité biologique induite par l'IFN de type I est comparable à celle de l'IFN de type III, plusieurs groupes ont examiné l'activité anti-tumorale propre à l'IFN- $\lambda$ <sup>161-164</sup>. Par exemple, Lasfar et al., ont démontré que l'induction de l'expression de l'IFN- $\lambda$  chez les cellules de mélanome murin B16 permet de retarder leur croissance chez la souris. Le niveau de l'expression de l'IFN- $\lambda$  chez les cellules tumorales corrèle positivement avec leur rejet<sup>161</sup>. Ces résultats démontrent clairement que l'IFN- $\lambda$  possède une activité anti-tumorale et une évaluation plus exhaustive de cette propriété en clinique serait intéressent à effectuer.

Récemment, plusieurs études ont suggéré que l'IFN- $\lambda$  pourrait constituer une approche thérapeutique prometteuse dans le cadre du COVID-19<sup>165</sup>. En effet, il a été démontré que l'administration de l'IFN- $\lambda$  entraîne une réduction de la charge virale tout en minimisant l'hyperinflammation ce qui permet de réduire significativement les conséquences dévastatrices du COVID-19<sup>166</sup>.

L'impact de l'IFN- $\lambda$  sur la régulation de l'expression du CMH I n'a pas été largement élucidé. À notre connaissance, l'étude menée par Kotenko et al., représente la seule étude qui révèle un lien direct entre la voie de signalisation de l'IFN- $\lambda$  et l'expression du CMH I <sup>123</sup>.

## 1.4 Acteurs moléculaires de la réponse lymphocytaire T

### 1.4.1 Le récepteur TCR des lymphocytes T

Le système immunitaire assure la défense de l'organisme contre divers pathogènes. De plus, le système immunitaire est également capable d'éliminer les cellules cancéreuses. Les principales armes dont disposent le système immunitaire pour maintenir ses fonctions sont les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces derniers sont capables de produire des anticorps (ou immunoglobulines). Les lymphocytes T quant à eux expriment à la surface un récepteur TCR (*T cell receptor*). La plupart des lymphocytes T expriment un TCR $\alpha\beta$  alors qu'une minorité exprime un TCR $\gamma\delta$ <sup>167</sup>. Le rôle des récepteurs TCR est d'assurer la reconnaissance antigénique et induire une réponse immunitaire.

#### 1.4.1.1 Structure et diversité du TCR

Tel que mentionné ci-dessus, le récepteur des cellules T est un complexe localisé sur la membrane des lymphocytes T. Ce récepteur membranaire est responsable de la reconnaissance des complexes CMH-peptide. Le récepteur TCR est composé de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui sont liées par des ponts disulfures<sup>168</sup>. La diversité du récepteur TCR est maintenue grâce à la recombinaison des segments de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). La chaîne  $\alpha$  est produite par la recombinaison VJ tandis que la chaîne  $\beta$  subit une recombinaison VDJ. La recombinaison aléatoire dans ces segments est orchestrée par les gènes activateurs de la recombinaison RAG1 et RAG2<sup>169</sup>. Ainsi, les lymphocytes T sont caractérisés par un répertoire diversifié qui est estimé à  $2 \cdot 10^6$  TCR différents chez la souris ce qui permet la reconnaissance d'un large répertoire des agents pathogènes<sup>170</sup>.

#### 1.4.1.2 Mécanismes de la reconnaissance génétique

Les peptides reconnus par le TCR $\alpha\beta$  des lymphocytes T doivent être en association avec le complexe CMH. En effet, les TCR  $\alpha\beta$  fixent les complexes CMH-peptides avec une affinité allant de 1 à  $100\mu\text{M}$ <sup>168</sup>. La partie variable de la chaîne  $\alpha$  est constituée de trois domaines connus sous le nom CDR (*Complementary Determining Regions*) alors que la chaîne  $\beta$  contient quatre domaines. Ces domaines jouent un rôle crucial dans la reconnaissance de l'antigène présenté par les molécules du CMH<sup>168</sup>. Les peptides présentés par les molécules du CMH II sont reconnus par les lymphocytes

auxiliaires CD4<sup>+</sup> alors que le TCR des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> fixe les peptides qui sont associés aux molécules du CMH I.

## 1.4.2 Les différents sous-types de population de lymphocyte T

Les lymphocytes T sont subdivisés en deux sous-groupes principaux : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

### 1.4.2.1 Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou les lymphocytes T auxiliaires sont des acteurs centraux de la réponse immunitaire. Leur rôle est d'orchestrer la réponse lymphocytaire. En effet, une perturbation du nombre des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est associée aux développements de plusieurs infections opportunistes telles que l'infection par VIH.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont principalement divisés en quatre types cellulaires : les lymphocytes Th1 (*T helper 1*), Th2, Th17 et T<sub>reg</sub> (les cellules T régulatrices). L'induction d'un sous type d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> dépend majoritairement de l'activation de leur TCR et aussi des cytokines dans le milieu environnant<sup>171</sup>. De plus, les différentes sous populations sont contrôlées par des facteurs de transcriptions régulateurs. Par exemple, le régulateur clé pour les lymphocytes T<sub>reg</sub> est le facteur de transcription FOXP3<sup>172</sup> alors que l'IFN de type I est considéré comme le facteur inducteur de la différenciation vers les cellules T CD4<sup>+</sup> de type Th1<sup>173</sup>.

### 1.4.2.2 Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (ou lymphocytes T cytotoxiques) jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire. En effet, les cellules T CD8<sup>+</sup> sont capables d'éliminer les cellules présentant un peptide du non-soi associé aux molécules du CMH I. Étant donné leur rôle crucial dans le contrôle d'une variété de maladies, plusieurs études sont en cours afin d'assurer une induction appropriée et efficace des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. La reconnaissance d'un antigène associé aux CMH I induit l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup>. En effet, le degré de l'interaction avec l'antigène affecte la différenciation des lymphocytes T CD8. La durée et l'amplitude de l'interaction influencent grandement l'état de l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, soit une réponse cytotoxique ou tolérisation<sup>174</sup>. La réponse cytotoxique est constituée de trois mécanismes moléculaires différents. Le premier fait appel à la sécrétion des cytokines principalement TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  connues par leurs propriétés antimicrobiennes et antivirales. Le deuxième mécanisme est

la libération, par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, des granules cytotoxiques telles que les granzymes et la perforine. Comme leur nom l'indique, la perforine est capable de former des pores dans la membrane des cellules cibles. Ainsi, les granzymes (des protéases à sérine) pénètrent dans la cellule cible par ces pores pour induire de l'apoptose. Finalement, le troisième mécanisme pour l'élimination des cellules cibles par les cellules lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reposent sur l'interaction Fas/FasL. Une fois activées, les cellules T expriment à leur surface FasL qui fixe son récepteur Fas à la surface des cellules cibles. Cette liaison induit un changement conformationnel des molécules Fas à la surface des cellules cibles induisant l'activation en cascade des caspases ce qui entraîne l'apoptose. Étant donné que les cellules T CD8<sup>+</sup> expriment aussi le récepteur Fas, l'interaction Fas/FasL est aussi utilisée pour éliminer les cellules effectrices afin de rétablir l'homéostasie immunitaire. Ce processus est appelé « fratricide »<sup>175</sup>



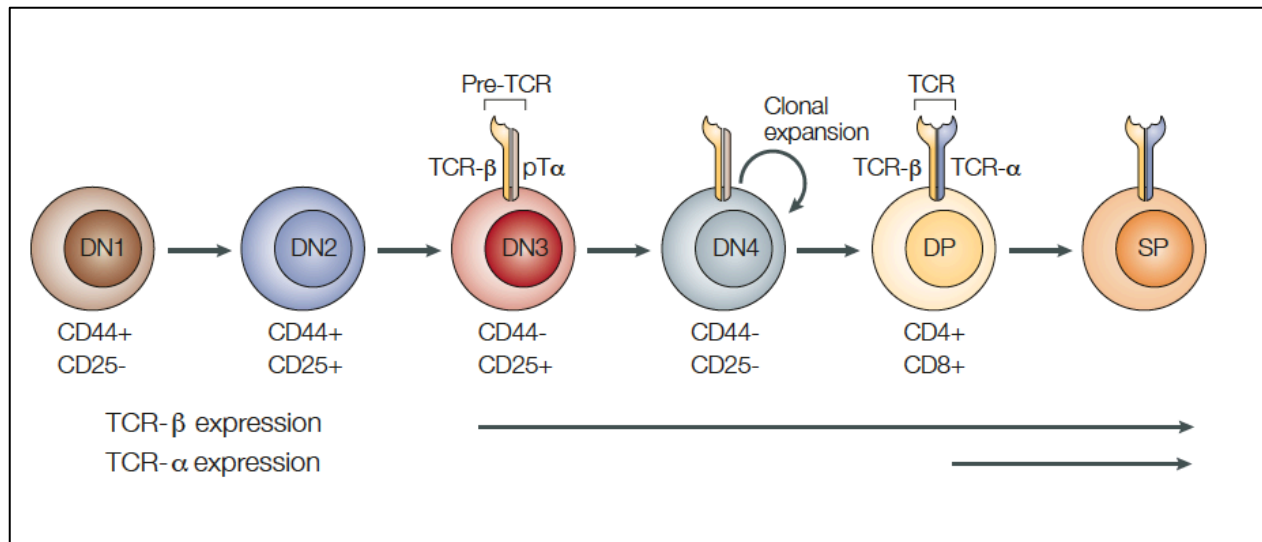
### 1.4.3 Développement des lymphocytes T dans le thymus

#### 1.4.3.1 Les différentes étapes de développement des lymphocytes T

Les cellules T sont issues des cellules hématopoïétiques qui résident dans la moelle osseuse. En effet, les progéniteurs des cellules T migrent vers le thymus pour suivre leur développement. Dans le thymus, ces progéniteurs, appelés également thymocytes, subissent une série d'étapes pour être cellules T matures.

Les précurseurs qui entrent dans le thymus sont appelés cellules doubles négatives (DN) puisqu'elles n'expriment pas les corécepteurs CD4 ou CD8. La majorité des DN donnent naissance à des cellules  $T\alpha\beta$  ce qui signifie que leur TCR est composé d'une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ .

La population DN peut être subdivisée en fonction de l'expression du marqueur CD44 et CD25 en DN1, DN2 et DN3 (Figure 1-5). Ces derniers n'expriment pas CD44, mais exprime CD25<sup>176</sup>. À ce stade, les cellules sont caractérisées par le réarrangement du TCR qui se fait en deux étapes. Le réarrangement du TCR se fait premièrement au stade DN3 où la chaîne TCR  $\beta$  est associée avec le pré- $T\alpha$  pour former le pré-TCR. Uniquement les cellules qui sont capables de produire un pré-TCR fonctionnel continuent leur développement au-delà du stade DN3. Cependant, les cellules dont le pré-TCR n'est pas fonctionnel sont éliminées par apoptose. Ce processus est nommé la sélection- $\beta$ . Dans l'ensemble, la sélection- $\beta$  requiert que le TCR  $\beta$  soit capable de s'associer efficacement avec le pré- $T\alpha$  pour former un pré-TCR fonctionnel<sup>177, 178</sup>. Après la sélection- $\beta$ , les thymocytes subissent ensuite le réarrangement des TCR  $\alpha$  afin de générer un récepteur TCR entièrement assemblé. Les thymocytes dont le TCR n'est pas fonctionnel sont éliminés, processus nommé sélection positive<sup>179</sup>.



**Figure 1-5. Les différents stades de développements des thymocytes dans le thymus.** Chez la souris normale, les thymocytes subissent plusieurs étapes de maturation qui sont caractérisées par l'expression d'un marqueur de surface spécifique à chaque étape. Le réarrangement de TCR se fait aussi selon un ordre bien défini pour générer un TCR entièrement assemblé. Reproduit et adapté avec la permission Kristin A. Hogquist et al.,<sup>180</sup>

#### 1.4.3.2 Tolérance centrale

##### 1.4.3.2.1 Sélection positive et engagement des lignages

Les thymocytes qui passent la sélection- $\beta$  expriment un récepteur TCR entièrement assemblé à la surface. L'étape suivante correspond à la sélection positive qui consiste à sélectionner les thymocytes avec un TCR fonctionnel capable de fixer les peptides associés au CMH. Cependant, un grand nombre de ces récepteurs sont incapables de fixer un complexe CMH-peptides. Plus de 90% des thymocytes DP subissent une mort par négligence puisque leur TCR n'est pas fonctionnel<sup>181</sup>. La sélection positive se produit dans le cortex du thymus avec le recours aux cellules épithéliales corticales thymiques (cTECs). Les cTECs forment un échafaudage tridimensionnel favorisant une interaction étroite avec les thymocytes en développement<sup>181</sup>. De plus, les cTECs expriment une large variété de protéines associées aux CMH pour assurer la sélection positive. Ces cellules se distinguent des autres cellules thymiques par une machinerie de dégradation des antigènes spécifiques. En effet, les cTECs expriment une sous-unité catalytique unique du protéasome appelé  $\beta 5t$  (ou thymoprotéasome) et les souris dépourvues de  $\beta 5t$  présentent une perturbation de la sélection positive des cellules T CD8<sup>+</sup><sup>182</sup>.

Les thymocytes positivement sélectionnés s'engagent pour devenir soit des cellules T CD8<sup>+</sup> ou des cellules T CD4<sup>+</sup>. En effet, la liaison du TCR au peptide associé au CMH II induit une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à l'expression d'une protéine appelée ThPOK. Cette protéine inhibe l'expression de la protéine Runx3, responsable de l'expression de CD8. Étant donné qu'un niveau faible de Runx3 entraîne une diminution de l'expression de CD8, ces cellules ThPOK<sup>+</sup> et Runx3<sup>-</sup> deviennent alors CD4<sup>+</sup> <sup>183, 184</sup>. À l'inverse, si le TCR des thymocytes ne fixe pas les peptides associés aux molécules du CMH II, le niveau de ThPOK reste faible ce qui n'affecte pas l'expression de Runx3. Le thymocyte se différencie alors en une cellule CD8<sup>+</sup> <sup>185</sup>.

Ensuite, les thymocytes positivement sélectionnés et qui expriment soit le marqueur CD4 ou CD8 (thymocytes SP) transitent vers la médulla pour subir d'autre étape de sélection <sup>179</sup>.

#### 1.4.3.2.2 La délétion clonale

Les thymocytes dont le TCR fixe un complexe CMH-peptide avec une haute affinité représentent une menace potentielle capable d'attaquer les cellules normales de l'organisme. Pour assurer la tolérance immunitaire, il existe plusieurs mécanismes tels que la délétion clonale.

Tel que mentionné ci-dessus, le thymus est formé de deux régions : la région corticale qui contient les thymocytes DP et DN alors que les thymocytes SP sont localisés dans la région médullaire. La sélection positive se déroule dans le cortex du thymus. Cependant, le déroulement de la délétion clonale dans le cortex reste un sujet à débat. Par exemple, l'étude menée par Kappler et al., avec le recours aux superantigènes suggère que la délétion clonale se produit au stade SP <sup>186</sup> alors que l'utilisation des souris exprimant un TCR transgénique montre que la délétion clonale se produit dans le stade DN à DP (dans le cortex thymique) <sup>187, 188</sup>. Cependant, le réarrangement du TCR transgénique se produit plus tôt, au début du stade DN ce qui aboutit à une délétion clonale prématurée <sup>189, 190</sup>. En effet, Elise R. Breed et al., ont développé un outil élégant pour évaluer la délétion clonale dans le répertoire polyclonal des souris *Wild type*. Le test est basé sur la mesure de l'activité de la caspase 3 (marqueur de l'apoptose) tout en déterminant la localisation anatomique des thymocytes dans le thymus. Les auteurs ont montré qu'une proportion élevée des thymocytes subissent la délétion clonale dans le cortex. De plus, les thymocytes continuent à subir la délétion clonale pendant les stades matures du développement dans la région médullaire <sup>191</sup>.

De façon générale, le thymus est composé principalement des thymocytes dont le développement dépend majoritairement de l'interaction avec d'autres cellules résidentes dans le

microenvironnement thymique. En plus des cellules épithéliales, le thymus contient une fraction des cellules hématopoïétiques, autre que les cellules T, comme les cellules dendritiques thymiques (tDCs). Bien que les cTECs sont nécessaires pour la sélection positive des thymocytes, les cellules épithéliales thymiques médullaires thymiques (mTECs) et les tDCs sont primordiaux dans la sélection négative.

### 1.4.3.3 Les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) thymiques

#### 1.4.3.3.1 Les mTECs

Durant la sélection positive, les thymocytes SP augmentent l'expression du CCR7 (récepteur de chimiokine C-C de type 7) et d'autres molécules nécessaires pour faciliter leur transit vers la région médullaire du thymus<sup>192, 193</sup>. Dans cette région, les thymocytes SP interagissent avec les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) qui sont caractérisées par une structure et un profil d'expression génétique différents. En effet, les mTECs jouent un rôle crucial dans la tolérance thymique en raison de leur capacité à exprimer de manière ectopique un grand nombre d'antigènes tissulaires restreints (TRA). Cette expression ectopique des TRAs (nommée aussi expression génique promiscueuse) est contrôlée en partie par une protéine régulatrice nucléaire appelée le régulateur auto-immun (AIRE)<sup>194, 195</sup>. La mutation de cette protéine est responsable du syndrome auto-immun APECED (*Auto-immune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy*). De même, les souris déficientes pour Aire développent spontanément une manifestation auto-immune systémique. Récemment, Takaba et al., ont rapporté la découverte d'un nouveau facteur de transcription appelé Fezf2 (*FEZ Family Zinc Finger 2*) nécessaire pour l'expression des TRAs qui sont indépendants de AIRE dans les mTECs. De plus, les auteurs ont démontré que les souris déficientes pour Fezf2 présentent aussi de l'auto-immunité<sup>196</sup>. Cependant, la machinerie transcriptionnelle régulant l'expression des TRAs reste encore peu élucidée. L'étude de Yoshihiko et al., démontre le rôle crucial du Chd4, un facteur de remodelage de la chromatine, dans l'expression des TRAs par les mTECs. Les auteurs ont découvert que Chd4 est impliqué dans le mécanisme transcriptionnel de l'expression des TRAs médiée par Aire et aussi Fezf2. De plus, l'absence de Chd4 spécifiquement dans les mTECs aboutit à la manifestation de l'auto-immunité chez les souris<sup>197</sup>.

D'autre part, les mTECs sont caractérisées par un taux de prolifération et de renouvellement élevé ce qui permet le remplacement de l'ensemble des mTECs en environ 2 semaines<sup>198</sup>. Cette propriété assure une modification continue de la nature des TRAs exprimés dans la médulla.

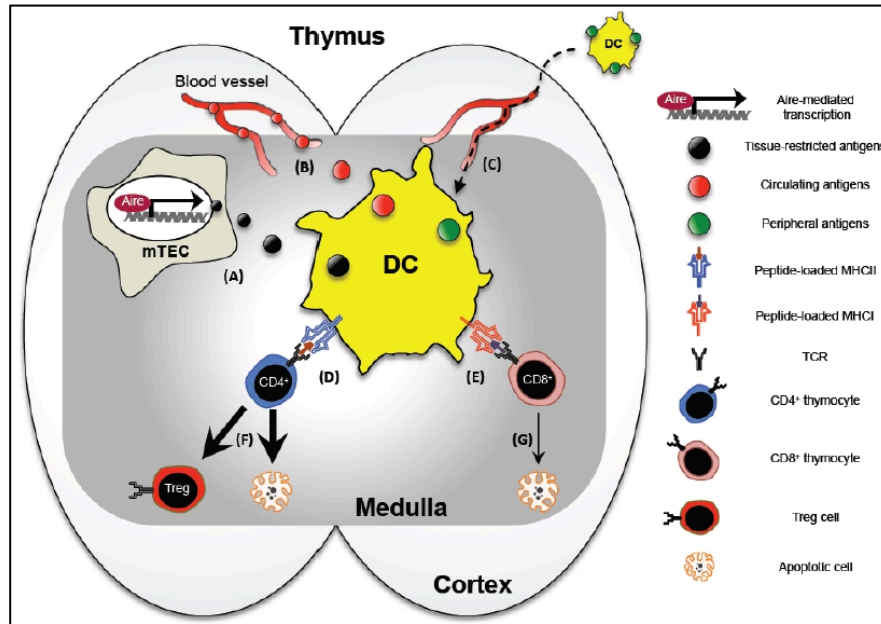
#### *1.4.3.3.2 Les cellules dendritiques thymiques*

Bien que la présentation directe des TRAs par les mTECs est suffisante pour induire la délétion clonale des thymocytes SP CD8<sup>+</sup>, ce processus n'est pas efficace pour la délétion clonale des thymocytes SP CD4<sup>+</sup><sup>199</sup>. Cependant, la présentation croisée des TRAs captés des mTECs par les tDCs favorise la délétion clonale des thymocytes SP CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>.

Les tDCs résident dans la région médullaire et corticale du thymus et jouent un rôle important dans la tolérance centrale. Les tDCs sont divisés en trois sous-ensembles principaux : les DCs plasmacytoïdes (pDCs) (CD11c<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>), les DCs conventionnelles de type 1 (cDC1; CD8α<sup>+</sup> Sirpα<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>) et les DCs conventionnelles de type 2 (cDC2; CD8α<sup>-</sup> Sirpα<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>). Contrairement aux cellules cDC2 et pDCs, les cDC1 thymiques proviennent d'un précurseur migrant vers le thymus<sup>200</sup>. Une fois dans le thymus, les précurseurs des DCs se transforment en cDC1 et deviennent plus matures en augmentant l'expression du CMH II et CD80/CD86. D'autre part, les pDCs et cDC2 se développent en périphérie et se dirigent vers le thymus<sup>201</sup>. L'activation des cDC1 est associée à leur capacité d'exprimer les ligands pour TCRαβ et les molécules de costimulation nécessaires pour la délétion clonale des thymocytes<sup>202, 203</sup>. Récemment, Elise R. Breed et al., ont révélé qu'une grande partie de la délétion clonale des thymocytes est contrôlée par les APCs thymiques provenant de la moelle osseuse. Ces auteurs ont suggéré aussi que la délétion clonale des thymocytes dans le cortex dépend d'un niveau élevé des molécules CD80/CD86<sup>191</sup>.

Les tDCs captent les antigènes, requis pour la sélection négative, par trois voies indépendantes (Figure 1-6). Premièrement, les tDCs peuvent capter les antigènes des mTECs<sup>204, 205</sup>. Ces antigènes incluent les TRAs qui sont exprimés sous le contrôle du Aire, Fezf2 et Chd4. Deuxièmement, les tDCs sont aussi capables d'acquérir des antigènes à partir de la circulation sanguine. En effet, les cDC2 sont présents en très grand nombre dans la région cortico médullaire qui est enrichie en petits vaisseaux sanguin<sup>206</sup>. Grâce à cette localisation stratégique, les cDC2 sont capables de capturer et présenter efficacement les antigènes circulant dans le sang<sup>207</sup>. Enfin, les cDC2 et pDCs sont capables de présenter des antigènes provenant des tissus périphériques à la suite de leur migration dans le thymus. Par exemple, des billes ont été injectées par voie intraveineuse et par voie sous-

cutanée ont été trouvées dans le thymus des souris, plus spécifiquement chez les cDC2 et pDCs<sup>208</sup>. De même, l'analyse des souris dont la peau a été pigmentée par des molécules fluorescentes, révèle que la même molécule a été trouvée dans le thymus<sup>208</sup>. Ces résultats suggèrent que les tDCs circulant dans les tissus périphériques migrent vers le thymus et présentent les antigènes acquis aux thymocytes pour soutenir la délétion clonale.



**Figure 1-6. Le rôle des cellules dendritiques thymiques (tDCs) dans le thymus.** A) les tDCs sont positionnées dans la région médullaire et sont capables d'acquérir les antigènes à partir des mTECs et B) à partir des vaisseaux sanguins qui sont présents dans la circulation sanguine. C) Certains tDCs proviennent de la périphérie au thymus tout en transportant des antigènes qui existent dans les tissus périphériques. Les antigènes acquis sont présentés aux D) thymocytes T CD4<sup>+</sup> via CMH II et E) aux thymocytes CD8<sup>+</sup> via CMH I. F) et G) La présentation des antigènes entraîne la délétion clonale des thymocytes autoréactifs ou leur différenciation en T<sub>reg</sub>. Reproduit avec la permission de Jeoung-Sook Shin<sup>209</sup>.

#### 1.4.3.4 Tolérance périphérique

Bien que les mécanismes de la tolérance centrale semblent être efficaces, certaines cellules auto-réactives peuvent échapper aux mécanismes de la tolérance centrale. Par conséquent, il existe plusieurs mécanismes de tolérance périphériques afin d'empêcher les lymphocytes auto-réactifs de causer des dommages en périphérie. Parmi ces mécanismes on trouve l'anergie et la délétion des cellules T auto-réactives en périphérie.

##### 1.4.3.4.1 L'anergie

L'activation des cellules T repose sur la fixation de son TCR à un peptide présenté par le CMH et la reconnaissance entre les molécules de co-stimulation des cellules T et leur ligand. Une fois activées, les cellules T sont capables de sécréter l'IL-2 qui induit par la suite l'activation de la voie mTOR. Cependant, l'engagement du TCR des cellules T en absence des signaux de co-stimulation peut induire de l'anergie qui se caractérise par une inhibition de la signalisation du TCR et empêche la sécrétion de l'IL-2. Les études de Yan Zheng et al., ont montré que l'inhibition de la voie du mTOR par la rapamycine aboutit à l'anergie des cellules T malgré l'engagement de leur TCR<sup>210</sup>.

Tel que mentionné ci-dessus les signaux de co-stimulation sont nécessaires pour l'activation des cellules T. Cependant, ces signaux peuvent servir aussi comme des signaux négatifs inhibant l'activation des lymphocytes T ce qui peut prévenir le développement de l'auto-immunité. Parmi ces signaux on peut mentionner la protéine programmée 1 de mort cellulaire (PD-1) et ses ligands PD-L1 et PD-L2<sup>211</sup>. La liaison du PD-1 à ses ligands correspondants entraîne le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 qui inhibe l'activation de la voie mTOR. Le rôle du PD-1 a été initialement rapporté chez les souris dépourvues pour PD-1 qui démontrent un développement spontané de maladies auto-immunes<sup>212</sup>. De plus, plusieurs études ont montré que l'interaction entre PD-1 et ses ligands (PD-L1 et PD-L2) inhibe les fonctions effectrices des cellules T contre un antigène spécifique. Ce mécanisme peut limiter l'activation et l'expansion des cellules T auto-réactives. De plus, la signalisation PD-1 peut également contribuer à la conversion des cellules T naïves en T<sub>reg</sub><sup>213</sup>. L'autre molécule de co-stimulation impliquée dans l'anergie des cellules T est CTLA-4. En effet, l'activation des cellules T induit aussi l'expression de CTLA-4 dont la fixation aux molécules B7 transmet un signal inhibiteur du cycle cellulaire. De plus, les cellules T CD4<sup>+</sup>

qui n'expriment pas CTLA-4 sont résistantes à l'induction de l'anergie<sup>214</sup> et les souris déficientes en CTLA-4 présentent de l'auto-immunité<sup>215, 216</sup>.

#### 1.4.3.4.2 Déléation périphérique

La déléation des lymphocytes auto-réactifs, dans le thymus et en périphérie, se fait par apoptose. La voie apoptotique médiée par Fas et Bim semblent être importante pour la déléation des lymphocytes autoréactifs en périphérie. Bien que ces deux voies de signalisation agissent différemment, leur coordination est importante pour la destruction des lymphocytes T stimulés par des auto-antigènes *in vivo*.

En général, les cellules T expriment Fas et l'expression de son ligand FasL est induite par l'activation des cellules T suivit par l'expression de l'IL-2. Plusieurs études ont montré que Fas est essentiel pour la déléation des cellules T stimulées à plusieurs reprises par le même antigène *in vivo*. De plus, les souris dépourvues de Fas et son ligand présentent de l'auto-immunité systémique<sup>217</sup>.

L'activation du Fas déclenche la formation du complexe multiprotéique DISC (*death-inducing signaling complex*) qui induit le clivage des caspases aboutissant ainsi à l'apoptose. Cette voie apoptotique est connue sous le nom de la mort cellulaire induite par activation (AICD)<sup>218</sup>.

D'autre part, la voie apoptotique médiée par Bim provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale ce qui aboutit à l'apoptose. Généralement, cette voie est impliquée dans la déléation des lymphocytes activés par un antigène pour maintenir l'hémostasie lymphocytaire et éliminer les lymphocytes autoréactifs<sup>219, 220</sup>.



## 1.5 L'auto-immunité et les cellules épithéliales

### 1.5.1 Implications des cellules épithéliales (ECs)

Le tissu épithélial constitue une barrière entre les organes et leur environnement extérieur. En effet, les cellules épithéliales jouent un rôle essentiel dans la protection des organes contre les agents pathogènes de l'environnement extérieur tout en maintenant une tolérance immunitaire contre les antigènes du soi. Les ECs proviennent des trois feuilletts embryonnaires fondamentaux (l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme) ce qui explique leur présence dans la plupart des organes. Les ECs de la peau dérivent de l'ectoderme tandis que les ECs qui recouvrent les voies respiratoires et le tube digestif se développent à partir de l'endoderme. D'autre part les ECs du thymus proviennent à la fois de l'ectoderme et de l'endoderme ce qui explique la grande hétérogénéité de ces cellules<sup>221, 222</sup>. Les ECs jouent un large éventail de fonction vitale dépendamment de leur localisation. Par exemple, les ECs de la peau assurent la protection des structures internes de l'organisme contre les dommages et la déshydratation<sup>223</sup>. Les ECs intestinales fournissent une barrière physique et biochimique séparant le tissu de l'hôte du microbiome intestinal afin d'éviter une réponse immunitaire pathologique<sup>224</sup>. Les ECs pulmonaires assurent les échanges gazeux et protègent les voies respiratoires des agents pathogènes<sup>225</sup>. Quant à elles, les ECs thymiques sont caractérisées par une hétérogénéité anatomique, phénotypique et fonctionnelle. Le rôle principal des ECs thymiques est de maintenir des lymphocytes fonctionnels et autoréactifs<sup>226</sup>. Dans l'ensemble, les ECs possèdent un rôle important dans le système immunitaire et la perturbation de leur fonction pourrait contribuer à l'émergence des maladies auto-immunes.

En effet, les ECs telles que ceux de la peau sont une cible fréquente des réponses immunitaires ce qui aboutit au développement des maladies auto-immunes. De ce fait, il n'est pas surprenant que les maladies auto-immunes touchent fréquemment les organes ayant un parenchyme purement épithélial telles que la thyroïdite auto-immune, le diabète de type 1 et le syndrome de Sjögren. De plus, la composante épithéliale est présente dans un grand nombre de maladies auto-immunes comme c'est le cas du psoriasis, la maladie de Crohn et l'hépatite auto-immune<sup>227</sup>.

#### 1.5.1.1 L'apoptose des ECs

Les ECs sont souvent sujettes à l'apoptose ce qui en fait une source importante d'auto-antigènes<sup>228</sup>. En effet, l'une des caractéristiques les plus importantes des maladies auto-immunes est la présence des auto-anticorps. Par exemple, la présence des anticorps dirigés contre les auto-antigènes SSA/Ro et SSB/La dans le sérum des patients représente un critère de diagnostic incontestable pour les patients atteints du syndrome de Sjögren<sup>229</sup>. De plus, plusieurs études ont montré que les protéines Ro/La résident principalement dans le cytoplasme et le noyau des ECs<sup>230</sup>,<sup>231</sup> ce qui suggère que ces protéines sont libérées par les ECs apoptotiques.

De même, le nucléosome représente l'immunogène le plus important dans le lupus érythémateux disséminé (LED). Cet immunogène est aussi libéré par les ECs apoptotiques en fin de vie. Dans les conditions normales, le nucléosome n'entre pas en contact avec les cellules du système immunitaire puisque les ECs apoptotiques sont rapidement phagocytées par les DCs et les macrophages<sup>232</sup>. Cependant, la prédisposition génétique au LED est associée à un défaut de phagocytose physiologique ce qui rend les macrophages non fonctionnels pendant les conditions apoptotiques intenses. C'est durant cette période que le nucléosome est exposé aux cellules immunitaires aboutissant à la production des anticorps anti-nucléaires (par exemple anticorps anti-ADN). L'accumulation de ces anticorps dans les tissus entraîne une activation pathologique du système immunitaire<sup>233, 234</sup>. Dans l'ensemble, le LED est une maladie auto-immune dirigée en premier lieu contre le nucléosome produit par les ECs apoptotiques.

#### 1.5.1.2 Les ECs comme une cible d'infection virale

Les virus sont désignés comme des parasites intracellulaires obligatoires dont la réplication dépend de la machinerie de leur cellule hôte. En effet, les virus possèdent généralement un tropisme pour les cellules caractérisées par une multiplication cellulaire importante comme les ECs. Ces derniers sont connus par les récepteurs épithéliaux qui permettant la pénétration des virus dans la cellule. Cela explique la fréquence élevée de maladies virales ciblant les tissus épithéliaux<sup>235</sup>.

L'infection des ECs par les virus induit le recrutement des cellules inflammatoires comme les pDCs. Ces derniers sont la source principale de l'IFN- $\alpha$  dans l'organisme qui agit en premier lieu sur les tissus épithéliaux<sup>236</sup>. L'interféron produit au sein du site d'infection provoque des dommages tissulaires et par conséquent la libération des auto-antigènes piégés dans le cytoplasme des ECs. Par exemple, le recours à l'IFN- $\alpha$  pour le traitement de l'hépatite C a été associé à

l'augmentation de la fréquence des maladies auto-immunes telles que la thyroïdite auto-immune<sup>236, 237</sup>.

Plusieurs maladies auto-immunes sont liées à des infections virales. C'est le cas de l'arthrite rhumatoïde causée par le virus d'Epstein Barr, ainsi que le diabète de type 1, causé par le virus Coxsackie<sup>238</sup>. En effet, l'infection virale n'induit pas uniquement des dommages tissulaires, mais également l'augmentation de l'expression d'antigènes à la surface des cellules infectées. Ces dernières deviennent ainsi une cible des cellules T CD8<sup>+</sup> et les cellules tueuses naturelles (NK) ce qui engendre la lyse cellulaire et la libération des auto-antigènes intracellulaires<sup>239, 240</sup>.

## **1.6 Objectifs de la thèse**

La régulation de l'expression du CMH I a été largement étudiée dans les cellules hématoïdes. Malgré leur rôle clé dans plusieurs processus physiologiques, la régulation de l'expression du CMH I par les ECs reste peu élucidée. À notre connaissance, les données du chapitre 2 représentent la première étude qui propose une analyse approfondie de l'expression du CMH I par les ECs primaires fraîchement isolées du thymus, de la peau, du colon et des poumons en condition physiologique.

D'autre part, la tolérance centrale est orchestrée majoritairement par les APCs thymiques (mTECs et tDCs). Nous avons donc évalué dans quelle mesure les APCs thymiques contribuent à la tolérance envers les ECs, connue pour être une cible indéniable des maladies auto-immunes (chapitre 3).

### **1.6.1 Objectifs spécifiques**

Objectif 1 : Comparer le niveau d'expression du CMH I dans les ECs primaires fraîchement isolées du thymus, de la peau, du colon et des poumons (chapitre 2).

Objectif 2 : Évaluer les mécanismes régulant la variation de l'expression du CMH I à la surface des ECs et son impact sur le fonctionnement thymique (chapitre 2).

Objectif 3 : Comparer le transcriptome des APCs thymiques avec celui des ECs extrathymiques (chapitre 3)

Objectif 4 : Étudier les caractéristiques des gènes qui sont exclusivement exprimés par les ECs extrathymiques et les gènes partagés avec les APCs thymiques (chapitre 3).

# **Chapitre 2 IFN- $\lambda$ Enhances Constitutive Expression of MHC Class I Molecules on Thymic Epithelial Cells**

## **2.1 Présentation de l'article**

Le CMH I joue un rôle clé dans la surveillance immunitaire. Cependant, la régulation de l'expression du CMH I a été exclusivement étudiée dans les cellules hématolymphoïdes. Dans cet article nous présentons la première étude visant à comprendre les mécanismes régulant l'expression du CMH I par les ECs primaires fraîchement isolées du thymus, de la peau, du colon et des poumons dans les conditions physiologiques. Une analyse phénotypique réalisée avec cytométrie en flux montre une grande variabilité de l'expression du CMH I à la surface des ECs primaires. Nous avons trouvé que l'expression du CMH I est 10 à 100 fois plus élevée à la surface des ECs thymiques (TECs) que les ECs extrathymiques. En effet, l'hétérogénéité de l'expression du CMH I est contrôlée par la transcription des gènes codant pour la structure du CMH I et ainsi que les gènes impliqués dans la génération des peptides destinés à la liaison au CMH I. Nous avons montré, dans cet article, que l'expression élevée du CMH I à la surface des TECs est principalement régulée par l'IFN- $\lambda$  produit par les mTECs médullaires (mTECs) dans les conditions physiologiques normales. Nous avons révélé que, chez la souris, l'absence de la voie d'IFN- $\lambda$  induit une altération de la sélection négative des thymocytes CD8<sup>+</sup> ce qui aboutit au développement des maladies auto-immunes.

Dans l'ensemble, cette étude dévoile le rôle imprévu de l'IFN- $\lambda$  dans l'amplification de l'expression du CMH I dans les TECs et son impact sur le fonctionnement thymique.

## 2.2 Contribution des auteurs

MB: Planification de l'étude et conception des méthodologies expérimentales. Exécution des expériences phénotypiques et transcriptomiques. Analyse des données RNA-seq. Écriture de la première version de l'article et préparation des figures.

JM : Exécution des expériences reliées à la quantification intracellulaire du CMH I chez les ECs pulmonaires et thymiques. Préparation de la figure 2-2 (D) et la figure supplémentaire 1.B, 1F et 1G. Participation à l'analyse et la discussion des résultats.

MDL : Participation à la discussion et l'analyse des résultats

LG : Réalisation des analyses histologiques

K.S.K : Fournir les souris déficientes pour NLRC5

SB : Supervision de l'étude. Exécution des expériences concernant l'impact de l'absence de l'IFN- $\lambda$  sur la délétion clonale. Préparation de la figure 7 et la figure supplémentaire 4.

CP : Planification de l'étude et analyse des résultats. Supervision de l'étude et écriture du manuscrit.

# IFN- $\lambda$ Enhances Constitutive Expression of MHC Class I Molecules on Thymic Epithelial Cells

**Running title:** IFN- $\lambda$  ENHANCES MHC I EXPRESSION ON TECs

Mohamed Benhammadi,<sup>\*,†</sup> Justine Mathé,<sup>\*,†</sup> Maude Dumont-Lagacé,<sup>\*,†</sup> Koichi S. Kobayashi,<sup>‡,§</sup>

Louis Gaboury,<sup>¶</sup> Sylvie Brochu,<sup>\*,†,||</sup> and Claude Perreault,<sup>\*,†,||</sup>

<sup>\*</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>†</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>‡</sup>Department of Microbial Pathogenesis and Immunology, Texas A&M Health Science Center, TX, USA

<sup>§</sup>Department of Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

<sup>¶</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

## **|| Corresponding authors:**

Claude Perreault: T + 514 343.6126, F + 514 343.5839, [claudio.perreault@umontreal.ca](mailto:claudio.perreault@umontreal.ca)

Sylvie Brochu: T +514-343.6111 ext 0594, F + 514 343.5839, [sylvie.brochu.1@umontreal.ca](mailto:sylvie.brochu.1@umontreal.ca)

The journal of immunology, 1 September 2020, 205 (5) 1268-1280

## 2.3 Abstract

Regulation of MHC class I (MHC I) expression has been studied almost exclusively in hematolymphoid cells. We report that thymic epithelial cells (TECs), particularly in the medulla (mTECs), constitutively express up to 100-fold more cell surface MHC I proteins than epithelial cells (ECs) from the skin, colon and lung. Differential abundance of cell surface MHC I in primary ECs is regulated via transcription of MHC I and of genes implicated in the generation of MHC I-binding peptides. Superior MHC I expression in TECs is unaffected by deletion of *Ifnar1* or *Ifngr1*, but is lessened by deletion of *Aire*, *Ifnlr1*, *Stat1* or *Nlrc5*, and is driven mainly by type III IFN produced by mTECs. *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice show impaired negative selection of CD8 thymocytes, and at 9 mo of age, present autoimmune manifestations. Our study shows unanticipated variation in MHC I expression by ECs from various sites and provides compelling evidence that superior expression of MHC I in TECs is crucial for proper thymocyte education.



## 2.4 Introduction

The main role of classic CD8 T cells is to use their clonotypic TCRs to scan MHC class I (MHC I)-peptide complexes (MPCs) present on the surface of various cell types<sup>241-243</sup>. Several vital processes specifically depend on interactions between TCRs and MPCs displayed by epithelial cells (ECs). For example, thymocyte selection is regulated by MPCs on thymic ECs (TECs)<sup>244, 245</sup>. Likewise, TCR recognition of MPCs on infected ECs (e.g. pneumocytes, enterocytes) is instrumental in the control of intracellular pathogens<sup>246, 247</sup>. Finally, since 80-90% of all cancers arise from ECs (carcinomas), cancer immunoediting largely depends on interactions between CD8 T cells and ECs<sup>248-250</sup>.

A recent study of 4323 human RNA-sequencing datasets representing 55 normal tissues and cell types revealed major discrepancies in the abundance of MHC I transcripts<sup>251</sup>. High expression of MHC I transcripts was found in hematolymphoid tissues (blood, spleen, bone marrow, lymph nodes) and tissues rich in lymphocytes and macrophages (lung, small intestine). MHC I transcripts were less abundant in other tissues, suggesting that MHC I expression is relatively low in ECs. In line with this, scattered reports based on immunohistochemistry analyses of primary tissue sections suggest that a sizeable fraction of ECs are MHC I<sup>lo/neg</sup><sup>252, 253</sup>. Moreover, it was recently shown that non-hematopoietic tissue-specific stem cells were indeed MHC I<sup>lo/neg</sup><sup>254</sup>. Because *in vitro* cultured cell lines typically show defective expression of some or all MHC I alleles<sup>255, 256</sup>, they cannot be used as a substitute for primary ECs. In order to precisely evaluate MHC I expression on various EC types, we, therefore, performed in-depth analyses of primary ECs freshly harvested from the thymus, skin, gut and lung. Skin, gut and lung epithelia are in contact with a rich microbiome, whereas TECs are located in a germ-free milieu where they orchestrate thymocyte positive and negative selection.

We also wished to elucidate how MHC I expression was regulated in various EC types. Indeed, mainly for technical considerations, regulation of MHC I expression has been studied almost exclusively in hematolymphoid cells and very little is known about this process in ECs<sup>257, 258</sup>. In hematolymphoid cells, MHC I expression is regulated at two levels: the transcription of MHC I genes, and the generation of MHC-associated peptides that stabilize MPCs. In at least some

hematolymphoid cells, constitutional MHC I transcription is controlled by NLRC5 [nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats containing (NLR) family, caspase activation and recruitment domain (CARD) domain containing 5] <sup>257, 258</sup>. In addition to its effect on MHC I, NLRC5 upregulates the expression of some (*B2M*, *TAP1* and *PSMB9*) but not all genes (e.g., *TAP2* and *PSMB8*) involved in antigen processing <sup>259</sup>. In NLRC5-deficient mice, MHC I expression is severely decreased in B cells, T cells, NK and NKT cells, and modestly decreased in dendritic cells (DCs) <sup>260-263</sup>. Cell surface expression of MHC I is also influenced by antigen processing because empty MHC I molecules remain in the endoplasmic reticulum until they are loaded with peptides, and then exported at the cell surface. Hence, increasing the peptide supply enhances the amount of cell surface MHC I molecules, at least for some MHC I alleles <sup>264, 265</sup>. Finally, cell-intrinsic or – extrinsic secretion of IFN type I, II and III can further upregulate MHC I expression by enhancing, through the activation of STAT1, transcription of MHC I genes and of all genes involved in antigen processing <sup>257, 258, 266</sup>.

We found that, compared with their DC neighbors, ECs from the skin, gut and lung expressed much lower levels of MHC I. In contrast, TECs expressed more MHC I than thymic DCs. Overall, the cell surface density MHC I was 10- to 100-fold greater in TECs than in extrathymic ECs. The superior expression of cell surface MHC I on TECs was driven mainly through constitutive secretion of type III IFN by medullary TECs (mTECs), and was impaired by deletion of the following genes: *Aire*, *Ifnlr1*, *Stat1* or *Nlr5*. In addition our study shows that reduction of MHC I expression on TECs impairs clonal deletion of CD8 thymocytes and can lead to autoimmunity.

## 2.5 Materials and methods

### *Mice*

BALB/c, C57BL/6J (B6), B6.129S(Cg)-Stat1<sup>tm1Dlv</sup>/J (or *Stat1*<sup>-/-</sup>; JAX stock no. 012606; <sup>267</sup>), B6.129S7-Ifngr1<sup>tm1Agt</sup>/J (or *Ifngr1*<sup>-/-</sup>; JAX stock no. 003288; <sup>268</sup>), B6.129P2-B2m<sup>tm1Unc</sup>/DcrJ (or *β2m*<sup>-/-</sup>; JAX stock no. 002087; <sup>269</sup>), B6.129S7-Rag1<sup>tm1Mom</sup>/J (or *Rag1*<sup>-/-</sup>; JAX stock no. 002216; <sup>270</sup>) and B6.129S2-Aire<sup>tm1.1Doi</sup>/J (or *Aire*<sup>+/-</sup>; JAX stock no. 004743; <sup>271</sup>) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). B6.129S2-Ifnar1<sup>tm1Agt</sup>/Mmjax (or *Ifnar1*<sup>-/-</sup>; MMRRC stock no. 32045; <sup>272</sup>) was obtained from Mutant Mouse Resource & Research Centers. The mutant

mouse line *Ifnlr1*<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup> (or *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>) was provided by Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project and its funders<sup>273-276</sup>. *Nlrc5*<sup>-/-</sup> mice, belonging to Dana-Farber Cancer Institute, were provided by the Texas A&M Health Science<sup>260</sup>. *Aire*<sup>-/-</sup>, *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and *Nlrc5*<sup>-/-</sup> mice used in this study were obtained by mating heterozygous parents; and *Aire*<sup>+/+</sup>, *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> and *Nlrc5*<sup>+/+</sup> littermates, respectively, were used as wild-type (WT) controls.  *$\beta$ 2m*<sup>+/-</sup> mice used in this study were obtained by mating  *$\beta$ 2m*<sup>-/-</sup> males with B6 females. Unless indicated otherwise, 8-9-wk-old male mice were used for all experiments. Mice were maintained under-specific pathogen-free conditions at the Institute for Research in Immunology and Cancer. Mice were cared and handled in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. All protocols have been approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les animaux de l'université de Montréal.

### *Isolation of ECs*

Thymus: Thymic stromal cells were enriched as previously reported<sup>277, 278</sup>. Briefly, thymi were mechanically disrupted and enzymatically digested with Liberase (Roche Applied Science) and DNase-1 (Sigma-Aldrich). Skin: The whole skin was gently peeled off from the trunk and dorsum and, then incubated under agitation with the enzymatic cocktail<sup>279, 280</sup>. Colon: The procedure for isolation of intestinal crypts was based on a modification of Graves' protocol<sup>281, 282</sup>. Briefly, colons were rapidly removed and cut into 3-4 cm pieces. The segments were rinsed with PBS, cut longitudinally and digested to release epithelial cells. Lung: Isolation of lung ECs was performed as described previously<sup>283, 284</sup>. Lung samples were cut in small pieces and fragments were digested. Like the thymus, skin, colon and lung fragments were digested with Liberase and DNaseI. Single-cell suspensions were maintained at 4°C in FACS buffer (PBS, 0.1% (w/v) BSA, and 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>) prior to cell staining for flow cytometry analysis and cell sorting.

### *Flow cytometry and cell sorting*

Single-cell suspensions were stained with the following antibodies: anti-Epcam APC-Cy7 (Biolegend), anti-CD45 APC or AF700 or V500 (Biolegend), anti-IA-IE AlexaFluor700 ou BV510 ou PE (clone M5/114.15.2), anti-CD31 AlexaFluor 488, anti-CD11c PE-Cy7 (BD Biosciences), Streptavidin-PE-Cy7 or -BV421 (BD Biosciences) and Ulex europaeus lectin 1 (UEA1; Vector Laboratories). Anti-GR-1 FITC (clone RB6-8C5; BD Biosciences), Ly-51 PE-Cy7 (clone BP-1; BD Biosciences), anti-TER119 AlexaFluor700 (BioLegend). Viability was assessed using 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BD Biosciences). Flow cytometry was performed on a BD FACS Canto II (BD Biosciences) or a ZE5 (Yeti, Bio-Rad) flow cytometer. Cell sorting was performed using a BD FACSAria (BD Biosciences), and all data were analyzed using the FACSDiva or FlowJo softwares.

### *Quantification MHC I molecules at the surface of primary ECs*

H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup>-PE clone 28-8-6 (BioLegend) was used for staining MHC I molecules on ECs from mice with a B6 genetic background. H2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup>-PE clone 34-1-2s (BioLegend) was used for staining MHC I molecules on ECs from BALB/c mice. Cells labelled with isotype control (BioLegend)

were used to exclude fluorescence background. Cell subsets were gated as shown in Supplemental Fig. 1A. Flow cytometry components can display variability from day to day. In order to minimize these variations and ensure the accuracy and precision of the measurements, we applied BD FACS canto II quality control using the Cytometer Setup & Tracking feature within BD FACSDiva software. To verify the laser delay and area scaling, manual quality control using Rainbow beads (Spherotech) was also performed before each analysis<sup>285</sup>.

#### *Quantification of intracellular MHC I*

The experimental design is depicted in Supplemental Fig. 1B. First, TECs and lung ECs were stained for surface markers, then MHC I surface proteins were stained with saturating concentration of anti-H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> (clone: 28-8-6, Biolegend) purified Ab. Cell viability was assessed using the Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) following manufacturer's recommendations. An aliquot of the saturated cells was fixed/permeabilized using cytofix cytoperm kit (BD bioscience) and stained with anti-H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup>-PE Ab (clone:28-8-6, Biolegend). Remaining saturated cells were stained with anti- H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> -PE without prior permeabilisation in order to assess potential residual MHC I surface staining after saturation. Levels of intracellular and surface-residual MHC I were assessed by flow cytometry using a ZE5 (Bio-Rad) and analyzed using FlowJo software (Tree Star). Specific intracellular H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> staining was obtained by subtracting the residual surface median fluorescence intensity (MFI) from the total intracellular staining MFI (Supplemental Fig. 1B).

#### *Quantification of total STAT1 and pSTAT1 in primary ECs*

After cell surface staining, cells were fixed with BD Phosflow<sup>TM</sup> Fix buffer I (BD Biosciences) at 37°C for 10 minutes. After washing, cells were permeabilized with BD Phosflow<sup>TM</sup> Perm Buffer III for 30 minutes on ice. For the detection of total STAT1, intracellular staining of permeabilized primary epithelial cells was carried out using anti-STAT1 AlexaFluor 647 (BD biosciences). Phosphorylated STAT1 were evaluated by staining of permeabilized cells with biotinylated anti-phospho-STAT1 (Tyr<sup>701</sup>; clone 58D6 ; Cell Signaling Technology) for 20 minutes followed by 10 minutes of incubation with streptavidin conjugated to BV421 (Biolegend). Samples were, then washed and acquired immediately using an FACSCanto II flow cytometer.

### *RNA Sequencing*

After sorting primary epithelial cells, the total RNA was isolated using TRIzol and purified using the RNeasy micro kit (Qiagen). The quality of the extracted RNA was evaluated using Bioanalyzer RNA Pico chips (Agilent Technologies). cDNA libraries were prepared from poly (A)-enriched mRNA using the KAPA Stranded mRNA-Seq Kit. Libraries were further amplified and used for paired-end RNA-Seq on the Illumina NextSeq500 machine using Nextseq High Output 75 cycles flowcell and at least 20M reads were generated per samples. Each biological replicate contained FACS-sorted primary ECs pooled from 5 male mice. For each primary EC type, three biological replicates were included. Sequences were trimmed for sequencing adapter using Trimmomatic version 0.35<sup>286</sup> and aligned to the *Mus musculus* (mm10) reference genome (or GRCm38) using STAR version 2.5.1b<sup>287</sup>. The level of gene expression was estimated as fragments per kilobase million mapped reads (FPKM) obtained directly from STAR. RNA-sequencing data have been deposited in Gene Expression Omnibus archives under accession number GSE144722. Unless stated otherwise, gene expression visualized in heat maps was normalized as Z-score in order to estimate relative gene expression across the different epithelial cell types. We also performed analyses on previously published single-end RNA-sequencing data<sup>288</sup>; in that case, data were expressed in reads per kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM).

### *Quantitative RT-PCR experiments*

Quantitative RT-PCR was used to examine the expression of *Ifnl2* and *Ifnl3* mRNA in several cell types isolated from thymus and lung. After cells sorting, total RNA was extracted using RNeasy Micro (Qiagen). RNA integrity was validated using a Bioanalyzer 2100 (Agilent). Total extracted RNA was treated with DNase and reverse transcribed using the Maxima First Strand cDNA synthesis kit with ds DNase (Thermo Fisher Scientific). Gene expression was determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)). For each PCR assay, a standard curve was performed to ensure that the efficiency of the assay was between 90% and 110%. Primer sequences for quantitative RT-PCR were as follows: *Ifnl2* forward (5'-AGGTGCAGTTCCCACCTCT-3') and reverse (5'-TCAGTCATGTTCTCCCAGACC-3'), *Ifnl3* forward (5'-TCCCAGCTGCAGACCTGT-3') and reverse (5'-CAGGGGTCTCCTTGCTCTG-3'), *Pgkl* forward (5'-CCAAGACTGGCCAAGCTACT-3') and reverse (5'-TGCTCTCAGTACCACAGTCCA-3'), *Gapdh* forward (5'-

TGTCGTCGTGGATCTGAC-3') and reverse (5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'). The QuantStudio PCR instrument (Thermo Fisher Scientific) was used to detect the amplification level. Comparison of relative expression (relative quantification =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) was performed using the Expression Suite software (Thermo Fisher Scientific), using both *Gapdh* and *Pgk1* as endogenous controls.

#### *Cleaved caspase 3 assay*

Thymi were isolated and thymocytes were extracted by mechanical force. CCR7 staining on thymocytes was performed for 30 min at 37° with anti-CCR7 PE-Cy5 (4B12; BioLegend), followed by surface marker staining for 25 min with following Abs: anti-CD4 AF700 (RM4-5; BD Biosciences), anti-CD8 $\alpha$  V500 (53-6.7; BD Horizon), anti-TCR $\beta$  PE/Dazzle594 (H57-597; BioLegend), anti- H2K<sup>b</sup> allophycocyanin (AF6-88.5.53; eBioscience), anti-CD25 allophycocyanin-Cy7 (PC61; BioLegend), CD1d- $\alpha$ -GalCer tetramers BV421 (National Institutes of Health), anti-TCR $\gamma\delta$  BV421 (GL3; BioLegend), anti-CD44 BV650 (IM7; BioLegend), anti-CD69 PE-Cy7 (H1.2F3; BD Biosciences), anti-CD5 PE (53-7.3; BD Biosciences), CD19 BUV 395 (6D5; BD Biosciences). For cleaved caspase 3 (C92-605; BD Biosciences) staining, cells were processed as quickly as possible following harvest to avoid nonspecific apoptosis. Following surface staining, cells were fixed with Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) for 30 min at 4°C. Cells were then washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences) twice, then stained with anti-cleaved caspase 3 Ab (C92-605; BD Biosciences) for 30 min at 20°C. Flow cytometry analysis was performed on a ZE5 (Bio-Rad). Data were analyzed using FlowJo software.

#### *Detection of inflammatory cell infiltration and autoantibodies*

Serum and organs were collected from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> mice at the age of 9 months. Sera were obtained from cardiac puncture. Organs were harvested and fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with H&E. Slices were scanned with the Nanozoomer 2.0-HT from Hamamatsu with 20x magnification, and examined with the NDPscan software (Hamamatsu). Immune infiltrates of organs were confirmed and scored by independent reading of the slides with pathologist. For the detection of the autoantibodies, serial frozen sections of various organs from *Ragl*<sup>-/-</sup> mice were incubated with diluted sera in 0.01% Triton-PBS (1:50) followed by Alexa-Fluor-555-conjugated goat anti-mouse IgG polyclonal antibodies (1:500, Invitrogen). DAPI

(MolecularProbes) was included in the last wash for identification of nuclei. Omission of sera and replacement of sera by purified mouse polyclonal isotype (Millipore) were used as controls. Images were acquired with an LSM880 confocal microscope (Zeiss) with 40× magnification and analyzed using ImageJ.

#### *Serum immunoglobulin levels*

Levels of six different subclasses of immunoglobulin (IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2c, IgA and IgM) were measured using an ELISA kit SBA Clonotyping System-C57BL/6-AP (SouthernBiotech). The serum used for this analysis were isolated from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> mice aged 9 months. Briefly, 96 well ELISA plates (Nunc) were coated with goat anti-mouse immunoglobulin (5 µg/ml) overnight at 4 °C. Then, wells were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hour at room temperature. Subsequently, serially diluted sera were added to the coated plate and incubated for 1 hour at room temperature with gentle shaking. For Ig detection, alkaline phosphatase–labeled goat anti-mouse IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3, IgA, or IgM secondary Abs were added for 1 hour at room temperature. After washing, *para*-Nitrophenyl phosphate substrate solution (SouthernBiotech) was added and optical densities were measured at 405 nm by TECAN microplate reader. Then, the relative quantity of isotype-specific immunoglobulins was calculated based on the standard curve generated with C57BL/6 Mouse Immunoglobulin Panel (SouthernBiotech).

#### *Statistical analysis*

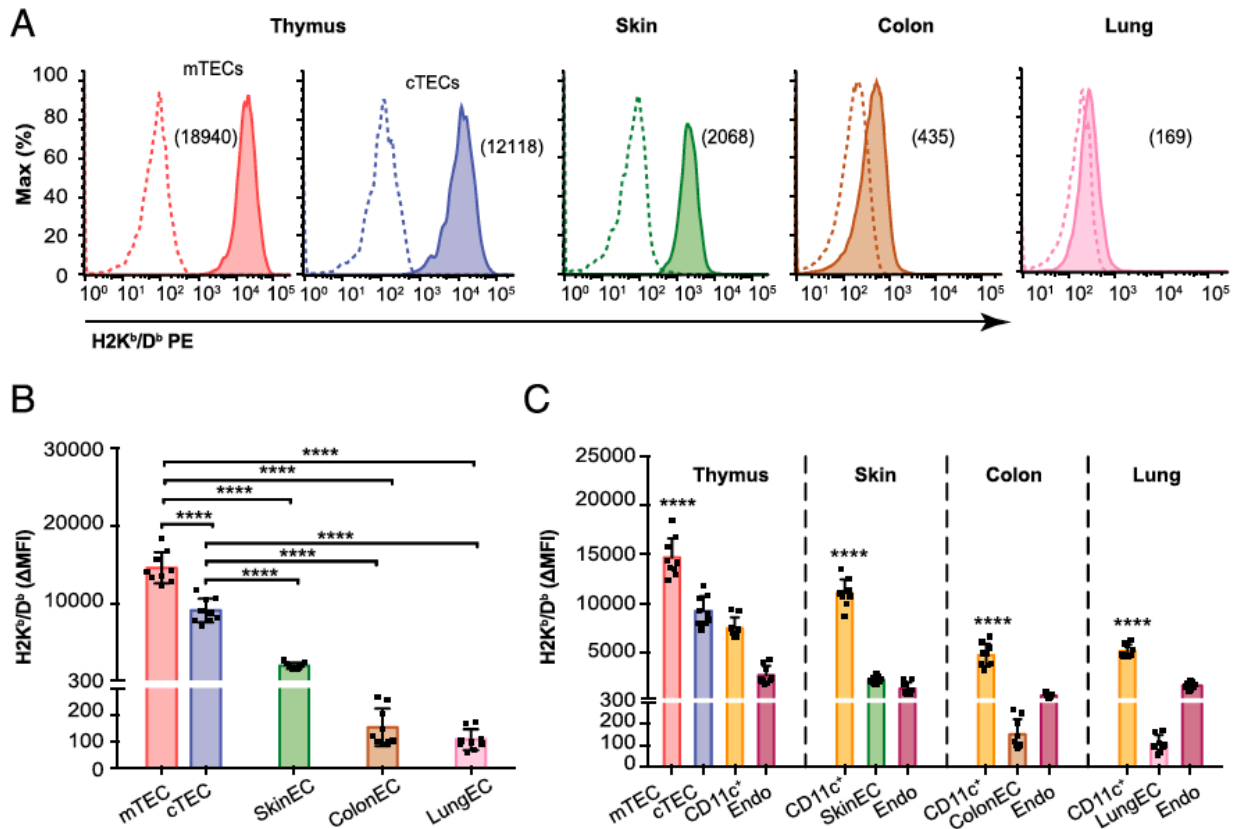
Unless stated otherwise, values are expressed as mean ± SD, and sample sizes of at least n = 3 were used for statistical analyses. Statistical differences between two groups were calculated with a two-tailed Student's t test using GraphPad Prism version 7.5 software. A repeated-measures one-way ANOVA was used when comparing three or more groups followed by post hoc test (Dunnett's test or Tukey's test) for multiple comparison. P-values < 0.05 were considered statistically significant (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.005, \*\*\*\**p* < 0.0001). Sample size, experimental replicates, and additional details are included in the figure legends.



## 2.6 Results

### 2.6.1 Major heterogeneity in the constitutive expression of MHC I molecules by different types of ECs

Since CD8 T cells interact with cell surface MHC I molecules, we primarily wished to analyze cell surface MHC I density in different types of ECs. Enzymatic tissue digestion is needed for isolation and analyses of ECs. Hence, as a prelude to our work, we evaluated cell surface expression of classic MHC I molecules (H2K<sup>b</sup> and H2D<sup>b</sup>) on TECs obtained after treatment with liberase, papain and dispase (Supplemental Fig. 1C). As we observed that liberase digestion allowed optimal preservation of MHC I, we used this enzyme for isolation of ECs from the thymus, skin, colon, and lung of B6 mice (Supplemental Fig. 1A, 1D). TECs were further separated based on UEA-1 expression. FACS sorted UEA-1<sup>+</sup> cells had the transcriptomic profile of mTECs while UEA-1<sup>-</sup> cells had the transcriptomic profile of cortical TECs (cTECs) (Supplemental Fig. 1E). H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> staining intensity varied over 100-fold range according to the following hierarchy: mTECs > cTECs > skin ECs > colon ECs and lung ECs (Fig. 1A, 1B). The cell surface density of H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> was higher on mTECs than cTECs, and higher on cTECs than on all types of extrathymic ECs. In contrast, cell surface levels of H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> showed minimal if any variations between CD11c<sup>+</sup> DCs and CD31<sup>+</sup> endothelial cells harvested from the thymus and extrathymic tissues (Fig. 1C). As a result, the thymus was conspicuously different from extrathymic tissues. Indeed, the highest density of H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> was found on mTECs in the thymus, and on DCs in extrathymic tissues (Fig. 1C). The major differences in MHC I expression between EC types were not peculiar to the H2<sup>b</sup> haplotype or the B6 genetic background since they were also observed with the H2<sup>d</sup> haplotype of BALB/c mice (Supplemental Fig. 2A-C). Hence, irrespective of the genetic background, TECs expressed much higher levels of MHC I than extrathymic ECs.



**Figure 2-1** H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> staining intensity on the surface of cells from different tissues.

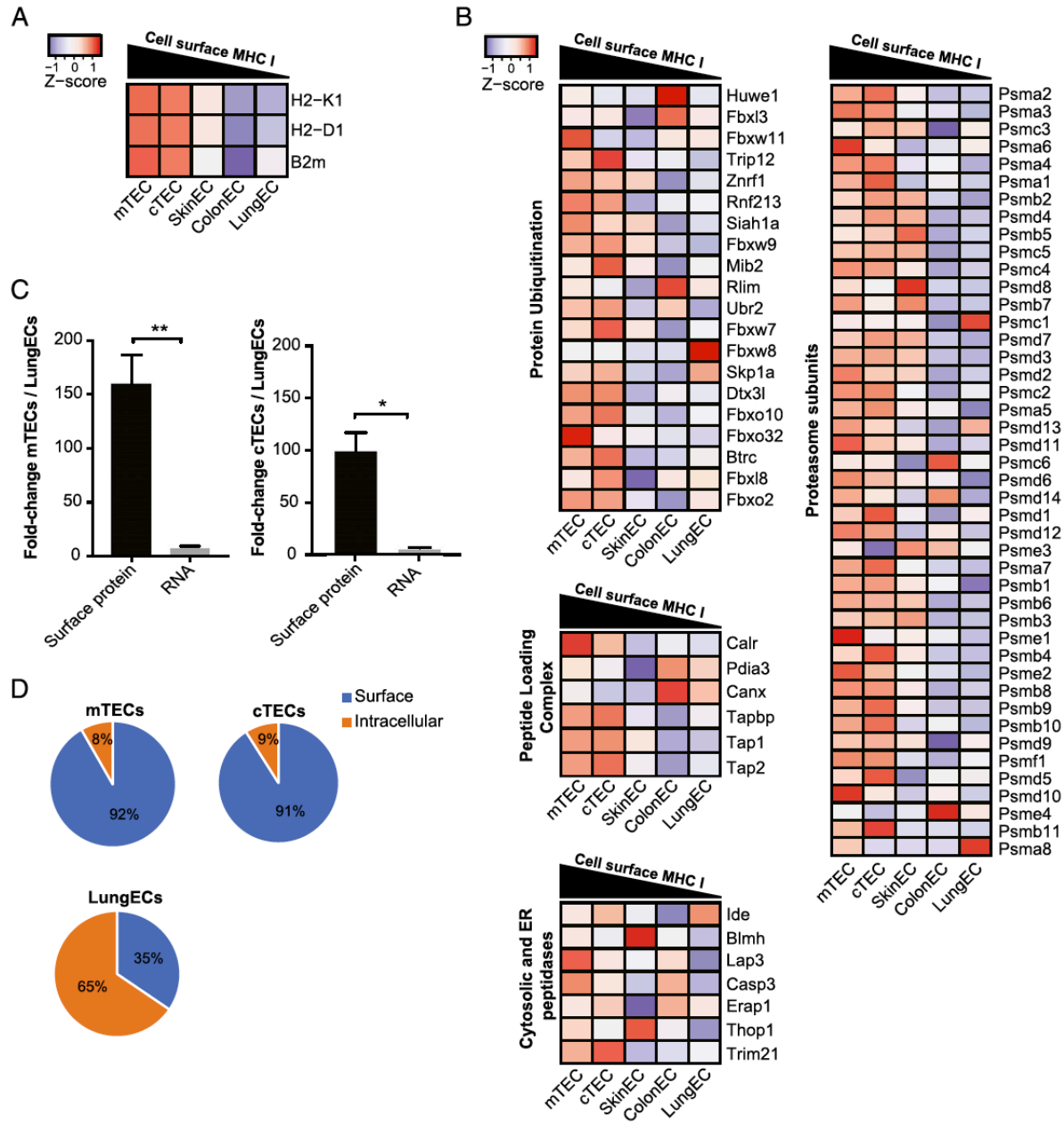
(A) Representative fluorescence intensity of H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> staining on ECs from the thymus, skin, lung and colon of eight wk-old B6 mice. The MFI of stained cells is shown in parentheses. Empty histograms represent isotype control staining. Gating strategies are shown in Supplemental Fig. 1A. (B-C) Surface expression of MHC I obtained from nine mice per group, tested in 3 independent experiments. For comparison of different cell populations, the MFI of the isotype controls was subtracted from the MFI of H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> staining ( $\Delta$ MFI). Dots represent individual mice. (B) Comparison of different EC types. (C) Comparison of ECs with DCs (CD11c<sup>+</sup>) and endothelial cells (Endo; CD31<sup>+</sup>) from the same site. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was determined by one way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

## 2.6.2 Transcriptional regulation of differential MHC I expression

In order to understand the mechanisms responsible for differential MHC I expression, we performed RNA-sequencing analyses of FACS-sorted EC populations. Gene expression was assessed as FPKM. As expected, transcripts encoding classical MHC I heterodimers (B2m, H2-K1, and H2-D1) exhibited much higher expression in TECs than extrathymic ECs (Fig. 2A). These differences seen were not an artifact of poor sequencing quality (in extrathymic ECs) because other transcripts showed similar or even superior abundance in extrathymic ECs relative to TECs (Supplemental Fig. 2D). Furthermore, the relative abundance of MHC I transcripts in EC subsets correlated with their relative protein levels, as measured by FACS (Fig. 2A). In addition, we observed that non-classical MHC I (MHC Ib) transcripts were also expressed at higher levels in TECs than in extrathymic ECs (Supplemental Fig. 2E). TECs also exhibited higher expression of transcripts regulating all steps of MPC processing: protein ubiquitination, proteasomal degradation, peptide transport from the cytosol to the ER and peptide loading of MHC I (Fig. 2B). We concluded that the superior expression of MHC I in TECs probably depended on both enhanced transcription of MHC I and enhanced generation of MPCs.

Notably, when comparing the cell types at the two ends of the MHC I expression hierarchy, mTECs and lung ECs, we observed that the differential expression of MHC I was much more dramatic at the level of cell surface proteins (150-fold difference) than at the RNA level (10-fold difference) (Fig. 2C). This was also the case when cTECs were compared to lung ECs. These observations further supported the idea that differential expression of cell surface MHC I could not be ascribed solely to enhanced transcription of MHC I. In our effort to obtain direct evidence that MPC generation contributed to differential MHC I expression, we took advantage of the fact that empty MHC I molecules are retained intracellularly; they are exported at the cell surface only when stably loaded with peptides<sup>289, 290</sup>. Accordingly, we noted that the proportion of intracellular H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> was increased in cells from  $\beta 2m^{-/-}$  since they cannot form stable MPCs (Supplemental Fig. 1F, 1G). We therefore reasoned that if lung ECs generated limiting amounts of MHC-binding peptides, they should contain more intracellular MHC I molecules than TECs. Flow cytometry analyses of cells stained with anti-H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> with or without prior permeabilization allowed to estimate the proportion of intracellular and cell surface H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> (Supplemental Fig. 1B). The distribution of MHC I molecules was very different in TECs and lung ECs (Fig. 2D and Supplemental Fig. 1F,

1G). In TECs, 90% of MHC I molecules were at the cell surface and 10% were intracellular. In contrast, lung ECs contained more MHC I proteins in the intracellular compartment (65%) than at the cell surface (35%). Together, these transcriptomic and flow cytometry analyses show that differential abundance of cell surface MHC I in ECs is regulated via transcription of MHC I and of numerous genes responsible for the generation of MHC I-binding peptides. Relative to TECs, lung ECs had less MHC I proteins, of which a smaller fraction was at the cell surface, presumably because of limiting amounts of MHC-binding peptides.



**Figure 2-2** Transcriptomic and flow cytometry analyses of ECs from different sites.

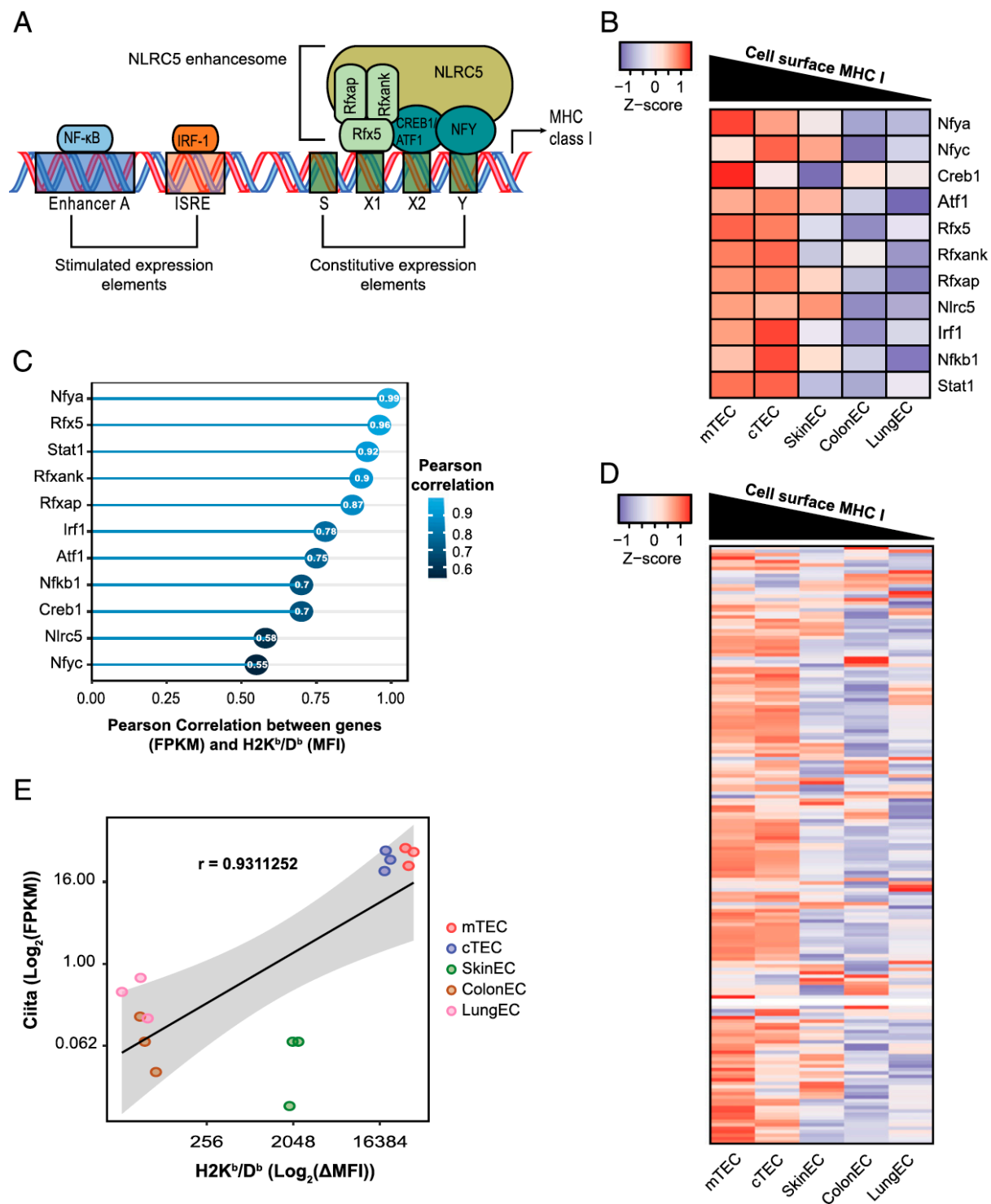
(A) Heatmaps of RNA-sequencing data for genes encoding MHC I molecules and (B) components of the MHC I presentation pathway. (A, B) Levels of gene expression are depicted as Z-scores, calculated from FPKM. (C) Fold-change of MHC I surface protein and mRNA expression between TECs and lung ECs. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. An unpaired Student T-test was performed.  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.001$ . (D) Pie charts showing the distribution (cell surface vs. intracellular) of H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> molecules in TECs and lung ECs. The results are expressed in

percentages calculated as explained in Supplemental Fig. 1B. Data were pooled from 2 independent experiments ( $n = 4$  mice per group).

### **2.6.3 Differential MHC I expression is controlled by genes that affect constitutive and inducible MHC I transcription**

In hematolymphoid cells, constitutive and inducible MHC I transcription is regulated by several regulatory elements depicted in Fig. 3A. In EC populations, we found that almost all known regulators of MHC I transcripts were expressed at higher levels in TECs than in extrathymic ECs (Fig. 3B). Next, we computed the Pearson correlation coefficient between expression (FPKM) of MHC I regulatory elements and the abundance of cell surface MHC I in ECs from the thymus, skin, colon and lung. For individual MHC I regulatory elements, the correlation with the abundance of cell surface MHC I ranged from 0.55 to 0.99 (Fig. 3C). This positive correlation was observed for elements regulating constitutive as well as inducible MHC I expression.

The strong correlation of MHC I expression with *Irf1* and *Stat1* (Fig. 3B, 3C) suggested that IFN signaling might play a dominant role in the differential MHC I expression found in TECs vs. extrathymic ECs. There are three types of IFN. Type II IFN signaling is driven essentially by phosphorylation of STAT1 on tyrosine 701 and its translocation to the nucleus. On the other hand, transduction of type I and type III IFN signaling is mediated by interferon stimulated gene (ISG) factor 3 (ISGF3), a complex that includes interferon regulatory factor 9 (*Irf9*) together with phosphorylated STAT1 and STAT2<sup>291</sup>. The putative role of IFN in regulating MHC I expression in ECs was supported by three series of experiments. First, by analyzing a dataset of 173 ISGs (Supplemental Table I), we found a higher expression of ISG transcripts in TECs relative to extrathymic ECs (Fig. 3D). These ISGs included the key molecules mediating IFN signals to the nucleus (*Stat1*, *Stat2* and *Irf9*) (Supplemental Fig. 3A-C), as well as *Ciita*, the MHC II transactivator (Fig. 3E). Second, at the protein level, TECs, and in particular mTECs, contained greater amount of STAT1 and phosphorylated STAT1 (pSTAT1) than other ECs (Fig. 4A, 4B, and Supplemental Fig. 3D). Finally, *Stat1*<sup>-/-</sup> mice showed decreased expression of cell surface MHC I in cTECs and mTECs, but not in ECs from the skin, colon and lung (Fig. 4C). Together, these results provide compelling evidence that IFN signaling modulates differential MHC I expression in thymic vs. extrathymic ECs.



**Figure 2-3** Overexpression of MHC I in TECs is driven by IFN signaling.

(A) Schematic representation of the MHC I promoter region. (B) Heatmap showing the expression of transcripts regulating constitutive and inducible MHC I expression. Levels of gene expression are depicted as Z-scores, calculated from FPKM. (C) Diagram illustrating the positive correlation between MHC I regulatory elements (FPKM) and the cell surface expression of MHC I ( $\Delta$ MFI). Pearson's correlation was used for this analysis. (D) Heatmap showing the expression of ISGs in different EC types. Levels of gene expressions are depicted as Z-scores, calculated from FPKM. The gene set used for this analysis contained 173 genes from AmiGo (GO-0034340 and GO-0034341) complemented with ISGs induced predominantly by type III IFN <sup>292</sup>. ISGs are listed in Supplemental Table I. (E) Pearson's correlation between *Ciita* and the cell surface expression of MHC I.

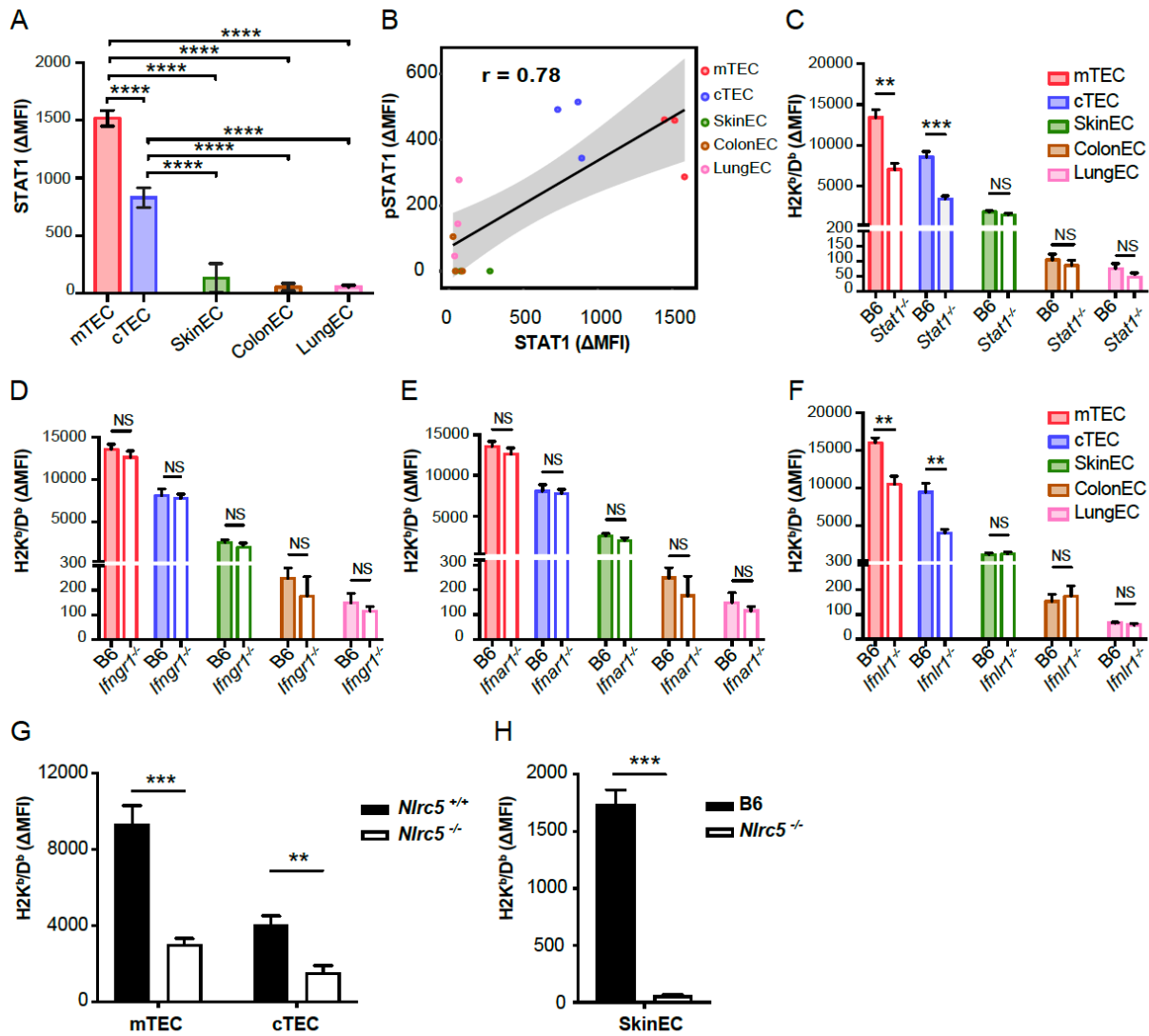


## 2.6.4 Constitutive MHC I expression in TECs is sustained by type III interferon (IFN- $\lambda$ )

We next wished to determine which type of IFN might be necessary for the superior expression of MHC I in TECs. To this end, we analyzed MHC I expression at the surface of ECs (thymus, skin, colon and lung) from WT, *Ifngr1*<sup>-/-</sup>, *Ifnar1*<sup>-/-</sup> and *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4D-F). The first notable finding was that MHC I expression on extrathymic ECs was unaffected by the absence of *Ifngr1*, *Ifnar1* or *Ifnlr1*. This is coherent with the lack of impact of STAT1 deficiency on constitutive MHC I expression in extrathymic ECs (Fig. 4C). In contrast, MHC I expression on mTECs and cTECs were specifically decreased in *Ifnlr1*-deficient mice relative to WT littermates. Lack of *Ifngr1* or *Ifnar1* had no effect on MHC I expression in TECs. Hence, IFN- $\lambda$  is the sole type of IFN that is necessary for maximal MHC I expression in TECs. Several transcriptomic analyses have shown a major overlap between genes induced by type I and type III IFNs<sup>293, 294</sup>. However, according to a recent report on vaginal ECs, *Cxcl10* and *Cxcl11* are preferentially, if not exclusively, induced by type III IFN<sup>295</sup>. Notably, *Cxcl10* and *Cxcl11* transcripts were expressed at higher levels in TECs than in extrathymic ECs (Supplemental Fig. 3E), further supporting the presence of constitutive IFN- $\lambda$  signaling in TECs. The relation between IFN- $\lambda$  and TECs observed herein is even more remarkable considering that lack of *Ifnlr1* had no effect on any extrathymic EC tested. Nonetheless, while TECs deficient in *Ifnlr1* or *Stat1* expressed less MHC I than WT TECs, they still expressed more MHC I than WT extrathymic ECs (Fig. 4C, 4F, and Supplemental Fig. 3F, 3G). This suggests that in these knockout mice, other molecules (including type I IFN, type II IFN and STAT2) may partially compensate for the absence of *Ifnlr1* and *Stat1*.

In hematolymphoid cells, type I and type II IFN enhance MHC I expression via induction of the *Nlr5* transactivator<sup>258, 260, 296</sup>. However, whether type III IFN can modulate MHC I in ECs is not known. We therefore analyzed the impact of *Nlr5* deficiency in TECs. In cTECs, MHC I expression was decreased to the same extent in *Nlr5*<sup>-/-</sup> and *Stat1*<sup>-/-</sup> mice deficiency (Fig. 4G and Supplemental Fig. 3H). In mTECs, the impact of *Nlr5* deletion was slightly superior to that of *Stat1* deletion. *Nlr5* was absent in ECs from the colon and lung, but was expressed at similar levels in mTECs and skin ECs (Supplemental Fig. 3I). Of note, in the MHC I expression hierarchy, skin ECs are the extrathymic ECs that express the highest amounts of MHC I (Fig. 1). We observed an almost total loss of MHC I on skin ECs from *Nlr5*<sup>-/-</sup> mice, indicating that MHC I expression on

these cells is strictly dependent on *Nlrc5* (Fig. 4H). Nonetheless, the high expression of *Nlrc5* transcripts in skin ECs is not sufficient to drive MHC I expression at the level found in TECs.



**Figure 2-4** Deletion of *Ifnlr1*, *Stat1* or *Nlrc5* decreases MHC I expression in TECs.

(A) Abundance of total STAT1 in various types of ECs. The results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was determined by one way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons ( $****p \leq 0.001$ ). (B) Pearson's correlation between abundance of STAT1 and pSTAT1 in various EC types. (C-F) Surface expression of MHC I in eight wk-old WT B6 mice relative to age-matched (C) *Stat1*<sup>-/-</sup>, (D) *Ifngr1*<sup>-/-</sup>, (E) *Ifnar1*<sup>-/-</sup> and (F) *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (6 mice per group, tested in two independent experiments). (G, H) Surface expression of MHC I on (G) TECs and (H) skin ECs of eight wk-old WT littermates relative to

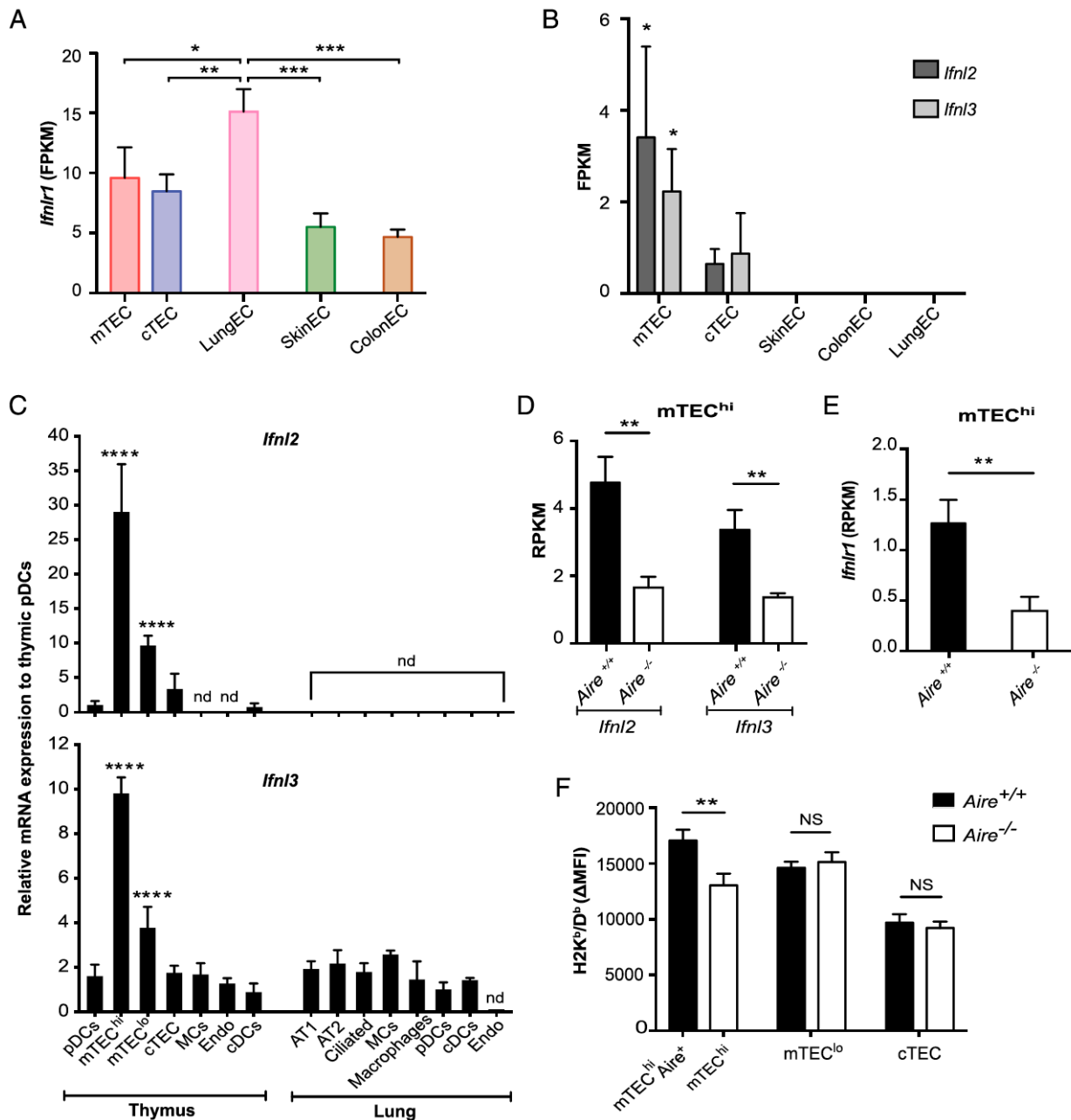
*Nlr5*<sup>-/-</sup> mice. Results are expressed as mean ± SD (*n* = 3). Statistical significance was determined by unpaired Student *t* test. \*\**p* ≤ 0.001, \*\*\**p* ≤ 0.0005. NS, non-significant.

### 2.6.5 mTECs are the main source of IFN-λ in the thymus

We next sought to understand why TECs were so uniquely dependent on IFN-λ to maintain normal levels of MHC I. To this end, we analyzed our RNA-sequencing data to evaluate the expression of transcripts coding for IFN-λ (*Ifnl2* and *Ifnl3*) and its receptor (*Ifnlr1*). *Ifnlr1* was ubiquitously expressed by ECs, and was expressed at higher levels in lung ECs than in other EC types (Fig. 5A). However, TECs (and in particular mTECs) were the sole ECs that produced *Ifnl2* and *Ifnl3* (Fig. 5B). We found in RNA-sequencing data from the Immunological Genome Project that TCRαβ and TCRγδ thymocytes do not express *Ifnl2* or *Ifnl3* transcripts (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA429735>). However, we wished to investigate whether some other cell types could contribute to IFN-λ signaling in TECs. To address this question, we analyzed *Ifnl2* and *Ifnl3* expression by quantitative RT-PCR on the following FACS-sorted thymic and lung cell populations: EC subsets, DC subsets, mesenchymal cells, macrophages and endothelial cells. In these analyses, mTECs were further divided in mTEC<sup>hi</sup> and mTEC<sup>lo</sup> as a function of their MHC II expression level<sup>244</sup>. The procedure used for FACS-sorting is shown in Supplemental Fig. 3J. Interpretation of these analyses was unambiguous: i) lung cells produced minimal amounts of *Ifnl3* and no *Ifnl2*, ii) in the thymus, TECs were the only cells producing substantial amounts of *Ifnl2* and *Ifnl3*, and iii) among TEC subsets, expression of *Ifnl2* and *Ifnl3* adhered to the following hierarchy: mTEC<sup>hi</sup> > mTEC<sup>lo</sup> > cTEC (Fig. 5C).

Of note, the hierarchy of IFN-λ production in TEC subsets (Fig. 5C) was similar to the hierarchy of promiscuous gene expression<sup>297</sup>. Considering the prominent role of *Aire* in promiscuous gene expression<sup>288, 298, 299</sup>, we wondered whether *Aire* might regulate IFN-λ production in TECs. We therefore re-analyzed RNA-sequencing data performed on the mTEC<sup>hi</sup> population (where *Aire* is expressed) from *Aire*<sup>-/-</sup> and WT littermates<sup>288</sup>. We found that expression of genes coding for IFN-λ and IFNLR1 [expressed as reads per kilobase million (RPKM)] was significantly decreased in mTEC<sup>hi</sup> from *Aire*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5D, 5E). We also observed a small but significant decrease of MHC I levels at the surface of *Aire*<sup>-/-</sup> mTEC<sup>hi</sup> (Fig. 5F). Overall, we conclude that i) in contrast to lung ECs, TECs constitutively produce IFN-λ, ii) mTECs are the dominant source of IFN-λ in the

thymus, and iii) that Aire is required for the amplification of IFN- $\lambda$  production in the mTEChi population.



**Figure 2-5** mTECs are the main source of IFN- $\lambda$  in the thymus. (**A**, **B**) RNA-seq analysis of *Ifnlr1*, *Ifnl2* and *Ifnl3* and in various EC types. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$  using one way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. (**C**) Quantitative RT-PCR analysis of *Ifnl2* and *Ifnl3* transcripts in FACS-sorted thymic and lung cell subsets. The relative expression (relative quantification =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) was

calculated using *Pgk1* as endogenous control. Data were normalized relative to thymic plasmacytoid DCs (pDCs). The results are expressed as means  $\pm$  SD (3 replicates per group, each replicate was a pool of 6 mice), nd, not detectable. Difference relative to pDCs was assessed using one way ANOVA followed by Dunnett's test for multiple comparisons (\*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ). Thymic cell subsets included pDCs, mTEC<sup>hi</sup>, mTEC<sup>lo</sup>, cTECs, mesenchymal cells (MCs), endothelial cells (Endo) and conventional DCs (cDCs). Lung cell subsets included alveolar type I and type II ECs (AT1 and AT2), ciliated ECs, MCs, macrophages, pDCs, cDCs and Endo. Gating strategies are shown in Supplemental Fig. 3J, **(D,E)** Expression of *Ifnl2*, *Ifnl3* and *Iflnr1* transcripts in *Aire*<sup>-/-</sup> mice relative to WT littermate (*Aire*<sup>+/+</sup>). Data were expressed in RPKM and retrieved from previously published RNA-sequencing data (accession number GSE65617). **(F)** Surface expression of MHC I in different TEC subsets isolated from the thymus of eight wk-old *Aire*<sup>-/-</sup> relative to *Aire*<sup>+/+</sup> mice.  $\Delta$ MFI was calculated as described in Fig. 1 legend. Results are expressed as means  $\pm$  SD (n = 3, in two independent experiments). \*\* $p \leq 0.005$  using unpaired Student t test. NS, non-significant.

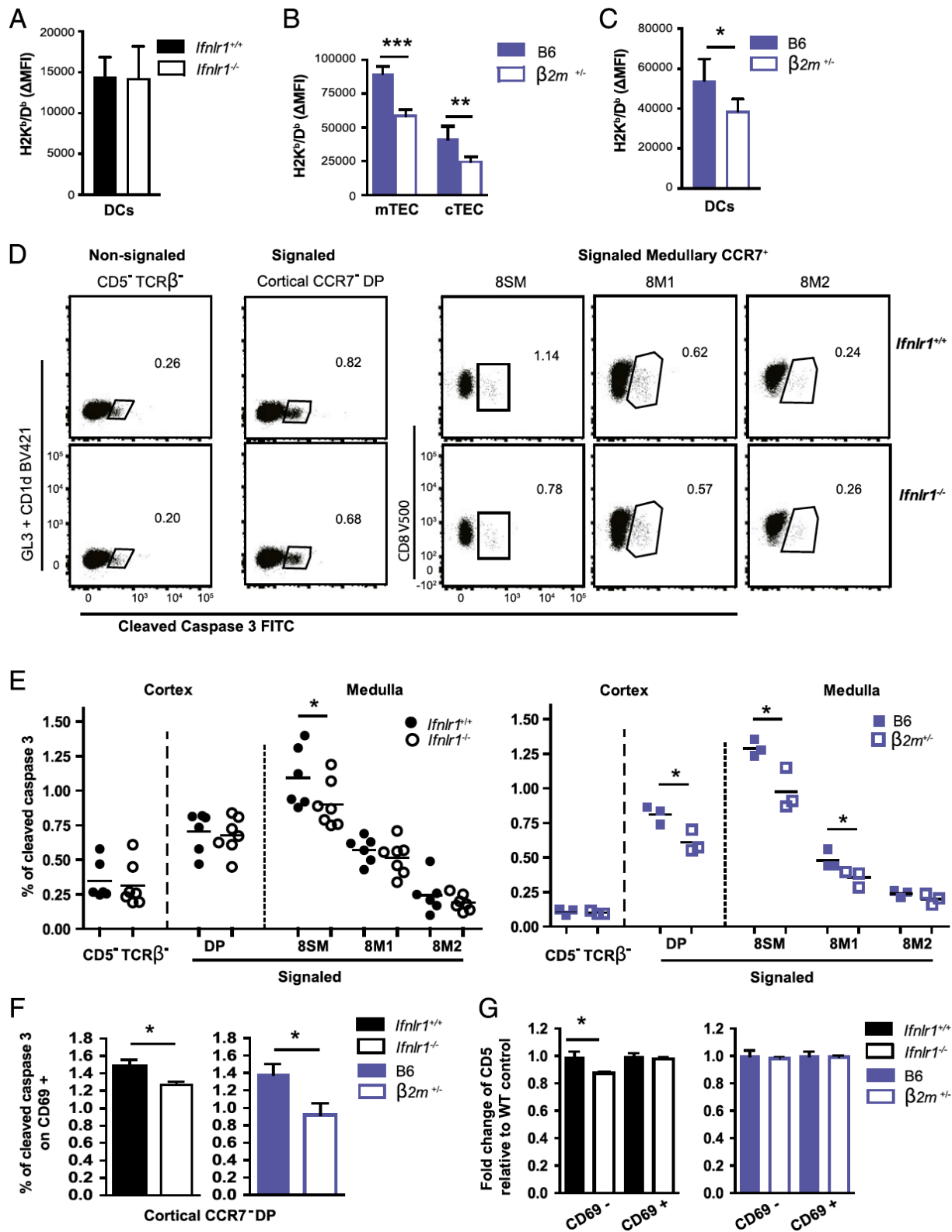
### 2.6.6 *Ifnlr1*-deficient mice show impaired negative selection in the medulla

Since MPCs on the TEC surface mold the TCR repertoire of developing thymocytes, we wondered whether the remarkably high expression of MHC I found on TECs (Fig. 1) was required for thymocyte development. In order to address this question, we studied thymocytes from WT, *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and  $\beta 2m^{+/-}$  mice. In *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> thymi, MHC I expression is decreased on TECs (Fig. 4F) but not on DCs (Fig. 6A). In  $\beta 2m^{+/-}$  thymi, MHC I expression is decreased on both TECs and DCs (Fig. 6B, 6C). The distribution of thymocyte subsets defined according to CD4 and CD8 staining was not affected by lack of *Ifnlr1* or  $\beta 2m$  haploinsufficiency (Supplemental Fig. 4A).

We used the method developed by Breed et al.<sup>300</sup> in order to distinguish thymocyte death by neglect and by clonal deletion (negative selection). Cleaved caspase 3<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>TCR $\beta$ <sup>-</sup> cells are dying by neglect whereas cleaved caspase 3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> cells represent cells undergoing clonal deletion. Since CCR7 upregulation is instrumental in transition from the cortex to the medulla, the anatomic site of clonal deletion can be approximated based on CCR7 expression (Supplemental Fig. 4B). In *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice, we found no perturbation of death by neglect nor of negative selection in the cortex; the sole anomaly was a decrease in clonal deletion of semi-mature CD8<sup>+</sup> thymocytes (8SM; Fig. 6D, 6E and Supplemental Fig. 4C). One could argue that the decreased deletion of semi-mature CD8<sup>+</sup> thymocytes might be due to some MHC I-independent effect of *Ifnlr1* deficiency. However, analysis of  $\beta 2m^{+/-}$  thymi revealed that decreased expression of MHC I was sufficient to decrease clonal deletion of semi-mature CD8<sup>+</sup> thymocytes (Fig. 6E).  $\beta 2m^{+/-}$  thymi also displayed a slight decrease in negative selection of cortical CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes, probably because these mice have decreased MHC I expression not only on TECs but also on DCs (Fig. 6B, 6C). The decreased frequency of caspase 3<sup>+</sup> cells in the thymus of *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and  $\beta 2m^{+/-}$  mice was significant but of small magnitude. This is explained by the fact that apoptotic thymocytes are rapidly cleared by thymic macrophages<sup>301</sup>. Thus, differences in negative thymocyte selection in the presence or absence of CD86 are of the same magnitude as those reported in our study<sup>300</sup>. Therefore, we conclude that a decrease in TEC MHC I expression is sufficient to increase the frequency of CD8 thymocytes that escape negative selection.

To further investigate the impact of cTEC MHC I expression on thymocyte selection, we examined specifically pre- and post-selection CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> thymocytes. While the percentage of

positively selected CD69<sup>+</sup> thymocytes was similar in *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> mice relative to WT controls (Supplemental Fig. 4D), the frequency of cleaved caspase 3 elements in these subsets was significantly decreased in both *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> thymi (Fig. 6F). We also analyzed the expression of CD5 because its expression correlates with the intensity of TCR signaling. While no difference was observed in positively selected CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes, we found a significant decrease in CD5 expression in pre-selection CD69<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> thymocytes in *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 6G). That CD5 expression was not decreased in  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> thymi could be explained by the fact that cell surface density of MHC I molecules was less decreased in  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> than in *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> cTECs (Supplemental Fig. 4E). Altogether, these findings suggest that decreased MHC I expression in cTECs is sufficient to disturb both positive and negative selection in the cortex. Moreover, we wish to note that mTECs and cTECs from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> mice have only a moderate (about 30% - 50%) decrease in MHC I expression. Hence, our model may underestimate the consequences that might be observed with a more drastic reduction of MHC I density on TECs.



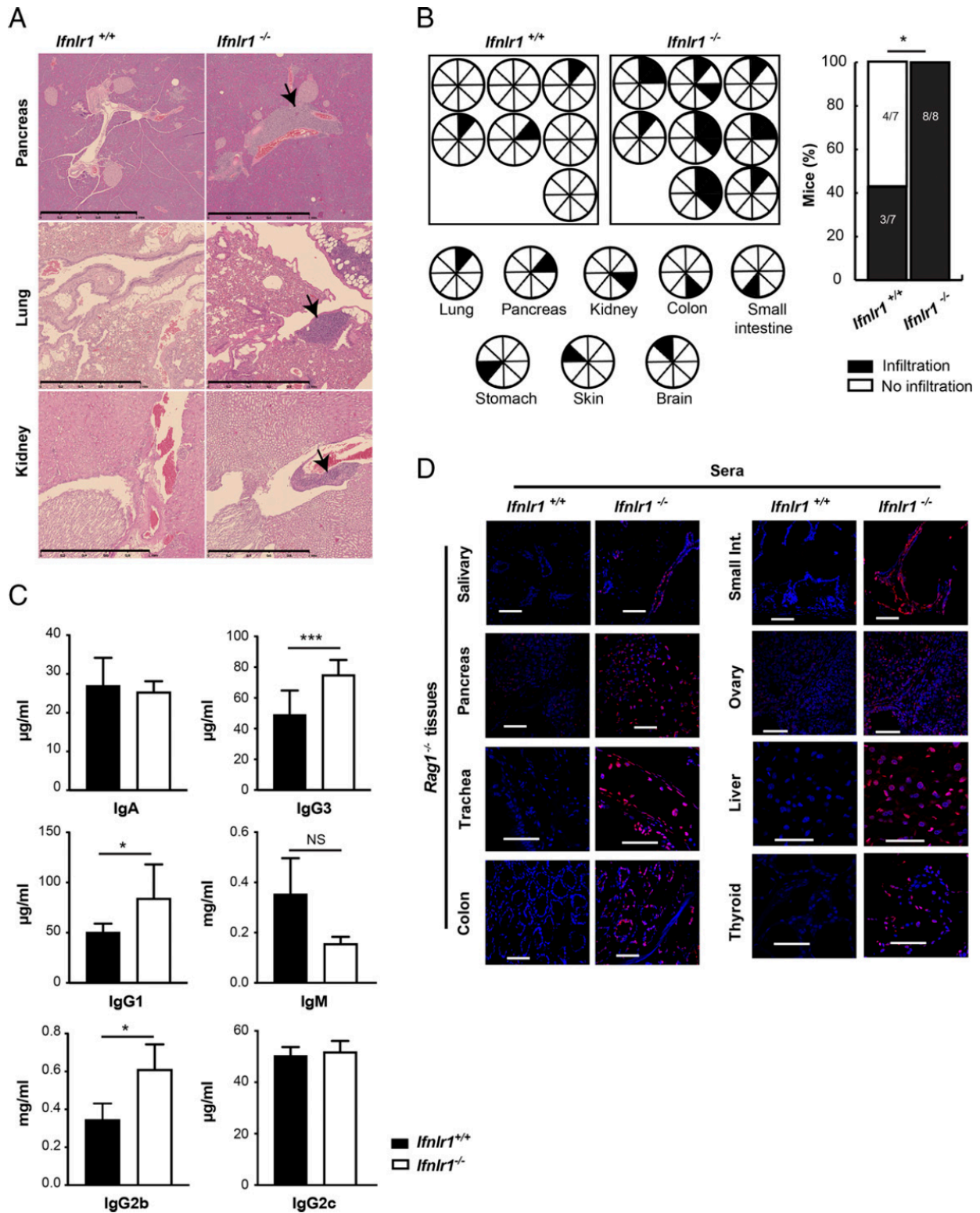
**Figure 2-6** Decreased MHC I expression on mTECs curtails negative selection in the *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> medulla. MHC I expression on (A) *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> thymic DCs, (B)  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> TECs and (C)  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> thymic



DCs. Results, obtained from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> (n = 3) and *β2m*<sup>+/-</sup> (n = 4) mice, were expressed as corrected MFI as explained in Fig. 1 legend. (A-C) Analyses were performed on a ZE5 flow cytometer. (D) Flow cytometry analyses of death by neglect in non-signaled (CD5<sup>-</sup>TCRβ<sup>-</sup>) thymocytes, and of negative selection in CD5<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> thymocytes in the cortex (CCR7<sup>-</sup>) or the medulla (CCR7<sup>+</sup>). Analyses were performed on double-positive (DP) thymocytes and three subsets of single-positive (SP) CD8 thymocytes: 8SM, 8M1 and 8M2. Non-signaled and signaled thymocytes are identified by the expression of CD5 and TCRβ, excluding CD25<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, and TCRγδ<sup>+</sup> cells (dump gate). Clonal deletion and death by neglect are identified by the expression of cleaved caspase 3 and approximate anatomic location identified according to CCR7 expression. Numbers adjacent to outlined areas indicate the percentage of cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in each subset. (E) Frequency of cleaved caspase 3<sup>+</sup> elements in three categories of thymocytes: non-signaled (CD5<sup>-</sup>TCRβ<sup>-</sup>), signaled in the cortex (CD5<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>) and signaled in the medulla (CD8<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>). Results are expressed as the percentage of cleaved caspase 3<sup>+</sup> elements and were obtained from six *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>, seven *Ifnlr1*<sup>+/+</sup>, three *β2m*<sup>+/-</sup> and three B6 mice. Short lines represent mean values in each subset. As detailed in Supplemental Fig. 4B, 8SM, 8M1 and 8M2 refer to semi-mature (CD69<sup>+</sup>MHC I<sup>-</sup>), mature 1 (CD69<sup>+</sup>MHC I<sup>+</sup>) and mature 2 (CD69<sup>-</sup>MHC I<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> single-positive thymocytes, respectively<sup>302</sup>. (F) Frequency of cleaved caspase 3<sup>+</sup> elements in post-selection (CD69<sup>+</sup>) cortical CCR7<sup>-</sup> DP thymocytes. Results are expressed as mean ± SD (n = 3-4). (G) Fold change of CD5 expression in pre-selection (CD69<sup>-</sup>) and post-selection (CD69<sup>+</sup>) cortical DP thymocytes from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> or *β2m*<sup>+/-</sup> mice relative to age-matched WT controls. ΔMFI was calculated as described in Fig. 1 legend. Mean ± SD. \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.01, \*\*\**p* ≤ 0.001 using unpaired Student's t test.

### 2.6.7 *Ifnlr1* deficiency leads to autoimmune manifestations

Since clonal deletion of self-reactive T cells is important in the establishment of central tolerance, we asked whether *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice might present autoimmune manifestations. We first searched for the presence of inflammatory cell infiltrates in various organs. No clear pattern emerged in 4-month-old mice (data not shown). However, in 9-month-old *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice, histological analyses revealed peribronchial and perivascular infiltrates in lung, periductal and peri-islet infiltrates in pancreas, and infiltration of kidney's calyces (Fig. 7A). The frequency of inflammatory infiltrates was superior to what we observed in WT age-matched littermates (Fig. 7B). However, we observed no obvious inflammatory cell infiltration in the skin, brain, heart, ovaries, uterus, small and large intestine and stomach. *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice displayed two other signs of autoimmunity: hypergammaglobulinemia affecting IgG1, IgG2b and IgG3 isotypes (Fig. 7C) and an increased frequency of serum autoantibodies against a wide array of tissues and organs (Fig. 7D). These observations are consistent with the notion that autoreactive CD8 T cells can directly affect the onset of autoimmune disease<sup>303-305</sup> and provide B-cell help, thereby enhancing autoantibody production<sup>306, 307</sup>.



**Figure 2-7** *Ifnlr1* deficiency leads to autoimmune manifestations. (A) Inflammatory cell infiltration of extrathymic tissues in 9 mo-old *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice. Infiltration was detected in lung, pancreas and kidney (arrowheads), but not in the gut, stomach, skin and brain (H&E staining). Scale bar: 1mm.

**(B)** Schematic representation of inflammatory cell infiltration in peripheral tissues of *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> (n = 8) and *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> (n = 7) mice. Each circle represents a single mouse. Black triangles indicate the detection of inflammatory cell infiltration in the organ (left panel). Frequency of mice with inflammatory infiltration are shown in the right panel histogram. \* $p \leq 0.05$  using Fisher exact test.

**(C)** Sera from nine mo-old *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> or *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> mice were assayed by ELISA for quantification of Ig isotypes. \* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  using unpaired Student t test. NS, non-significant.

**(D)** Representative confocal image for detection of autoantibody reactivity in the serum of *Ifnlr*<sup>-/-</sup> mice. Sections of tissues from *Rag1*<sup>-/-</sup> mice were stained with sera from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> or *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> mice, and then with Alexa-Fluor-555-conjugated goat anti-mouse IgG polyclonal antibodies. Serum was collected from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> (n = 5) and *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> (n = 4) mice at the age of 9 months. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .

## 2.7 Discussion

While pure cell suspensions of freshly harvested primary hematolymphoid cells can be obtained easily, that is not the case for ECs. This makes studying MHC I regulation in ECs more complicated. Cell lines are not optimal because they commonly present various defects in MHC I expression<sup>255, 256</sup>. Also, in primary tissue samples, MHC I transcripts and proteins from resident leukocytes represent a major confounding variable<sup>308</sup>. Hence, there is no substitute for isolation of primary ECs. Because of this, regulation of MHC I expression in ECs has not received the attention it deserves considering the pervasive interactions between ECs and CD8 T cells. We found that the surface expression of MHC I varies substantially between EC types and that the superior expression of MHC I on TECs was largely driven by the remarkable ability of mTECs to constitutively produce IFN- $\lambda$ . Type I and type III IFN share many commonalities and are rapidly induced following detection of pathogen-associated molecular patterns. However, relative to type I IFN, IFN- $\lambda$  triggers immune responses that are of lower magnitude, less inflammatory and are more concentrated at anatomic barrier sites<sup>294, 309</sup>. Hence our work expands the role of IFN- $\lambda$  by showing that it is the sole type of IFN that is necessary for maintaining normal MHC I expression in TECs. The effect of both Aire and IFN- $\lambda$  on MHC I expression in TECs is mostly, if not exclusively, cell-autonomous: i) mTECs produce more IFN- $\lambda$  and express more MHC I than cTECs, and ii) thymic DCs and endothelial cells do not produce significant amounts of IFN- $\lambda$  and do not express more MHC I than extrathymic DCs and endothelial cells (Fig. 1C, and Fig. 5C). Of note, Aire contributes to IFN- $\lambda$  production by mTECs (Fig. 5D). This is consistent with the concept that Aire's function is not limited to the ectopic promiscuous expression of tissue-restricted antigens<sup>298, 310</sup>. Indeed, substantial evidence suggests that Aire regulates mTEC differentiation as well as cytokine and chemokine production<sup>311-315</sup>. Our data suggest that upregulation of IFN- $\lambda$  production in mTECs contributes to the establishment of central tolerance by Aire.

Mass spectrometry analyses show that high MHC I abundance correlates with a high diversity of MPCs<sup>316</sup>. Hence, that TECs express 10- to 100-fold more MHC I than other ECs (Fig. 1) means that TECs, and in particular mTECs, present a more diversified peptide repertoire than extrathymic ECs. Intuitively, the first corollary that comes to mind is that for mTECs, constitutive presentation of a uniquely diversified MPC repertoire is important for central tolerance. Indeed, although extrathymic ECs constitutively express much less MHC I than TECs, they can upregulate MHC I

expression (upon IFN production) during the course of inflammation. Thus, high MHC I expression by mTECs may ensure that central tolerance encompasses self peptides presented in inflammatory tissues. In line with this, we found that a 30% reduction in TEC MHC I proteins was sufficient to curtail negative selection of CD8 thymocytes and to cause autoimmune manifestations in old mice (Fig. 6D, 6E and Fig. 7). We speculate that a more drastic reduction of MHC I expression in TECs would have more dramatic consequences and might cause autoimmunity in young animals.

RNA-sequencing analyses have shown that the abundance of MHC I transcripts in various tissues positively correlated with the proportion of hematolymphoid cells <sup>251</sup>. Also, scattered immunohistochemistry analyses of primary tissue sections have shown that a sizeable fraction of epithelial cells are MHC I<sup>lo/neg</sup> <sup>252, 253</sup>. However, we did not expect that cell surface MHC I expression would be so low in extrathymic ECs, and in particular in lung ECs. The main implication of this observation is that, in non-inflamed tissues, extrathymic ECs present a very limited diversity of MPCs to CD8 T cells. This might perhaps be advantageous in terms of autoimmunity, but this should be disadvantageous for cancer immunosurveillance. In view of this, the last point that we want to make is a plaidoyer in favor of the Human Immunopeptidome Project whose primary objective is to provide a systems-level definition of the MPC repertoire presented by all cell types under normal and pathological conditions <sup>317-319</sup>. In view of the huge MHC polymorphism in humans and of the high level of interindividual differences in immune parameters <sup>320, 321</sup>, immunopeptidomic studies will need to be performed in sizeable groups of subjects. While ambitious, this endeavor could be transformative for our understanding of autoimmunity and cancer immunology.

## 2.8 Acknowledgements

We would like to thank the staff of the following IRIC core facilities for assistance and helpful discussions: flow cytometry, genomic, bioinformatics, histology and animal care research facilities. We thank the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project and its funders for providing the mutant mouse line *Ifnlr1<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup>*, and its INFRAFRONTIER/EMMA ([www.infrafrontier.eu](http://www.infrafrontier.eu)) partner [Czech Centre for Phenogenomics] from which the mouse line was received. Funding information may be found at [www.sanger.ac.uk/mouseportal](http://www.sanger.ac.uk/mouseportal) and associated primary phenotypic information at [www.mousephenotype.org](http://www.mousephenotype.org).

## 2.9 Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## 2.10 Footnotes

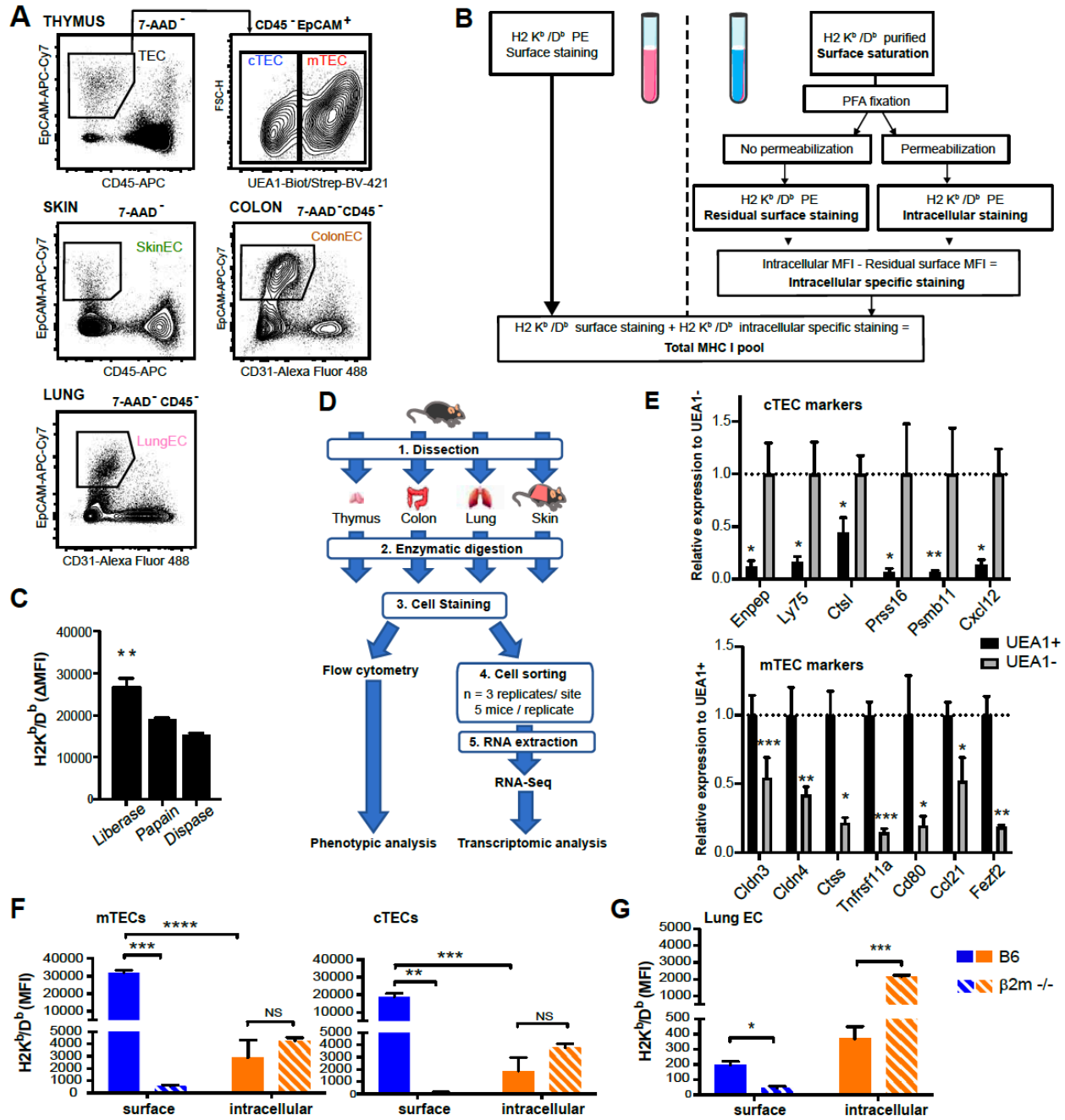
This work was supported by grant FDN-148400 from the Canadian Institutes of Health Research (to C.P.). The CD1d–a-GalCer tetramers were obtained through the National Institutes of Health Tetramer Core Facility.

RNA-Seq data reported in this article have been submitted to the Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession numbers GSE144722 and GSE65617.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Claude Perreault or Dr. Sylvie Brochu, University of Montreal, Post Office Box 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C3J7, Canada. E-mail address: [claud.perreault@umontreal.ca](mailto:claud.perreault@umontreal.ca) and [sylvie.brochu.1@umontreal.ca](mailto:sylvie.brochu.1@umontreal.ca)

Abbreviations used in this article: B6, C57BL/6J; cTEC, cortical TEC; DC, dendritic cell; EC, epithelial cell; FPKM, fragments per kilobase of transcript per million mapped reads; Irf, IFN regulatory factor; ISG, IFN-stimulated gene; MFI, median fluorescence intensity; MHC I, MHC class I; MPC, MHC I–peptide complex; mTEC, medullary TEC; NLR, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing; NLRC5, NLR family CARD domain-containing 5; RPKM, reads per kilobase of transcript per million mapped reads; TEC, thymic EC; UEA1, *Ulex europaeus* lectin 1; WT, wild-type.

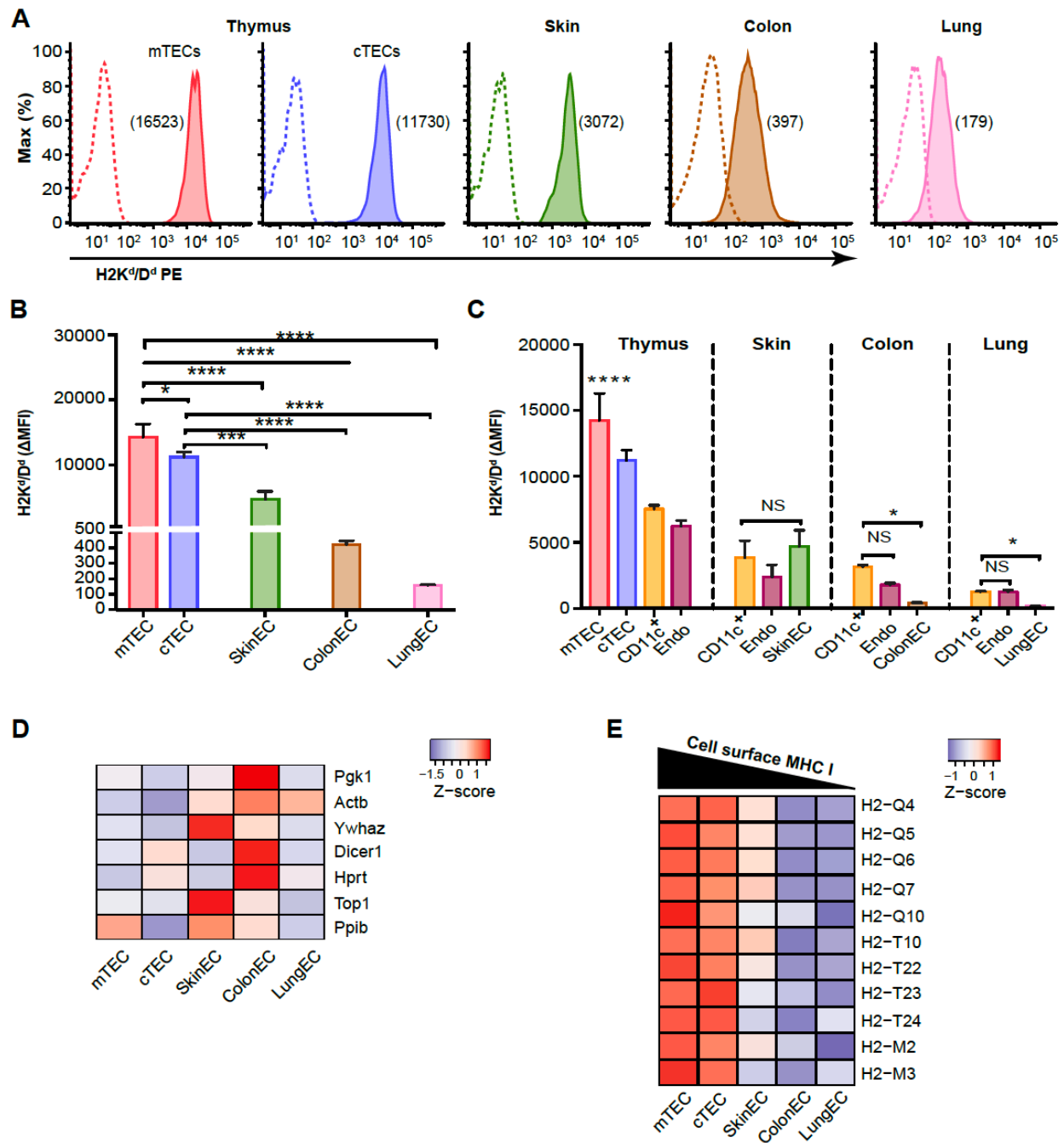
## 2.11 Supplemental Data



**Supplemental Figure 2 S1** Experimental design used to isolate ECs and evaluate the intracellular load of MHC I molecules in TECs and Lung EC. (A) Gating strategy used to analyze and sort various EC types. (B) Strategy to assess global MHC I pool, surface and intracellular MHC I expression on TECs and lung ECs. (C) Impact of enzymatic cocktails (liberase, papain or dispase)

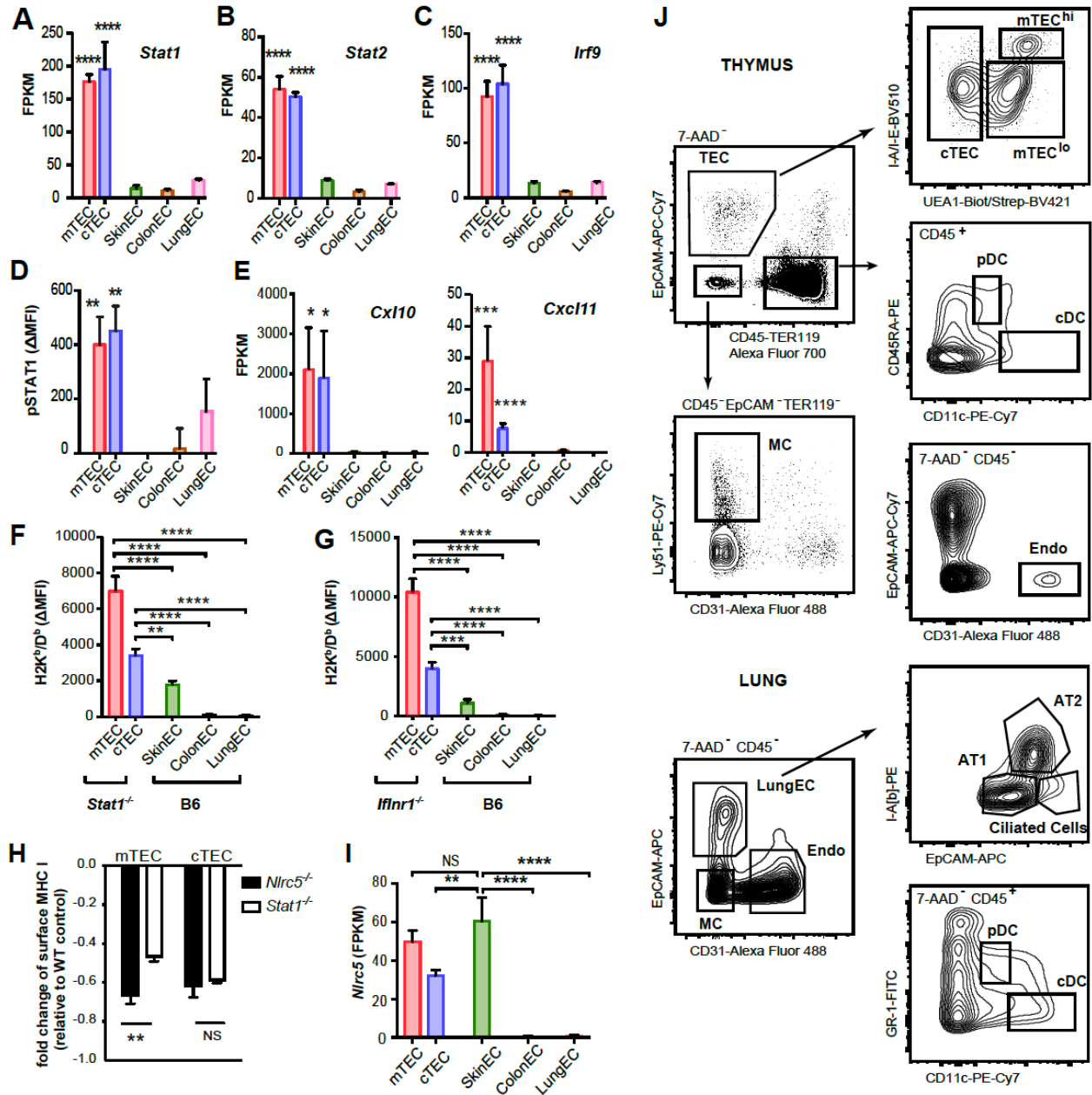


on TEC MHC I expression. Results are expressed as the value of the MFI obtained with specific H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> antibody staining minus MFI obtained with an isotypic antibody ( $\Delta$ MFI) (n=6 mice per group, tested in two separate experiments). \*\*  $p \leq 0.001$  using one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. (D) Workflow for isolation and analysis of ECs from thymus, skin, colon and lung. (E) Relative mRNA expression in FACS-sorted UEA1<sup>-</sup> and UEA1<sup>+</sup> TECs of genes differentially expressed in cTECs and mTECs. Data were extracted from RNA sequencing analysis as FPKM. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.005$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  using unpaired Student t test. (F-G) Surface or intracellular H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> staining of (F) TECs or (G) lung ECs from 8-week-old B6 or  $\beta 2m^{-/-}$ .  $\beta 2m^{-/-}$  mice were used as negative control for H2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup> staining. Specific intracellular staining is calculated as shown in panel B. Results, obtained from B6 (n=4) and  $\beta 2m^{-/-}$  (n=2) mice, were obtained from two independent experiments. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , unpaired Student t test. Graphs show the mean  $\pm$  SD.



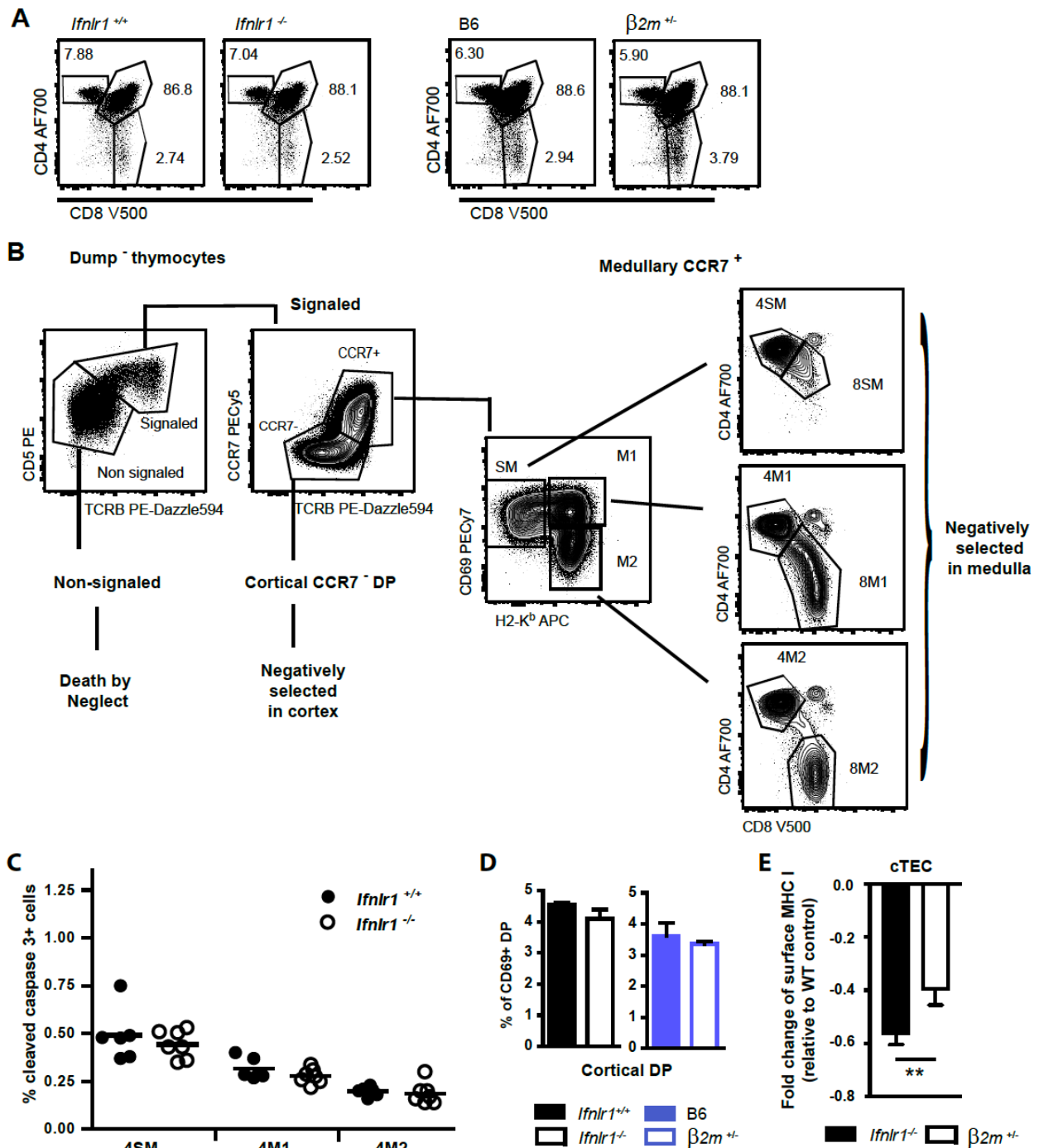
**Supplemental Figure 2 S2** H2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> staining intensity on the surface of cells from different tissues. (A) Representative flow cytometry histograms of H2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> staining on ECs from the thymus, skin, lung and colon of eight-week-old BALB/cJ mice. The MFI of stained cells is shown in parentheses. Empty histograms represent isotype control staining. (B-C) Surface expression of MHC I obtained from three mice per group, tested in one experiment. For comparison of different cell populations, the MFI of the isotype controls was subtracted from the MFI of H2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> staining

( $\Delta$ MFI). (B) Comparison of different EC types. (C) Comparison of ECs with DCs (CD11c<sup>+</sup>) and endothelial cells (Endo; CD31<sup>+</sup>) from the same site. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3 mice per group). \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ , NS, non-significant using one-way ANOVA followed by Tukey's test. (D, E) Heatmaps of RNA-sequencing data for (D) seven reference genes and (E) non-classical MHC I (MHC Ib). Relative gene expressions are depicted as Z-scores, calculated from FPKM.



**Supplemental Figure 2 S3** Overexpression of MHC I in TECs is driven by IFN signaling. (A-C, E) RNA-sequencing analysis of *Stat1*, *Stat2*, *Irf9*, *Cxcl10*, and *Cxcl11* in various EC types. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.0005$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ . (D) Abundance of phosphorylated STAT1 (pSTAT1) in different EC types. Results are expressed as  $\Delta$ MFI as described in Supplemental Fig 1C legend, (n=6 mice per group, tested in two independent experiments). \*\*  $p \leq 0.001$ . (F, G) MHC I expression on mTECs and cTECs from (F) *Stat1*<sup>-/-</sup> and (G) *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> mice compared to extrathymic ECs isolated from age-matched WT B6 mice. Data were extracted from Fig. 4C and 4F. \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . (H) Fold change of MHC I expression in mTECs and cTECs

from Stat1<sup>-/-</sup> or Nlr5<sup>-/-</sup> mice relative to age-matched WT controls. \*\*p ≤ 0.005, unpaired Student t test. (I) RNA sequencing analysis of Nlr5 in various EC types. \*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p ≤ 0.0001, (A-G, I) one-way ANOVA followed by Tukey's test. Graphs indicate the mean ± SD; NS, non-significant. (J) Gating strategy used to sort cell populations in order to identify IFN-λ producer cells. Thymic cell subsets included mTEC<sup>hi</sup>, mTEC<sup>lo</sup>, cTECs, mesenchymal cells (MCs), endothelial cells (Endo), plasmacytoid and conventional DCs (pDCs and cDCs). Lung cell subsets included alveolar type I and type II ECs (AT1 and AT2), ciliated ECs, MCs, macrophages, pDCs, cDCs and Endo Cells. Each replicate contained cells pooled from 6 mice.



**Supplemental Figure 2 S4** Impact of decreased MHC I expression on thymocyte selection.

(A) Thymocyte subsets in *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> and  $\beta 2m$ <sup>+/-</sup> mice as defined by CD4 and CD8 staining. (B) Gating strategy for cleaved caspase 3 assay. Signaled and non-signaled thymocytes are identified by the expression of CD5 and TCR $\beta$ , excluding CD25<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, and TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (Dump) cells. Cortical double-positive (DP) and medullary simple-positive thymocytes are CD5<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>

CCR7<sup>-</sup> and CD5<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>, respectively. CD69 and H2-Kb (MHC I) staining was used to define three distinct stages of maturation in the medulla: CD69<sup>+</sup>MHC I<sup>-</sup> semi-mature (SM), CD69<sup>+</sup>MHC I<sup>+</sup> mature 1 (M1), and CD69<sup>-</sup>MHC I<sup>+</sup> mature 2 (M2). (C) Frequency of cleaved caspase 3<sup>+</sup> of signaled medullary (CD5<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> single-positive thymocytes in *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> (n=7) and *Ifnlr1*<sup>+/+</sup> (n=6). Results are expressed as percentage of cleaved caspase 3<sup>+</sup> elements (tested in 3 independent experiments). (D) Percentage of CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> post-selected cortical DP thymocytes, (E) Fold change of MHC I expression in cTECs from *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> or *β2m*<sup>+/-</sup> mice relative to age-matched WT controls. \*\**p* ≤ 0.01, unpaired Student t test. Graphs indicate the mean ± SD.

## Annexe 1

**Table 1-S1:** List of interferon stimulated genes (ISG)

## **Chapitre 3 Thymic APCs express a sizeable but incomplete fraction of the genes expressed in extrathymic epithelial cells**

### **3.1 Présentation de l'article**

Le mécanisme de la tolérance centrale est majoritairement contrôlé par les APCs thymiques. Les deux principaux types d'APCs thymiques sont les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) et les cellules dendritiques thymiques (tDCs). Les mTECs induisent la tolérance centrale principalement par l'expression ectopique des antigènes restreints aux tissus (TRA) alors que la contribution des tDCs se fait par la présentation croisée des antigènes<sup>322</sup>.

Dans cette étude, nous avons évalué dans quelle mesure les APCs thymiques contribuent à la tolérance centrale à l'égard des antigènes exprimés par les ECs extrathymiques isolées de la peau, du colon et des poumons. De ce fait, nous avons comparé le transcriptome des APCs thymiques à celui des ECs extrathymiques. Nous avons rapporté que les APCs thymiques expriment environ 93% des gènes exprimés par les ECs extrathymiques et nous avons présenté des preuves que les tDCs et les mTECs peuvent avoir une contribution non redondante dans l'établissement de la tolérance centrale. De plus, nous avons trouvé, dans le transcriptome des ECs extrathymiques, une fraction des gènes (environ 7%) qui n'est pas exprimée par les APCs thymiques. Néanmoins, ces gènes sont capables de générer des peptides associés au CMH I (MAPs) quoique dans une moindre mesure que les gènes partagés avec les APCs thymiques.

Dans l'ensemble, cette étude fournit la première tentative de caractérisation du « *self-transcriptome* », exprimé par les ECs extrathymique et les APCs thymiques, capable de générer des MAPs.



## **3.2 Contribution des auteurs**

MB: Planification et conception de l'étude. Analyse des données RNA-seq et de l'immunopeptidome murin. Écriture de la première version de l'article et préparation des figures.

AA : Participation à la conception de l'étude et l'analyse des résultats. Contribution à l'écriture de la première version de l'article.

MVRC : Participation à la discussion et l'analyse des résultats. Révision du manuscrit soumis

SB : Participation à la discussion et l'analyse des résultats. Révision du manuscrit soumis

CP : Planification de l'étude et analyse des résultats. Supervision de l'étude et écriture du manuscrit.

# **Thymic APCs express a sizeable but incomplete fraction of the genes expressed in extrathymic epithelial cells**

**Running title:** Differential contribution of thymic APCs to central tolerance.

Mohamed Benhammedi,<sup>\*,†</sup> Anca Apavaloaei,<sup>\*,†</sup> Maria Virginia Ruiz Cuevas,<sup>\*,†</sup> Sylvie Brochu<sup>\*,†,‡</sup>, and Claude Perreault,<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>\*</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>†</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>‡</sup> **Corresponding authors:**

Claude Perreault: T + 514 343.6126, F + 514 343.5839, [claudio.perreault@umontreal.ca](mailto:claudio.perreault@umontreal.ca)

Sylvie Brochu: T +514-343.6111 ext 0594, F + 514 343.5839, [sylvie.brochu.1@umontreal.ca](mailto:sylvie.brochu.1@umontreal.ca)

Submitted to the journal of immunology, November 2021.

### 3.3 Abstract

Central immune tolerance is established mainly by two cell types, hereafter referred to as thymic APCs: medullary thymic epithelial cells (mTECs) and conventional dendritic cells (cDCs). Studies with model Ags have established that the fate of autoreactive thymocytes largely depends on Ag abundance and distribution on thymic APCs. This study aimed to determine what proportion of genes expressed in extrathymic epithelial cells (ECs) was also expressed in the main subsets of thymic APCs. We report that thymic APCs express about 93.5% of genes expressed in extrathymic ECs, and present evidence that mTECs and thymic cDCs play non-redundant roles in the establishment of central tolerance. Indeed, several genes expressed in extrathymic ECs from the skin, colon, and lung are transcribed exclusively in one subset of thymic APCs (mTECs or cDCs). While 6-7 % of genes expressed in extrathymic ECs are silent in thymic APCs, their ability to generate MHC class I-associated peptides (MAPs) is mitigated by several factors, including their expression level and protein-coding potential. Nonetheless, we report that at least 43 MAPs coded by extrathymic EC-specific genes are presented by H2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup> in healthy mice. Identifying genes with different expression profiles among peripheral ECs and thymic APC subsets should be instrumental in designing novel experimental models to explore self-tolerance in health and disease.

### 3.4 Introduction

The essential and non-redundant role of medullary thymic epithelial cells (mTECs) is to induce central immune tolerance<sup>245, 299, 323</sup>. Failure to establish or maintain self-tolerance leads to autoimmunity, affecting about 4% of the population<sup>324</sup>. The unique role of mTECs in central immune tolerance is mainly due to their ability to promiscuously express a wide array of proteins otherwise restricted to differentiated organs in the periphery<sup>278, 297, 325, 326</sup>. Promiscuous gene expression (pGE) in mTECs is regulated by three genes: *Aire*, *Chd4*, and *Fezf2*<sup>288, 327-329</sup>. However, mTECs do not work alone. They collaborate with dendritic cells (DCs) to enforce the two main mechanisms of central tolerance: clonal deletion of thymocytes and subversion of thymocytes to self-tolerant T-cell lineages. Deletion of a fraction of thymocytes is initiated in the thymic cortex<sup>300, 330, 331</sup>. Deletion in the cortex is triggered primarily by DCs and presumably involves thymocytes reactive to non-pGE-dependent epitopes. When thymocytes migrate to the thymic medulla, they are exposed to a vast repertoire of pGE dependent epitopes that can be directly presented by mTECs or cross-presented by intrathymic conventional DCs (cDCs) of type 1 (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>Sirp $\alpha$ <sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>) and type 2 (CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>Sirp $\alpha$ <sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>). In the medulla, self-reactive thymocytes either undergo clonal deletion or are subverted into CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells or CD8 $\alpha$  intraepithelial lymphocytes. Elegant studies with model Ags suggest that the fate of autoreactive thymocytes in the medulla largely depends on Ag abundance and distribution<sup>332, 333</sup>. Other cell types contribute, albeit to a lesser extent, to induction of central tolerance: plasmacytoid DCs, as well as medullary B cells and fibroblasts<sup>334-337</sup>. Nonetheless, we will focus in the present study on mTECs and thymic cDCs, which are generally considered to be the main orchestrators of central tolerance<sup>245, 325, 332, 338</sup>. Hereafter, in the present manuscript, we will collectively refer to mTECs and thymic cDCs as thymic APCs. The APC label is well deserved since mTECs, and thymic cDCs express exceptionally high amounts of MHC I, MHC II, and costimulatory molecules<sup>339-341</sup>.

Despite its importance, central tolerance is incomplete since autoreactive T cells are present in significant numbers in otherwise healthy humans and mice<sup>342, 343</sup> and must be controlled by various peripheral tolerance mechanisms<sup>344, 345</sup>. It remains unclear to what extent peripheral tolerance is required because some self-Ags are not presented by thymic APCs (creating “holes” in central tolerance) or because tolerance toward self-Ags needs to be reinforced under certain conditions (e.g., inflammation). In our quest to search for self-Ags expressed exclusively in extrathymic cells,

we focused on epithelial cells (ECs) because they show unmatched heterogeneity from one tissue/organ. For example, keratinocytes, enterocytes, and pneumocytes are very specialized and different from each other. We, therefore, performed in-depth RNA-sequencing of ECs from the skin, colon, and lung and analyzed the overlap between their transcriptome and that of thymic APCs. More specifically, we addressed the following questions: i) are all genes expressed in extrathymic ECs expressed by thymic APCs, and ii) what proportion of the extrathymic EC transcriptome is expressed specifically in mTECs and thymic cDCs. We found that an unexpectedly high proportion of genes expressed in extrathymic ECs were silent in thymic APCs (6-7%). However, only a small percentage of these genes generate MHC class I-associated peptides under steady-state conditions.

### 3.5 Materials and Methods

#### *Data download and normalization of RNA-seq*

The RNA-seq data for medullary thymic epithelial cells (mTECs) and extrathymic ECs (skin, lung, and colon ECs) were obtained from GEO (accession number GSE144722). The thymic cDC1 and cDC2 data were obtained from Karim Mahiddine et al. <sup>346</sup> (GEO accession number GSE 144421). RNA-seq data of mouse tissues, except the skin, were downloaded from ENCODE. The data for the skin were obtained from Jason M. Rizzo et al. <sup>347</sup> (GEO accession number GSE58429). Kallisto quantification was performed on these RNA-seq datasets, using GENCODE annotation M13.

Technical variation and differences across batches can cause significant heterogeneity across batches of data. The type of known technical biases is the library size (or sequencing depth) and the number of reads, which is proportional to the length and the abundance of mapped genes <sup>348</sup>. Therefore, we performed GeTMM (Gene length corrected TMM) normalization between the different RNA-seq datasets before any downstream analysis. This approach combines gene-length correction with the normalization procedure TMM as implemented in edgeR in RStudio <sup>349</sup>. We used CPM (Counts per million reads mapped) as an expression value to compare the gene expression. The CPMs were obtained directly after applying the GeTMM normalization. The Venn diagram shown in Fig. 1B was made using the following resource: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

#### *Differential expression and transcript classification*

The differential expression analysis was carried out using the R package limma. The fold changes were calculated as the mean expression for the two groups of interest and then log<sub>2</sub>-transformed. A cutoff of an adjusted p-value < 0.01 and log<sub>2</sub> fold change (logFC) > 1 or < -1 were used. The volcano plot was obtained using the EnhancedVolcano package in RStudio.

The transcript annotation and classification, shown in Fig. 3, were performed using GENCODE transcript biotypes (vM13). The Pie charts were generated using ggplot2 and ggrepel packages in RStudio.

### *Pathway enrichment analysis*

The gene set enrichment analysis was performed using the gprofiler2 R package<sup>350</sup>. The biological functional data source used to identify significantly enriched pathways and biological functions are Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Reactome (REAC), and WikiPathways (WP). The top 10 most significantly enriched pathways for each annotation data source in the functional enrichment analysis plots were shown by name. The size of the circles corresponds to the precision, which is the proportion of the genes in the input gene list that are annotated.

### *Identification of genes generating MHC class I-associated peptides (MAPs) presented by H2D<sup>b</sup>/H2K<sup>b</sup>*

To evaluate whether the genes unique to extrathymic ECs and those shared with thymic APCs are a potential source of MAPs, we used the murine MHC I immunopeptidome provided by Schuster et al.<sup>351</sup>. The authors generated a list of high confidence H2D<sup>b</sup>/H2K<sup>b</sup> MAPs for several tissues by applying several stringent filters. In our analysis, we downloaded H2D<sup>b</sup>/H2K<sup>b</sup>-MAPs and their source genes identified in skin, colon, and lung ECs. We then analyzed the expression profile of MAP source genes in extrathymic ECs and thymic APCs.

### *Statistical analyses*

In Fig. 4 and Fig. 5B, the statistical difference was determined with the Mann-Whitney test using GraphPad Prism 8.2.1. To determine whether the difference is significant between the proportion of transcripts biotype, we used Fisher's exact test using the following tool: <https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>. p-value < 0.05 was considered statistically significant (\* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## 3.6 Results

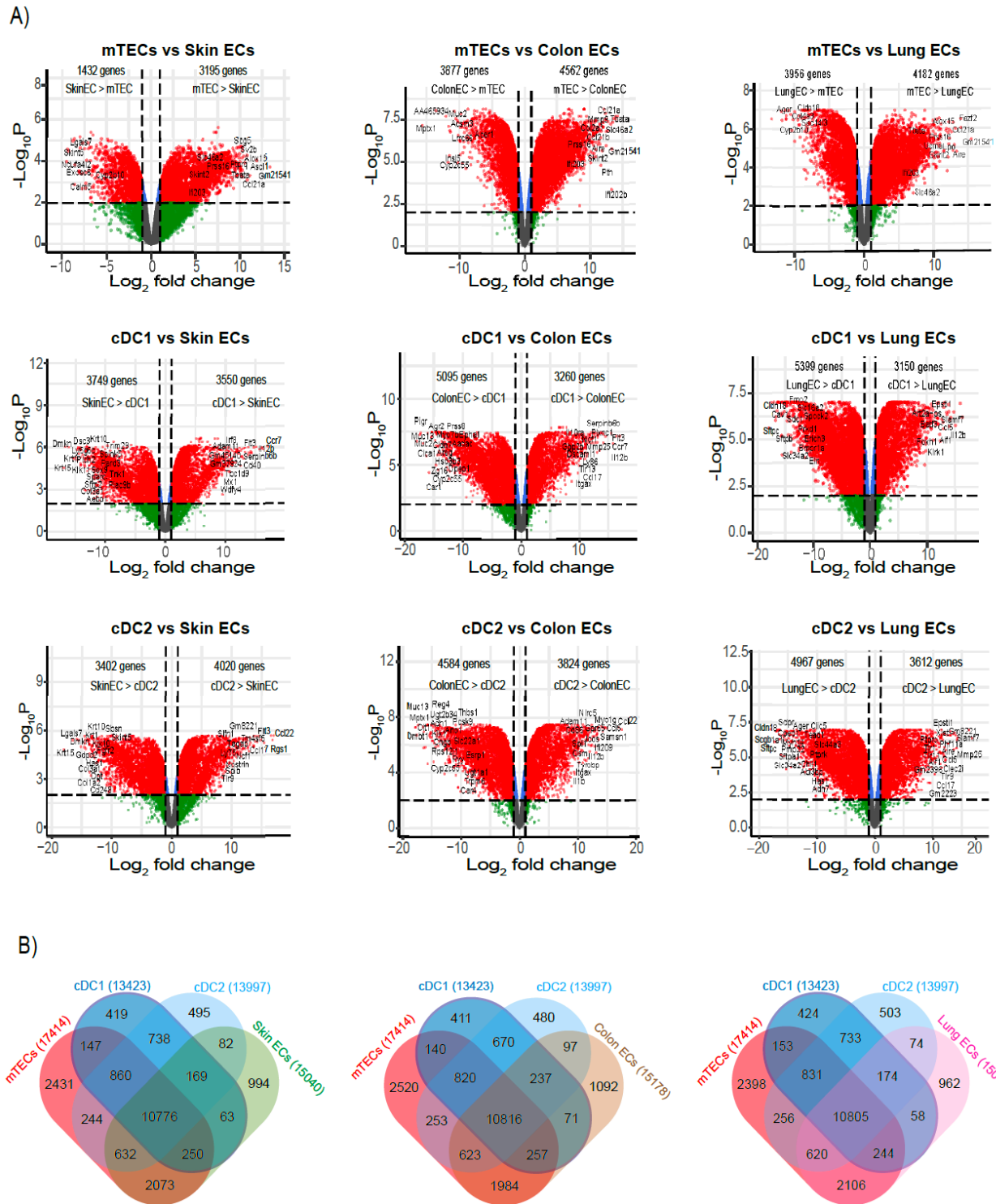
### 3.6.1 The overlap between genes expressed in extrathymic ECs and thymic APCs (mTECs and thymic cDCs)

We first compared the transcriptome of mTECs to that of thymic cDC1 and cDC2. We found over 8,500 differentially expressed genes (DEGs) between mTECs and each of the two subsets of thymic cDCs (Supplemental Fig. 1). More genes were overexpressed in mTECs (5,383 to 5,629) than in thymic cDCs (3,234 to 3,727). The top-most upregulated DEGs in mTECs are enriched in genes involved in diverse tissue-specific functions such as lung development (e.g., *Ace*, *Adamtsl2*) and osteogenesis (e.g., *Tnfrsf11b*, *Colla1*) (Supplemental Fig. 1). On the other hand, the top-most DEGs upregulated in thymic cDCs are implicated in DC function such as cellular response to interferon gamma (e.g., *Actr2*, *Actr3*) and DC development (e.g., *Ly75*). These preliminary analyses agree with the notion that mTECs display a particularly diversified transcriptome because of their unique ability to promiscuously express tissue-specific transcripts<sup>297, 325, 326</sup>.

Next, we compared the transcriptome of thymic APCs (mTECs and thymic cDCs) to that of extrathymic ECs from the skin, colon, and lung (Fig. 1A). The number of DEGs between individual subsets of thymic APCs and extrathymic ECs ranged from 4,627 (mTECs vs. skin ECs) to 8,549 (thymic cDC1 vs. lung ECs). The gene expression profile of mTECs was more similar to that of skin ECs than colon or lung ECs. This observation is coherent with commonalities in the differentiation program of thymic ECs and skin ECs<sup>352</sup>. As expected, the top-most DEGs upregulated in thymic APCs compared to extrathymic ECs are involved in chemokine expression and T cell recruitment (e.g., *Tbata*, *Ccl21a*, *Ccr7*). Several top-most upregulated DEGs in extrathymic ECs relative to mTECs are instrumental in tissue-specific functions (Fig. 1A). For example, i) in skin ECs, *Exosc6* is involved in epidermal renewal and *Lgals7* in keratinocyte development, ii) in colon ECs, *Insl5* regulates gut contractility, and iii) in lung ECs, *Cldn18* is required for alveolar barrier function. In addition, several top-most upregulated DEGs in the extrathymic ECs are implicated in lipid metabolism (e.g., *Cyp2b10*, *Acs3*, *Cyp2c55*) (Fig. 3.1-A). These findings are consistent with the functional importance of lipid metabolism in these extrathymic tissues<sup>353, 354</sup>.



In subsequent analyses, we evaluated the overlap between genes with detectable expression (count-per-million, CPM > 0.5; see Materials and Methods) in thymic APCs and extrathymic ECs. mTECs expressed the highest number of genes (17,414 genes) and, critically, up to 91% of genes expressed in extrathymic ECs were expressed in mTECs: 13731 of 15040 skin EC genes, 13680 of 15178 of colon EC genes, and 13775 of 15044 of lung EC genes (Fig. 1B). Thymic cDCs expressed a lower but sizeable (up to 75%) proportion of EC genes: 11340 of 15040 skin EC genes, 11478 of 15178 of colon EC genes, and 11355 of 15044 of lung EC genes (Fig. 1B). Some EC genes were expressed by only one of the three types of thymic APCs. The number of genes shared exclusively with mTECs ranged from 1984 (colon ECs) to 2106 (lung ECs) for individual EC types. The fraction of EC genes expressed only in one cDC subset was clearly inferior and ranged from 232 (lung ECs) to 311 (colon ECs) for cDC1 and 248 (lung ECs) to 334 (colon ECs) for cDC2 (Fig. 1B). These analyses further support the unrivaled breadth of the mTEC transcriptome. Of particular relevance to the span of central tolerance, 6-7% of genes expressed in extrathymic ECs were not expressed in any of our three thymic APC subsets. That was the case for 994/15,040 skin EC genes, 1092/15,178 colon EC genes, and 962/15,044 lung EC genes (Fig. 1B). A complete list of genes uniquely expressed in extrathymic ECs is presented in Supplemental Table 1.



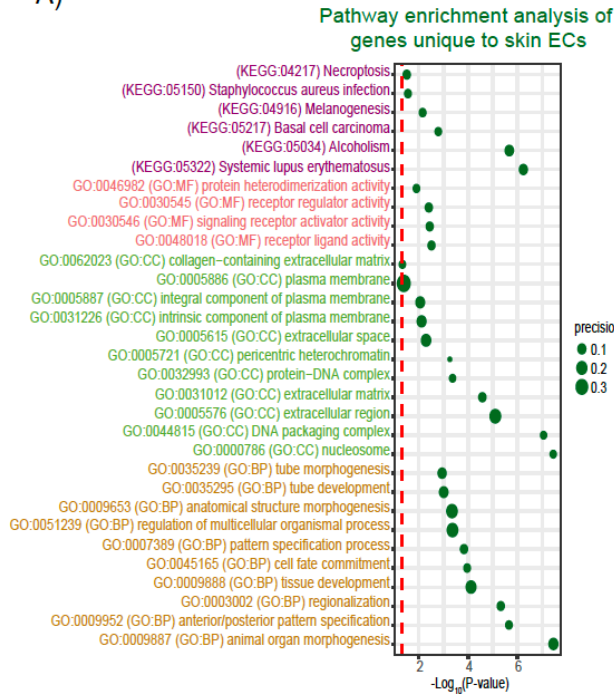
**Figure 3-1** Differential gene expression in thymic APCs (mTECs and thymic cDCs) vs. extrathymic ECs. **(A)** Volcano plots showing DEGs between thymic APCs and extrathymic ECs. The following criteria were used to define DEGs (red dots): an adjusted  $p$ -value  $< 0.01$  and a  $\log_2$  fold change  $> 1$  or  $< -1$ . **(B)** Venn diagram showing the overlap between genes expressed

(count-per-million, CPM > 0.5) in thymic APCs vs. extrathymic ECs. Numbers in parentheses indicate the total number of genes expressed in each cell type.

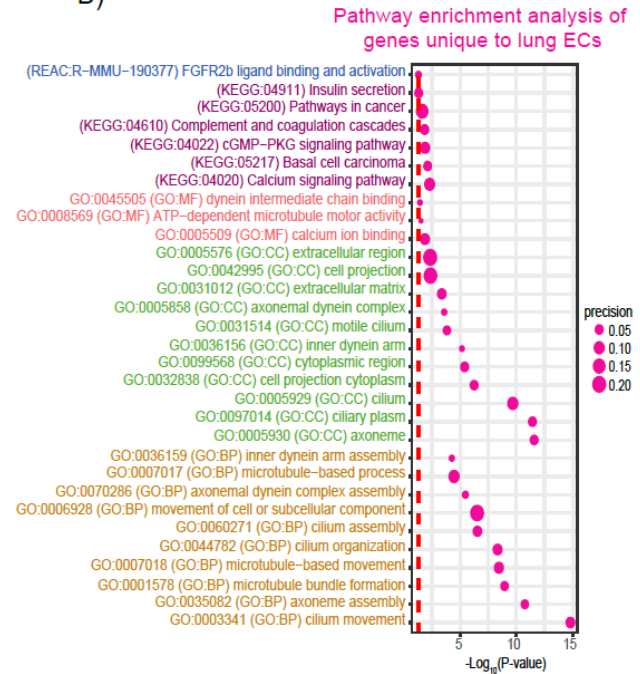
### **3.6.2 Genes expressed uniquely in extrathymic ECs are implicated in numerous biological processes**

Enrichment pathway analyses revealed that some genes expressed only in extrathymic ECs were related to specific functions of the corresponding tissue or organ. Hence, the genes uniquely expressed in skin ECs were enriched in pathways related to necroptosis (keratinization), melanogenesis, and *S. aureus* infection (Fig. 2A). Genes unique to lung ECs were directly associated with mucociliary functions (e.g., cilium movement and microtubule-based movement) (Fig. 2B), while genes uniquely expressed in colon ECs were linked to metabolic function (e.g., lipid metabolic process and xenobiotic metabolic process) (Fig. 2C). However, many genes transcribed only in extrathymic ECs are involved in generic (non tissue-specific) processes, some of which are related to cancer and autoimmune disease (e.g., basal cell carcinoma, pathways in cancer, systemic lupus erythematosus) (Fig. 2A-C).

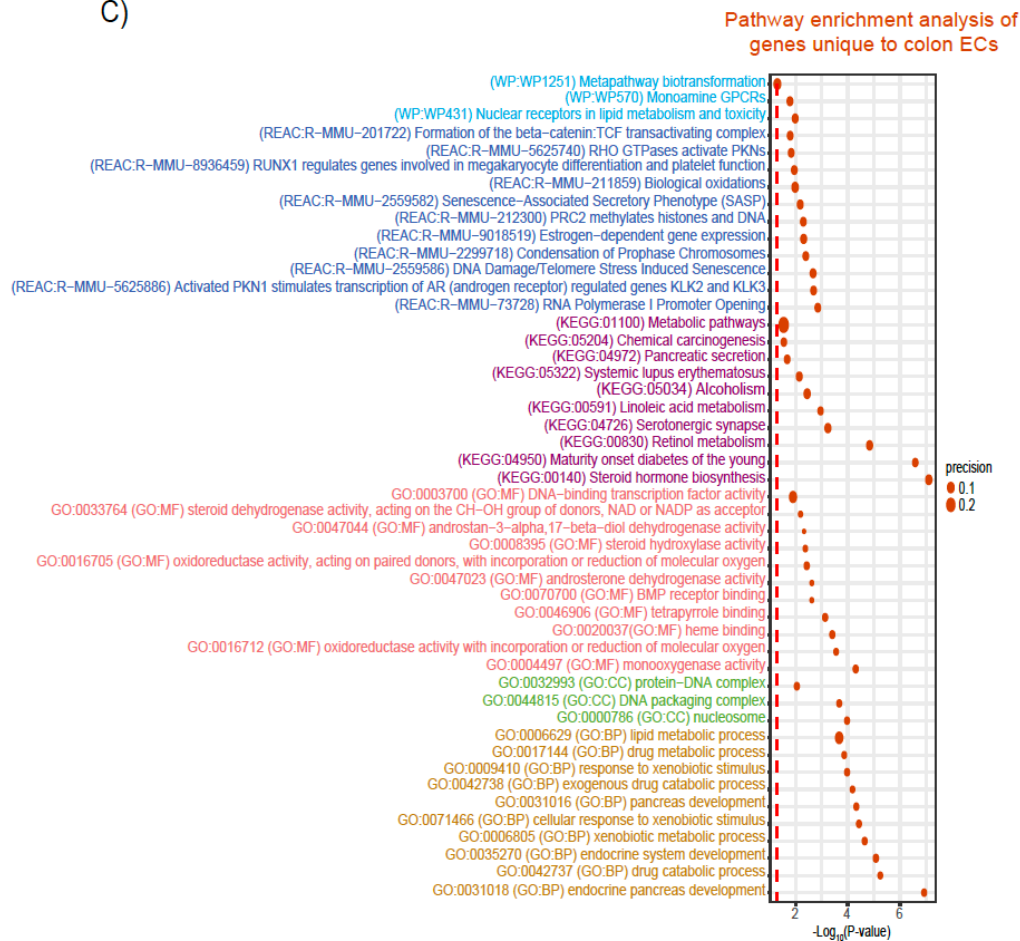
A)



B)



C)



**Figure 3-2** Pathway enrichment analysis of genes expressed only in extrathymic ECs. (A-C) Dot plots displaying the top-most significant enriched functions in genes expressed only in skin ECs (A), lung ECs (B), and colon ECs (C). The size of the dots represents the precision, which is the proportion of annotated genes in the input list. The biological pathways from the KEEG, Reactome (REAC), and WikiPathways (WP) are represented by purple, blue, and cyan dots, respectively. The three GO domains, molecular function (GO: MF), cellular component (GO: CC), and biological process (GO: BP), are each represented by red, green, and gold plots, respectively. The red dashed lines correspond to the  $\log_{10}$  transformation of the  $p$ -value of 0.05. The gene set enrichment analysis was performed using the gprofiler2 R package.

### **3.4.3 Most transcripts expressed uniquely in extrathymic ECs are protein-coding**

Among RNAs expressed in various cell types, only those that are protein-coding and generate MAPs can be seen by T cells<sup>242</sup>. We, therefore, analyzed the annotated biotypes of transcripts expressed exclusively in extrathymic ECs versus those shared with thymic APCs (see Materials and Methods). The proportion of non-coding transcripts (e.g., retained intron, lincRNA, processed pseudogene) was higher in the skin- and colon-specific transcripts than in transcripts shared with thymic APCs ( $p < 0.05$ , Fisher's exact test) (Fig. 3A, 3B). However, this discrepancy was not found in lung-specific transcripts ( $p = 0.24$ ) (Fig. 3C). The majority of non-coding transcripts expressed uniquely in extrathymic ECs were classified as retained intron (17.9% in skin ECs, 15.92% in colon ECs, and 11.37% in lung ECs) and processed transcript (17.27% in skin ECs, 15.26% in colon ECs and 13.73% in lung ECs). Notably, transcripts shared exclusively by mTECs and extrathymic ECs were more frequently protein-coding than transcripts shared exclusively by thymic DCs and extrathymic ECs ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3D, 3E). The salient finding here is that, particularly in the lung, most EC-specific transcripts are protein-coding and can therefore generate MAPs that are not found in thymic APCs.

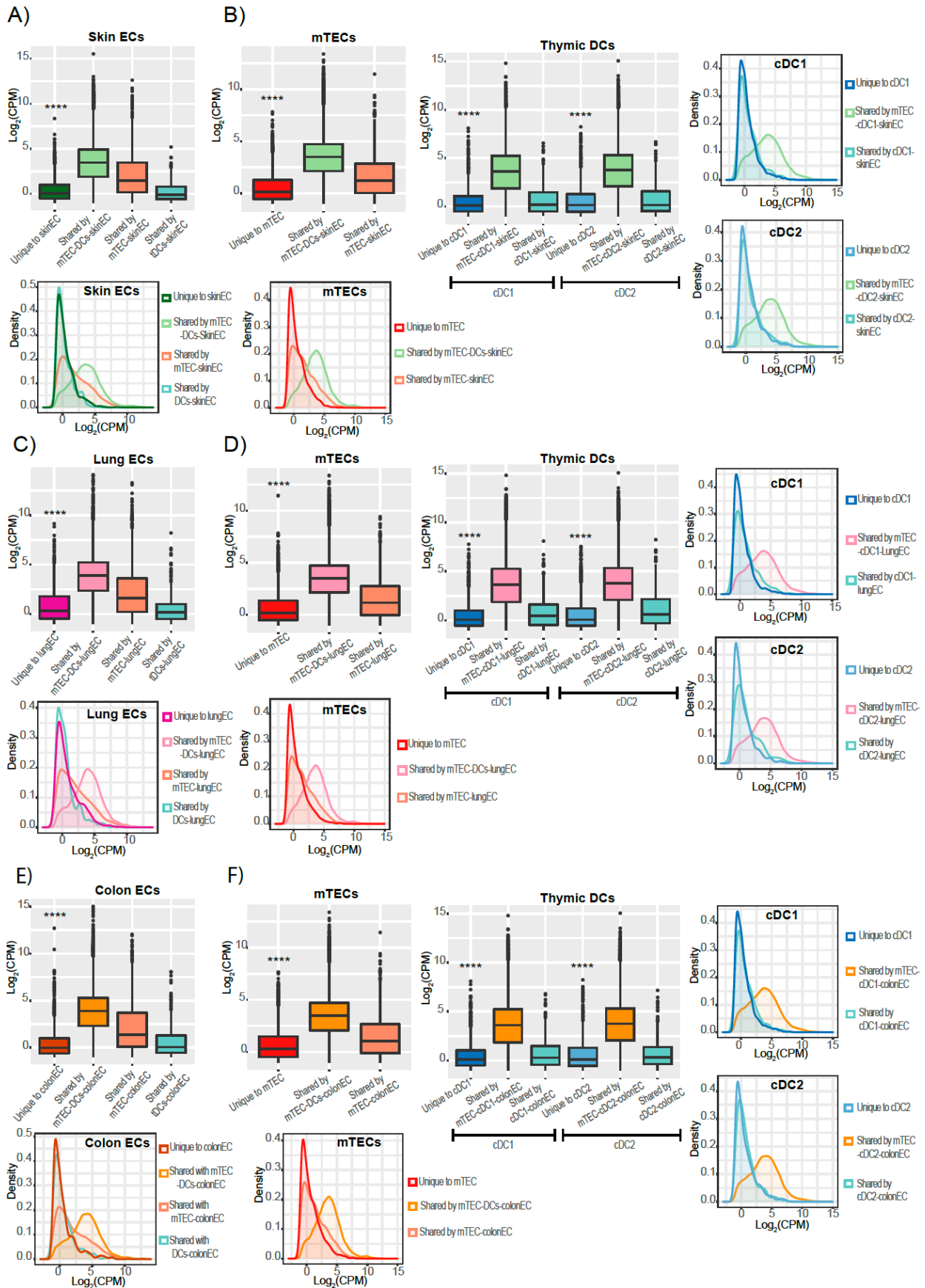


**Figure 3-3** Genomic origin of shared and unshared transcripts. (A-C) Pie charts show the distribution of biotype categories among transcripts expressed only in skin ECs and transcripts shared with skin ECs, mTECs, and thymic DCs (A), transcripts expressed only in colon ECs, and transcripts shared with colon ECs, mTECs, and thymic DCs (B), transcripts expressed only in lung ECs and transcripts shared with lung ECs, mTECs and thymic DCs (C). (D and E) Pie charts show the distribution of biotype categories among transcripts exclusively shared by extrathymic ECs and mTECs (D) and transcripts exclusively shared by extrathymic ECs and thymic DCs (E). Fisher's exact test was used to identify statistically significant differences.

### **3.6.3 Genes expressed only in extrathymic ECs have a relatively low expression level**

Translation is necessary but not sufficient for MAP generation. Many factors determine whether a gene will generate MAPs or not <sup>242, 355, 356</sup>. The expression level is a dominant factor in MAP biogenesis: MAPs preferentially derive from highly expressed genes <sup>357, 358</sup>. Therefore, we evaluated the expression level of genes shared or not by thymic APCs and extrathymic ECs. Genes expressed only in ECs from the skin, colon, or lung ECs were expressed at lower levels than those transcribed in mTECs, thymic DCs, or both (Fig. 4A, C, E). Likewise, genes expressed only in mTECs, cDC1, or cDC2 were lowly expressed relative to genes that were also transcribed in other cell subsets (Fig. 4B, 4D, F). The most highly expressed genes were those transcribed in extrathymic ECs subsets and the three thymic APC types. These genes showed a similar pattern of expression in the thymus and extrathymic tissues (Fig. 4). Globally, the median expression level followed the following hierarchy: i) genes expressed in extrathymic ECs and the three thymic APC subsets, ii) genes expressed in mTECs and extrathymic ECs, iii) genes expressed in extrathymic ECs and thymic DCs, and iv) genes expressed in a single thymic or extrathymic cell subset. We conclude that, because of their lower expression level, genes expressed only in extrathymic ECs are less likely to generate MAPs. As a corollary, genes more likely to generate MAPs in extrathymic ECs are also expressed in thymic APCs and, therefore, can induce central tolerance.

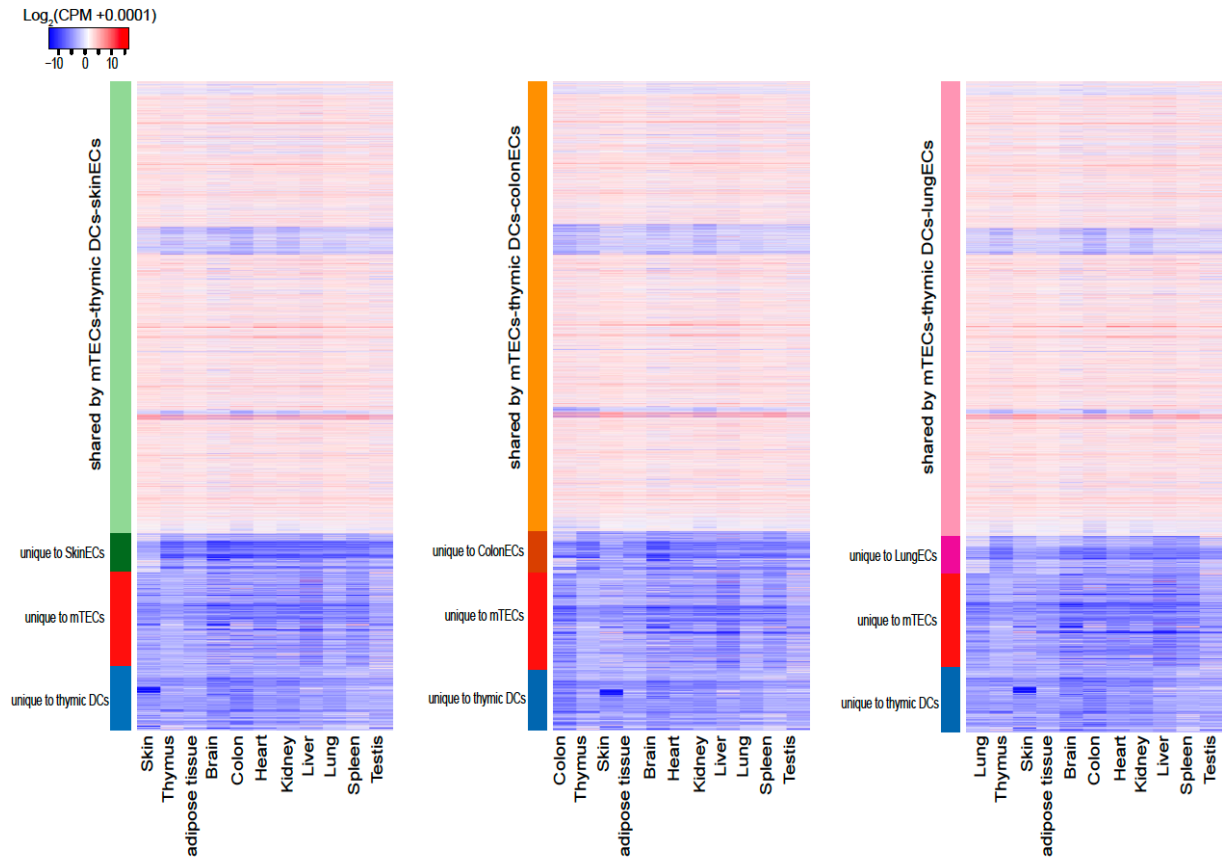




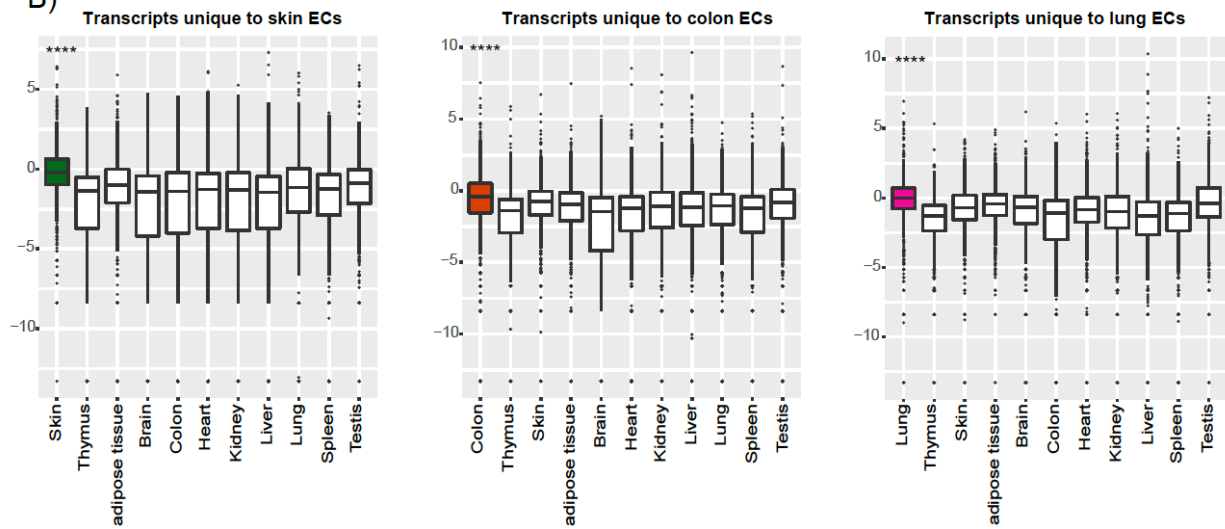
**Figure 3-4** Expression profile of genes expressed only in extrathymic ECs vs. genes expressed in both extrathymic ECs and thymic APCs. **(A-B)** Boxplots and density plots represent the expression distribution of genes of interest in skin ECs (A) and thymic APCs (B). **(C-D)** Boxplots and density plots represent the expression distribution of genes of interest in lung ECs (C) and thymic APCs (D). **(E-F)** Boxplots and density plots represent the expression distribution of genes of interest in colon ECs (E) and thymic APCs (F). The Mann-Whitney test determined statistical significance. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### **3.6.4 At the organismal level, genes expressed or not in thymic APCs have distinct expression profiles**

To extend our investigation beyond our three thymic and three extrathymic cell subsets, we analyzed the gene expression profile of other mouse tissues using additional transcriptomic datasets (see Materials and Methods). We observed a clear dichotomy between shared and unshared transcripts. Most genes transcribed in both thymic APCs and one of our initial types of ECs (skin, colon, lung) are expressed at a high level in numerous tissues and organs (Fig. 5A). In contrast, genes transcribed only in one of our six original cell subsets were expressed more rarely and at a lower level in various extrathymic tissues and organs. Notably, a fraction of the EC genes not transcribed in thymic APCs is expressed at higher levels in individual extrathymic tissues (skin, colon, lung) relative to other tissues (Fig. 5A, 5B). These genes preferentially expressed in skin, colon, or lung ECs in Fig. 5B overlap with the DEGs instrumental in tissue-specific functions highlighted in Fig. 1A.



B)



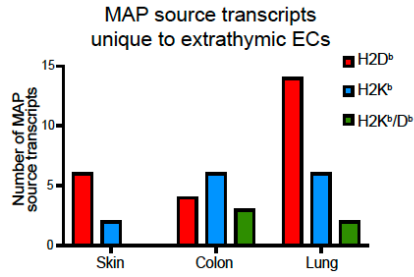
**Figure 3-5** Expression profile of shared and unshared transcripts across different tissues using published gene expression data from murine tissues (see Materials and Methods). **(A)** Heatmaps depict the expression profile of four categories of transcripts: shared with mTECs and thymic DCs, unique to extrathymic ECs, unique to mTECs, and unique to thymic DCs. **(B)** Box plots displaying the expression of genes unique to extrathymic ECs across different tissues. The Mann-Whitney test was used to determine statistical significance. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### **3.6.5 Some genes uniquely expressed in extrathymic ECs code for MAPs presented by H2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup>**

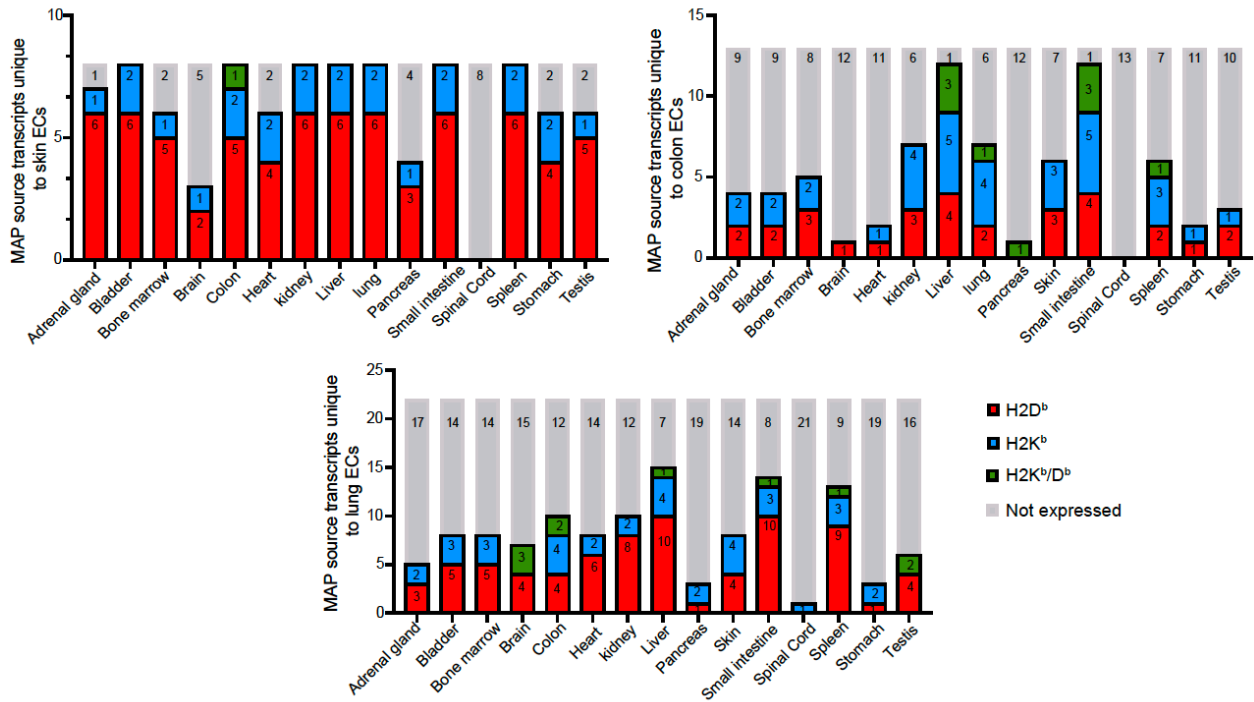
To directly evaluate whether some extrathymic EC-specific transcripts can generate MAPs, we analyzed the mouse MHC I immunopeptidomic atlas developed by Schuster and colleagues<sup>351</sup>. This atlas, created by mass spectrometry analyses of 19 normal tissues from C57BL/6 mice, contains 28,448 high-confidence H2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup>-associated MAPs. We found that several genes expressed only in extrathymic ECs generate MAPs binding to H2-K<sup>b</sup>, H2-D<sup>b</sup>, or both (Fig. 6A). Among genes expressed only in extrathymic ECs, 8 generate MAPs in skin ECs, 13 in colon ECs, and 22 in lung ECs (Supplemental Table 2). These MAP-source genes were also found to generate MAPs in other healthy mouse tissues (Fig. 6B).

To place these numbers into proper perspective, we analyzed MAP generation by genes expressed in extrathymic ECs and i) both mTECs and thymic cDCs, ii) mTECs but not thymic cDCs, and iii) thymic cDCs but not mTECs (Fig. 6C, Supplemental Table 3). The most salient finding is that extrathymic EC transcripts shared with both mTECs and thymic cDCs generate much more MAPs than other transcripts; 437 for skin ECs, 700 for colon ECs, and 739 for lung ECs (Fig. 6C, left). This observation is coherent with the fact that these highly shared transcripts are expressed at exceptionally high levels (Fig. 4). Genes expressed only by extrathymic ECs and mTECs generate about 10-fold fewer MAPs: 36 for skin ECs, 58 for colon ECs, and 55 for lung ECs (Fig. 6C, middle). Finally, shared only by extrathymic ECs and thymic DCs generate 3 to 10 MAPs per extrathymic EC type (Fig. 6C, right). Hence, out of all MAP-coding genes expressed in extrathymic ECs, about 90% are also expressed in both mTECs, and thymic cDCs (Fig. 6), and only a few are expressed neither in mTECs nor thymic cDCs (8 to 22 per organ; Fig. 6A).

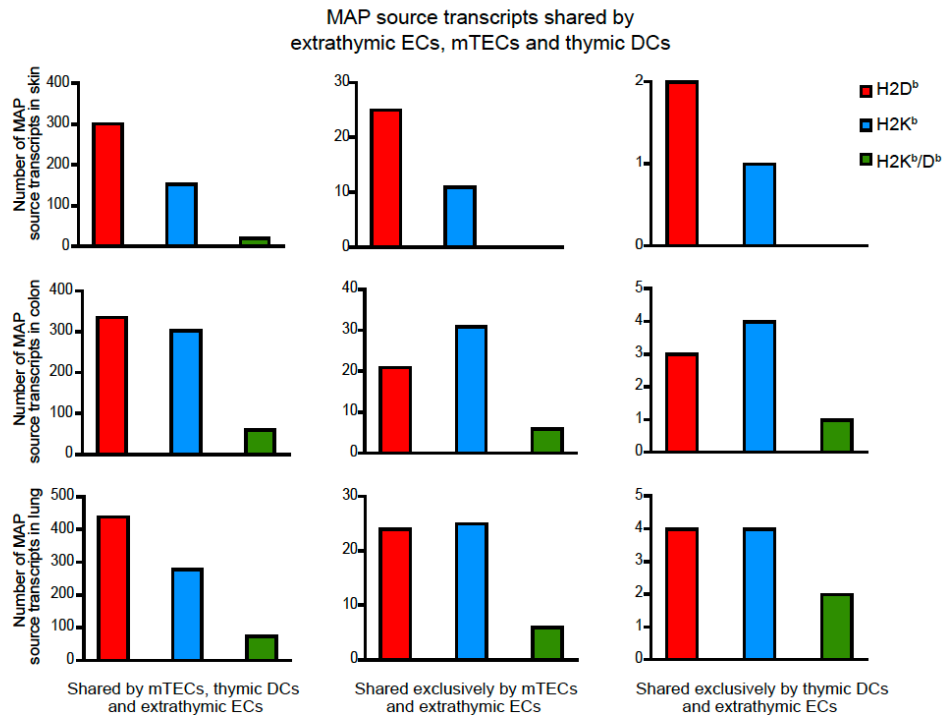
A)



B)



C)



**Figure 3-6** Generation of MAPs by transcripts unique to extrathymic ECs vs. transcripts shared with thymic APCs. **(A)** Bar graph depicting the number of MAP source genes unique to the skin, colon, and lung ECs identified across the corresponding tissues in the mouse atlas of MHC I-associated peptides <sup>351</sup> **(B)** Bar graph showing the tissue distribution of MAP source genes expressed only in extrathymic ECs. The numbers in each bar represent the number of expressed and non-expressed MAP source genes in each tissue. **(C)** Stacked bar chart depicting the number of EC MAP source genes expressed by one, two, or three thymic APC subsets. Of note, individual genes can generate MAPs presented by H2D<sup>b</sup>, H2K<sup>b</sup>, or both.

### 3.7 Discussion

The expression pattern of self MAPs largely dictates the depth of central tolerance. MAPs presented by both mTECs and thymic cDCs induce a profound tolerance (commonly via clonal deletion). In contrast, MAPs present in a smaller proportion of thymic APCs typically cause subversion of thymocytes toward tolerogenic differentiation pathways (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells or CD8 $\alpha$  intraepithelial lymphocytes) <sup>332, 333</sup>. Tolerance toward MAPs present on extrathymic cells but absent from thymic APCs must depend on peripheral tolerance. Therefore, several points can be made from our transcriptomic and immunopeptidomic analyses. Collectively, thymic APCs express about 93.5% of genes transcribed in extrathymic ECs. The proportion of extrathymic EC genes expressed in mTECs was superior to that found in thymic cDCs. However, most extrathymic EC transcripts were detected in both mTECs and thymic cDCs. This suggests that thymic cDCs enhance the depth of central tolerance to a vast repertoire of self-MAPs. In addition, cDCs are poised to extend the breadth of self-tolerance because more than 400 transcripts expressed in extrathymic ECs were detected in thymic cDCs but not mTECs. Furthermore, inferences based on the transcriptome do not take cross-presentation into account. Thus, transcripts present in mTECs but not cDCs may generate proteins cross-presented by DCs <sup>359</sup>. These considerations further support the notion that mTECs and thymic cDCs are close collaborators who play non-redundant roles in establishing central tolerance.

At face value, the fact that up to 7% of genes expressed in extrathymic ECs are absent in thymic APCs might seem to restrict the breadth of central tolerance significantly. However, *in fine*, T cells respond to MAPs, not transcripts, and three factors mitigate the risk that extrathymic EC-specific transcripts might generate MAPs. 1) Many transcripts expressed solely in skin and colon (but not lung) ECs are not annotated as protein-coding, and in principle, cannot generate MAPs. However, this rule probably has some exceptions since a small proportion of allegedly non-coding transcripts is translated and generates MAPs <sup>356, 360</sup>. 2) Compared to transcripts shared by extrathymic ECs and thymic APCs, transcripts specific to extrathymic ECs are expressed at low levels. Hence, they are less likely to generate MAPs via direct presentation (by extrathymic ECs) or cross-presentation (by extrathymic DCs). Indeed, RNA and protein abundance positively correlates with the probability of MAP direct presentation <sup>357, 358</sup> and cross-presentation <sup>361, 362</sup>. 3) Whereas thymic APCs express high amounts of MHC I, MHC II, and costimulatory molecules, most extrathymic



ECs do not express MHC II and costimulatory molecules, and their expression of MHC I is very low<sup>339-341</sup>. Altogether, these data suggest that the repertoire of MAPs present only in extrathymic ECs is relatively limited. This conclusion is supported by the fact that among the thousands of MAPs presented by H2D<sup>b</sup>/K<sup>b</sup> in healthy mice<sup>351</sup>, we found only 43 derived from genes not expressed in thymic APCs.

There are nonetheless limitations to our immunopeptidomic analyses. Hence, our conclusion that genes expressed solely in extrathymic ECs generate few MAPs applies only to healthy disease-free mice. During inflammation, upregulation of MHC I on extrathymic ECs substantially increases the number of MAPs at their surface. Inflammation might therefore diversify the repertoire of MAPs derived from extrathymic EC-specific transcripts.

Our identification of a murine set of extrathymic EC-specific transcripts might also be relevant to the design of experimental cancer immunotherapy models. It has been proposed that tissue-restricted Ags with no or minimal expression in thymic APCs may represent actionable targets for cancer immunotherapy<sup>363, 364</sup>. This is the case of the Melan-A/MART-1 which is recognized by cytotoxic T-lymphocytes as antigen on melanoma cells<sup>365</sup>. Therefore, we wish that the datasets we report herein will be instrumental in designing experimental models exploring the depth of self-tolerance in health and disease.

### **3.8 Acknowledgments**

We would like to thank the staff at the IRIC bioinformatics core facility for assistance and helpful discussions. We are grateful to Patrick Gendron for support with bioinformatic analyses. We also thank Marie-Pierre Hardy and Jean-David Larouche for their advice and thoughtful comments.

### **3.9 Disclosures**

The authors have no financial conflicts of interest.

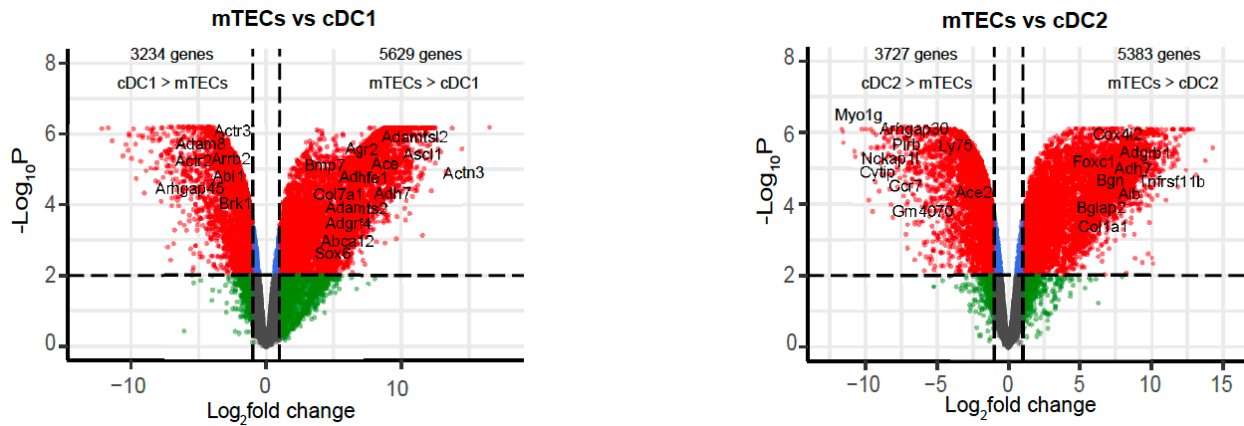
### **3.10 Footnotes**

This work was supported by grant FDN-148400 from the Canadian Institutes of Health Research (to C.P.)

Address correspondence and reprint requests to Dr. Claude Perreault or Dr. Sylvie Brochu, University of Montreal, Post Office Box 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC H3C3J7, Canada. E-mail address: [claudio.perreault@umontreal.ca](mailto:claudio.perreault@umontreal.ca) and [sylvie.brochu.1@umontreal.ca](mailto:sylvie.brochu.1@umontreal.ca)

Abbreviations used in this article: cDC, conventional dendritic cell; cDC1, cDC type 1; cDC2, cDC type 2; CPM, counts per million reads mapped; DC, dendritic cell; DEG, differentially expressed gene; EC, epithelial cell; MAPs, MHC class I-associated peptides; MHC I, MHC class I; mTEC, medullary thymic epithelial cell; pGE, promiscuous gene expression

### 3.11 Supplemental figures



**Supplemental Figure 3 S1** Transcriptomic comparison of mTECs and thymic DCs. Volcano plots showing the DEGs between mTECs and the two subsets of thymic DCs. The following criteria were used to define DEGs (red dots): an adjusted p-value <0.01 and a log<sub>2</sub> fold change >1 or <-1.

#### Annexe 2

**Table 2-S1:** List of genes uniquely expressed in extrathymic ECs

**Table 3-S2:** List of MAP-source genes translated only in extrathymic ECs

**Table 4-S3:** List of MAP-source genes shared exclusively by extrathymic ECs (extraTECs) and thymic DCs.

**Table 5-S3:** List of MAP-source genes shared exclusively by extrathymic ECs (extraTECs) and mTECs.

**Table S3:** List of MAP-source genes expressed in extrathymic ECs (extraTECs) and thymic APCs (mTECs and thymic DCs (tDCs))

## **Chapitre 4 Discussion**

### **4.1 Expression du CMH I par les cellules épithéliales thymiques et extrathymiques**

#### **4.1.1 Les cellules épithéliales thymiques présentent le plus haut niveau de CMH I**

Malgré leur importance dans plusieurs fonctions physiologiques et immunitaires, la régulation de l'expression du CMH I par les cellules épithéliales (ECs) reste peu élucidée. Cependant, ce processus a été largement étudié dans les cellules hématopoïétiques. En effet, les résultats présentés dans le chapitre 2 représentent, à notre connaissance, la première étude visant à caractériser l'expression du CMH I dans les ECs primaires. Nous avons effectué lors de cette étude une analyse comparative approfondie de l'expression du CMH I chez les ECs primaires fraîchement isolées du thymus, peau, colon et poumons. Le recours aux ECs primaires fraîchement isolées représente un modèle physiologique pertinent pour l'étude de l'expression du CMH I puisque l'utilisation des lignées cellulaires a été la source de plusieurs résultats contradictoires (voir section 1.2.4.1 de l'introduction). En effet, une étude récente au sein de notre laboratoire démontre une expression défectueuse de certains allèles du CMH I dans la même lignée cellulaire obtenue à partir deux bio-banques différentes<sup>100</sup>. Les résultats présentés dans le chapitre 2 (Figure 2-1) révèlent une expression hétérogène des molécules du CMH I dans les ECs isolées de différents tissus. Cependant, le gène B2m est fréquemment utilisé comme un contrôle endogène lors d'analyses de qRT-PCR<sup>366</sup>. Nos résultats représentent, alors, une preuve concrète pour reconsidérer le recours à ce gène comme un contrôle endogène. Les résultats présentés dans la figure 2-1 montrent que l'expression du CMH I est 10 à 100 fois plus élevée à la surface des TECs comparativement aux ECs de la peau, du colon et des poumons. De plus, les molécules du CMH I sont plus abondantes à la surface des mTECs par rapport aux cTECs et aux cellules dendritiques thymiques (tDCs) et extrathymiques (Figure 2-1; C). Des études antérieures réalisées par notre laboratoire démontrent que les mTECs sont caractérisées par un taux élevé de synthèse protéique qui est généralement associée à une accumulation de DRIPs<sup>32</sup>. Connue pour être une source importante des peptides présentés par les molécules du CMH I<sup>10</sup>, nous pensons que l'accumulation des DRIPs est responsable de l'expression élevée du CMH I par les mTECs.

D'autre part, nos résultats démontrent que les ECs des poumons présentent une expression remarquablement faible pour les molécules du CMH I. Supposé que le niveau faible du CMH I à la surface des ECs pulmonaires pourrait être due à la digestion enzymatique est toutefois légitime. En effet, les travaux de Autengruber et al., montrent que la digestion enzymatique affecte l'expression des 18 protéines membranaires<sup>367</sup>. Cependant, les résultats de la figure 2-1(C) rejettent cette hypothèse. Les DCs isolées simultanément avec les ECs présentent, à la surface une expression plus élevée des molécules du CMH I.

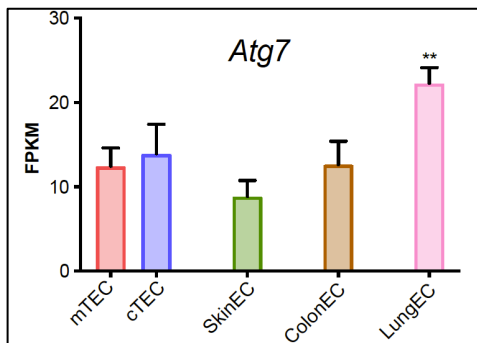
Par ailleurs, un niveau faible de l'expression du CMH I a été rapporté dans 73% des cancers du poumon. Ainsi, l'expression faible du CMH I a été alors proposée comme un marqueur associé à un mauvais pronostic<sup>368</sup>. Néanmoins, peu d'études ont été réalisées sur l'expression du CMH I dans les poumons dans des conditions physiologiques. Nos résultats montrent que les ECs récoltées à partir des poumons normaux sont caractérisées par un niveau faible d'expression du CMH I. Ceux-ci laissent suggérer qu'une expression faible du CMH I pourrait être une caractéristique physiologique du système pulmonaire. Par conséquent, la considération du niveau d'expression du CMH I comme un marqueur de pronostic pour le cancer des poumons pourrait être biaisée.

En outre, il existe plusieurs similitudes entre le tissu pulmonaire et intestinal tel que le développement embryonnaire et les acteurs de l'immunité mucoale<sup>369</sup>. Les résultats présentés dans la figure 2-1 du chapitre 2 démontrent également que les ECs du colon expriment des niveaux du CMH I semblable aux ECs du poumon ce qui appuie la similarité entre ces deux tissus.

D'autre part, nous avons montré que les gènes impliqués dans la voie de présentation du CMH I sont plus exprimés dans les TECs par rapport aux ECs extrathymiques. Nous avons constaté que l'expression du CMH I à la surface est 100 fois plus élevée chez les TECs que les ECs pulmonaires alors que la variabilité de l'expression des gènes codant pour la structure du CMH I est environ 10 fois. Cela suggère l'implication des mécanismes post-transcriptionnels additionnels dans la régulation de l'expression du CMH I entre les TECs et ECs extrathymiques. Les résultats dans la figure 2-2 (D), montrent que 65% des molécules du CMH I sont présentes dans le milieu intracellulaire des ECs pulmonaires. De plus, le séquençage d'ARN révèle une expression faible des gènes de *Tap1* et *Tap2*, cruciaux pour le transport des peptides vers la lumière du RE. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Peter J Chefalo et al., qui montrent que l'absence de

*Tap1* dans les cellules entraîne une accumulation des molécules du CMH I dans le RE et une diminution drastique de son expression à la surface<sup>370</sup>.

De plus, les travaux menés par Monica et al., démontrent que la macroautophagie joue un rôle dans la régulation de l'expression du CMH I à la surface. En effet, les souris déficientes en *Atg7*, un acteur clé dans la macroautophagie, sont caractérisées par une expression élevée du CMH I<sup>371</sup>. En ligne avec cette étude, un niveau d'expression élevée du *Atg7* a été constaté dans les ECs pulmonaires ce qui suggère une augmentation de la macroautophagie chez ces cellules (Figure 4-1). Dans l'ensemble, une macroautophagie élevée avec une expression faible de *Tap1* et *Tap2* abouti à une augmentation du pool CMH I intracellulaire et par conséquent une diminution de son expression à la surface des ECs pulmonaires.



**Figure 4-1 Le gène clé de la macroautophagie (*Atg7*) est fortement exprimé dans les ECs pulmonaires.** Graphique à barres illustrant le niveau d'expression (FPKM) du gène *Atg7* entre les différentes ECs.

Par ailleurs, la contribution de NLRC5 dans l'induction de l'expression du CMH I par les cellules non hématopoïétiques reste peu élucidée. À notre connaissance, ce présent travail représente la première étude où l'expression du *Nlrc5* a été comparée entre plusieurs types des ECs. Nous avons démontré que le gène *Nlrc5* est fortement exprimé chez les TECs corrélant ainsi avec l'expression du CMH I à la surface. Étonnement, le niveau d'expression du *Nlrc5* chez les ECs de la peau est semblable à celui de TECs malgré une expression du CMH I plus faible (Figure 2-S3 ; I). En effet, ces résultats suggèrent que, dans des conditions physiologiques, NLRC5 est crucial pour le maintien l'expression du CMH I, mais insuffisant pour son amplification.

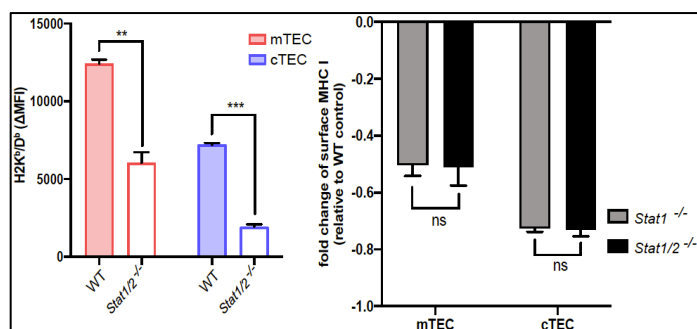
D'autre part, nous avons démontré une expression élevée de gènes liés au métabolisme des lipides (par exemple, *Cyp2b10*, *Acs3*, *Cyp2c55*) dans les ECs extrathymiques, suite à une analyse transcriptomique comparative entre mTECs et ECs extrathymiques (Figure 3-1;A). Ce résultat est en accord avec l'importance du métabolisme des lipides dans les fonctions physiologiques de ces tissus<sup>372-374</sup>. Plusieurs études ont montré que le métabolisme lipidique est un régulateur clé dans le

trafic membranaire. En effet, une augmentation du métabolisme des lipides est associée à une amplification du trafic membranaire qui requiert de l'endocytose et exocytose<sup>375-378</sup>. Nous pensons alors que les ECs extrathymiques sont caractérisées par des taux élevés d'endocytose et d'exocytose à la membrane plasmique ce qui entraîne un recyclage continu de la molécule du CMH I et limite ainsi sa détection par cytométrie en flux. En lien avec cette hypothèse, S.R. Shaikh et al., ont démontré que l'incubation des APCs avec de l'acide palmitique (acide gras saturé) induit une diminution de l'expression du CMH I à la surface ce qui altère leur capacité à activer les cellules T CD8<sup>+</sup> et induire une réponse immunitaire adéquate<sup>379</sup>.

#### **4.1.2 Impact de la voie des IFNs dans la régulation de l'expression constitutive du CMH I**

Dans ce présent travail, nous avons dévoilé un rôle inattendu des IFNs dans l'amplification de l'expression du CMH I à la surface des TECs dans les conditions non inflammatoires. Nos résultats révèlent une baisse significative de l'expression du CMH I à la surface des TECs isolées des souris déficientes pour *Stat1*, régulateur clé de la voie des IFNs. Nous avons également trouvé que l'impact des IFNs sur l'expression du CMH I est spécifique aux TECs puisque l'absence de *Stat1* n'engendre aucun effet sur l'expression du CMH I chez les ECs extrathymiques (Figure 2-4 ; C). En outre, nous avons remarqué que l'absence de *Nlrc5* induit une diminution du CMH I à des niveaux semblables aux TECs isolées des souris déficientes en *Stat1* (Figure 2-4; H). Cette observation laisse suggérer que la régulation de l'expression du CMH I à la surface des TECs est orchestrée conjointement par NLRC5 et la voie des IFNs. Bien que nos résultats soulignent l'importance de la voie des IFNs dans la régulation du CMH I, les TECs isolées des souris déficientes en *Stat1* présentent un niveau résiduel élevé (Figure 2-4; H). Plusieurs études ont démontré que *Stat2* est aussi requis pour induire l'expression des ISGs (*Interferon-Stimulated Genes*) indépendamment de *Stat1*<sup>380-382</sup>. Par conséquent, nous avons évalué l'expression du CMH I sur TECs isolées des souris déficientes simultanément pour *Stat1* et *Stat2*. Nos résultats montrent que le niveau résiduel du CMH I à la surface des TECs est encore élevé (Figure 4-2). Cela pourrait être expliqué par l'expression constitutive du NLRC5 chez ces souris. De ce fait, une évaluation de l'expression du CMH I sur les TECs isolées à partir des souris déficientes en *Nlrc5*, *Stat1* et *Stat2* sera pertinent à effectuer dans des travaux futurs. En accord avec cette suggestion, Kobayashi et al., ont démontré que l'absence combinée de *Irf1* (facteur de transcription induit par l'IFN) et

*Nlr5* entraîne une réduction drastique de l'expression du CMH I et ses gènes associés *in vitro* et *in vivo*<sup>383</sup>.

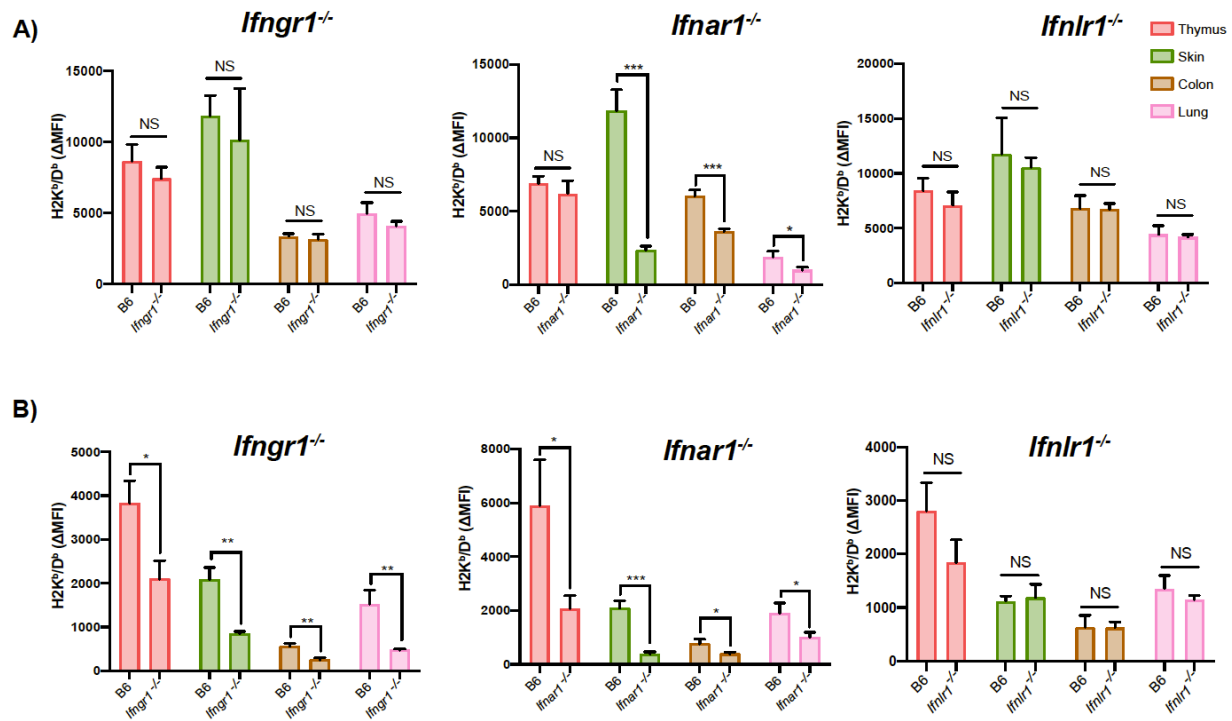


**Figure 4-2 Le niveau du CMH I à la surface des TECs doublement déficientes en Stat1 et Stat2 est similaire aux TECs déficientes en Stat1 uniquement.** Graphique à barres montrant l'expression du CMH I à la surface des

TECs (cTECs et mTECs) isolées des souris *Stat1/2*<sup>-/-</sup> comparé aux souris *Wild type*. Le panneau de droite montre une comparaison de diminution de l'expression du CMH I sur les TECs des souris *Stat1*<sup>-/-</sup> comparées aux TECs des souris *Stat1/2*<sup>-/-</sup>.

Par ailleurs, l'amplification de l'expression du CMH I sur la surface des TECs est médiée par l'IFN- $\lambda$ . Dans le thymus, nous avons trouvé que l'IFN- $\lambda$ , produit principalement par mTECs, amplifie l'expression du CMH I via une boucle autocrine ou paracrine. Contrairement aux autres types d'IFNs, l'IFN- $\lambda$  est capable d'induire l'expression des ISGs sans engendrer une réaction inflammatoire dommageable chez les tissus épithéliaux<sup>150,384</sup>. De ce fait, le recours à cette cytokine pour amplifier de l'expression du CMH I dans les TECs semble être adéquat. De plus, les résultats présentés dans la figure 4-2 démontrent que l'absence de la voie d'IFN- $\lambda$  n'affecte pas l'expression du CMH I à la surface des DCs et des cellules endothéliales thymiques et aussi extrathymiques. Cela consolide le rôle de l'IFN- $\lambda$  pour réguler l'expression du CMH I spécifiquement dans les TECs. Nous avons trouvé que, contrairement aux ECs extrathymiques, l'expression du CMH I à la surface des DCs et des cellules endothéliales extrathymiques dépend des IFNs. Dans les DCs extrathymiques, uniquement l'absence de l'IFN- $\alpha$  aboutit à une diminution significative de l'expression du CMH I alors que l'absence l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  altère l'expression du CMH I dans les cellules endothéliales (Figure 4-3).





**Figure 4-3 Impact de la voie de l'IFN sur l'expression du CMH I sur les DCs (A) et les cellules endothéliales (B) isolées à partir du thymus et les tissus extrathymiques.** Graphique à barres montrant l'expression du CMH I à la surface des DCs et les cellules endothéliales des souris B6 par rapport au souris *Ifngr1*<sup>-/-</sup>, *Ifnar1*<sup>-/-</sup> et *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>.

D'autre part, l'effet de l'IFN dépend entièrement de l'expression de son récepteur correspondant par la cellule cible<sup>385</sup>. En effet, nos résultats montrent que l'expression du gène codant pour le récepteur d'IFN-λ (*Ifnlr1*) est élevée chez les TECs. Cependant, nous avons constaté que le gène *Ifnlr1* est plus exprimé par ECs pulmonaires que les TECs (Figure 2-5; A) bien que l'absence de la voie d'IFN-λ n'a aucun effet sur l'expression du CMH I. En particulier, l'épithélium des voies respiratoires est constamment exposé à une variété de virus respiratoires. Ainsi, il n'est pas surprenant que les ECs pulmonaires présentent une expression constitutive relativement élevée du gène *Ifnlr1* puisqu'une induction précoce de la signalisation de l'IFN-λ est cruciale pour limiter la propagation virale à la suite de l'infection initial<sup>386</sup>.

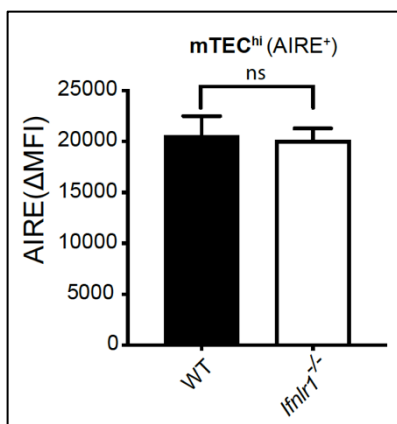
## 4.2 Impact de l'expression du CMH I sur la tolérance centrale

### 4.2.1 Les conséquences de l'absence de la voie d'IFN- $\lambda$ dans le thymus

Nous avons démontré que l'expression du CMH I est amplifiée à la surface des TECs grâce à une boucle autocrine ou paracrine médiée par l'IFN- $\lambda$ . Le thymus est un organe lymphoïde primaire dont la fonction principale est d'assurer le développement des cellules T fonctionnelles et tolérantes. Ce processus est principalement orchestré par les TECs qui sont divisées en cTECs et mTECs. La sélection positive des cellules T ayant un TCR fonctionnel est médiée par les cTECs. Généralement, les cellules T dont le TCR est auto-réactif subissent une sélection négative qui implique les mTECs et tDCs. En effet, les cellules T dont le TCR est capable de fixer des peptides du soi avec une affinité excessive seront éliminées par apoptose. Ce processus est appelé délétion clonale. Alors que la plupart des études se focalisent sur l'affinité entre le TCR et le peptide présenté par CMH I, aucune étude n'a abordé, à notre connaissance, l'impact du niveau d'expression du CMH I sur la délétion clonale. Récemment, Elise R. Breed et al., ont développé une méthode pour évaluer la délétion clonale dans le thymus en mesurant l'activité catalytique de caspase 3 chez les lymphocytes T. Dans le présent travail, nous avons eu recours au test développé par Elise R. Breed et al., pour étudier l'impact de la baisse du CMH I à la surface des TECs sur la délétion clonale. De ce fait, nous avons évalué l'activité catalytique de caspase 3 dans le thymus des souris déficientes pour la voie d'IFN- $\lambda$  (*Ifnlr1*<sup>-/-</sup>). Nous avons aussi inclus dans cette analyse les TECs des souris hétérozygotes *B2m*<sup>+/-</sup> puisque ces souris présentent un niveau d'expression du CMH I semblable aux TECs des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> (Figure 2-6; B). Les résultats présentés dans la figure 2-6 (E) démontrent une baisse significative de l'activité catalytique de caspase 3 chez les thymocytes CD8 semi-matures (SM) qui existent dans la région médullaire du thymus des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> et *B2m*<sup>+/-</sup>. De plus, les résultats présentés dans la figure 2-7 (A) révèlent une infiltration des cellules inflammatoires dans les organes périphériques conduisant à une manifestation de l'auto-immunité chez les souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>. Ces résultats montrent clairement que la diminution de l'expression du CMH I à la surface des TECs est suffisante pour augmenter la fréquence des cellules CD8<sup>+</sup> qui échappent à la délétion clonale ce qui aboutit à un dérèglement de la tolérance immunitaire. Nous avons également analysé l'expression du CD5 puisque son expression corrèle avec l'intensité de la signalisation du TCR<sup>387</sup>. Nos résultats démontrent une baisse de l'expression de CD5 par les thymocytes présélectionnés CD69<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>. Ces

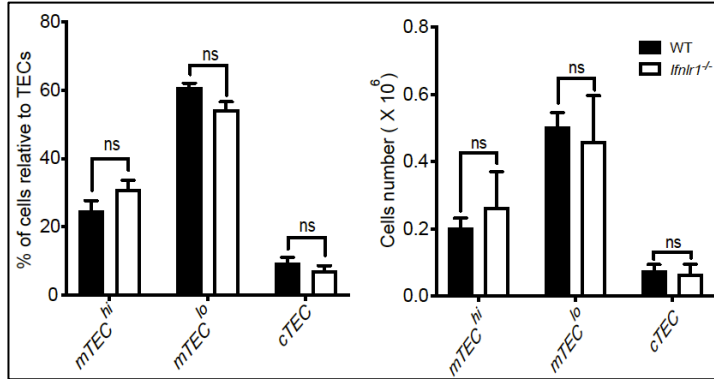
résultats suggèrent que la diminution de l'expression du CMH I à la surface des TECs est aussi suffisante pour affecter la sélection positive.

Une question légitime à soulever de savoir si le déséquilibre de la tolérance centrale dans les souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> pourrait être dû à l'implication de la voie de l'IFN-λ dans d'autres mécanismes moléculaires thymiques autre que la régulation de l'expression du CMH I à la surface des TECs. De ce fait, il est intéressant de noter que les résultats présentés dans la figure 4-4 démontrent que l'absence de la voie de signalisation de l'IFN-λ n'affecte pas l'expression de AIRE qui est un facteur clé dans la tolérance centrale.



**Figure 4-4 L'absence de la voie d'IFN λ n'affecte pas l'expression de Aire.** Graphique à barres montrant l'expression de Aire suite à un marquage intracellulaire dans la sous-population mTEC<sup>hi</sup> (Aire<sup>+</sup>) isolées des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> comparées aux souris *Wild type*.

Dans la perspective d'explorer le rôle de l'IFN-λ dans le thymus, nous avons également comparé le nombre et le pourcentage des sous populations des TECs isolées à partir du thymus des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> et *Wild type*. Les résultats obtenus (figure 4-5) révèlent que l'altération de la voie d'IFN-λ ne possède aucun effet sur le nombre et le pourcentage des trois sous populations majoritaires des TECs (mTEC<sup>hi</sup>, mTEC<sup>lo</sup> et cTEC). Dans l'ensemble, nos résultats confirment que le rôle de l'IFN-λ dans le thymus est uniquement lié à la régulation de l'expression du CMH I chez les TECs. Nous pensons que le niveau d'expression élevé du CMH I à la surface des TECs est crucial pour générer des cellules T fonctionnelles et auto-tolérantes.



**Figure 4-5** l'absence de la voie d'IFN- $\lambda$  n'affecte le pourcentage et le nombre des sous-populations majoritaires des TECs. Graphique à barres montrant le pourcentage (A) et le nombre (B) des sous-populations de TECs (mTEC<sup>hi</sup>, mTEC<sup>lo</sup>, et cTEC) isolées des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> comparées aux souris *Wild type*.

#### 4.2.2 Contribution différentielle des APCs thymiques dans la tolérance centrale

Nous avons trouvé que, chez les souris hétérozygotes *B2m*<sup>+/-</sup>, la baisse de la délétion clonale des thymocytes CD8<sup>+</sup> SM n'est pas seulement limitée à la région médullaire de thymus, mais se produit également dans la région corticale, contrairement au souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>. Cette divergence peut être attribuée à l'expression du CMH I à la surface des cellules dendritiques thymiques (tDCs) qui jouent un rôle majeur dans délétion clonale des thymocytes résidant dans le cortex du thymus<sup>181</sup>. Nos résultats démontrent une diminution de l'expression du CMH I chez les tDCs des souris hétérozygotes *B2m*<sup>+/-</sup> alors que la déficience de la voie de l'IFN- $\lambda$  n'affecte pas l'expression du CMH I dans les tDCs des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>.

Les tDCs contribuent à la tolérance centrale par la présentation croisée des antigènes tissulaires restreints (TRA) transférés des mTECs ou acquis de la périphérie<sup>388</sup>. Dans le chapitre 3, nous avons évalué la contribution différentielle des tDCs et mTECs dans la tolérance centrale. Nous avons donc comparé le transcriptome des cDC1, cDC2 et mTECs (nommée APCs thymiques) aux transcriptomes des ECs extrathymiques isolées de la peau, du colon et des poumons dans les conditions physiologiques. En effet, cette étude représente la première caractérisation du transcriptome du soi exprimé par les ECs extrathymiques et les APCs thymiques. Nos résultats démontrent que les APCs thymiques expriment environ 93% des gènes qui sont transcrits dans les ECs extrathymiques. Nous avons constaté que la proportion des transcrits des ECs extrathymiques exprimés par mTECs est supérieure à ceux exprimés par les tDCs. Nous avons également trouvé que les DEGs les plus exprimés chez les mTECs par rapport aux tDCs sont associés à des fonctions physiologiques liées aux tissus extrathymiques. Ces résultats suggèrent que les mTECs sont

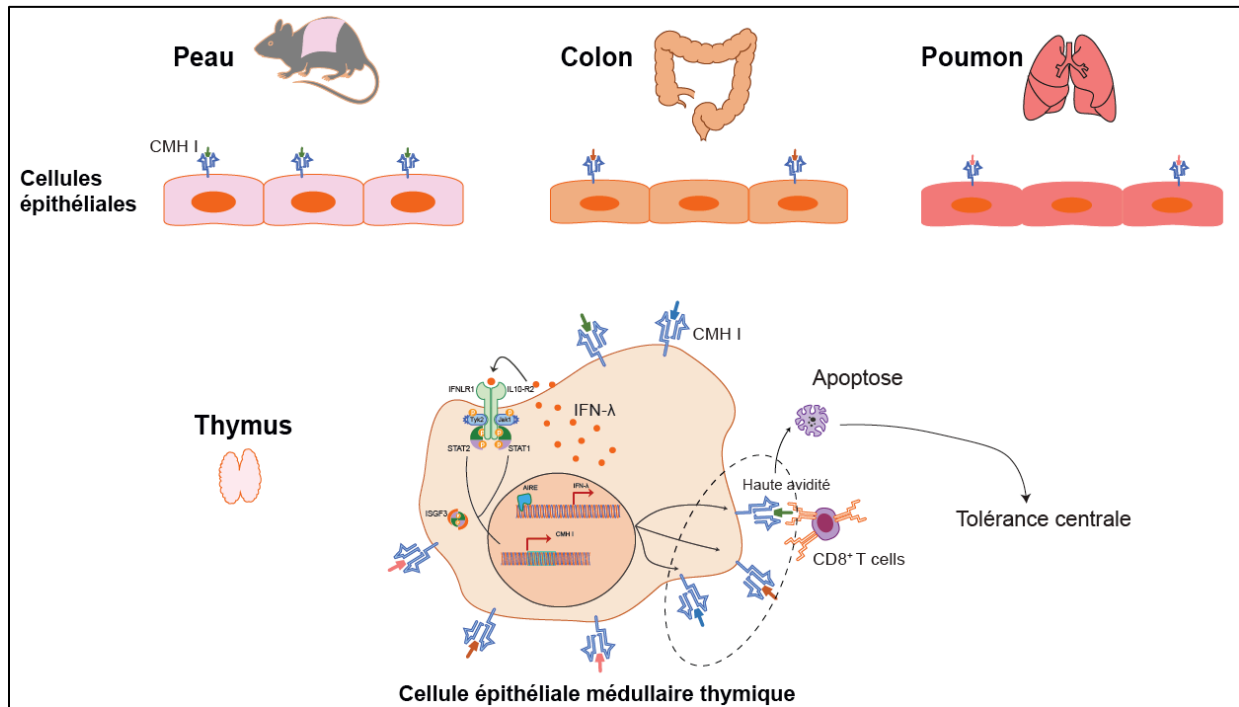
capables d'exprimer un répertoire plus diversifié des TRA périphériques par rapport aux tDCs. Néanmoins, nous avons remarqué que plus de 400 transcrits exprimés par les ECs extrathymiques sont détectés dans les tDCs, mais pas dans les mTECs ce qui suggère que les tDCs contribuent à l'étendue de la tolérance centrale. Récemment, Jiayi et al., ont révélé que les tDCs présentent un degré d'accessibilité à la chromatine similaire aux mTECs ce qui entraîne l'expression de certains TRAs<sup>389</sup>. De plus, les peptides générés par les transcrits exprimés dans les mTECs, mais pas les tDCs seront présentés de manière croisée par les tDCs. Dans l'ensemble, ces résultats appuient l'idée que les tDCs et les mTECs pourraient contribuer conjointement à l'établissement de la tolérance centrale.

Toutefois, même si les APCs thymiques couvrent une grande partie de l'ensemble de transcriptome des ECs extrathymiques, nous avons trouvé une fraction des gènes exclusivement exprimée dans les ECs de la peau, du colon et des poumons. Notre analyse d'enrichissement d'annotation montre que ces gènes sont liés aux fonctions biologiques propres à leurs tissus correspondants. Malgré leur faible niveau d'expression dans les ECs extrathymiques et les tissus périphériques, nous avons trouvé qu'une petite fraction de ces gènes est capable de générer des peptides associés aux molécules du CMH I (MAPs). Étant donné que ces gènes ne sont pas exprimés dans les APCs thymiques, nous supposons que le maintien de la tolérance immunitaire vis-à-vis de ces peptides est certainement garanti grâce aux mécanismes de la tolérance périphérique. En outre, nous avons montré dans le chapitre 2 que les ECs extrathymiques sont caractérisées par une faible expression du CMH I. De plus, la plupart des transcrits uniques à la peau et au colon sont annotés non codants par rapport aux transcrits partagés avec les APCs thymiques. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que les transcrits uniques aux ECs extrathymiques sont moins susceptibles de générer des MAPs ce qui diminue la probabilité de présenter à la surface des peptides capables d'activer les cellules T.

La caractérisation de profil d'expression des TRAs dans le thymus est pertinente pour comprendre l'issue de la réponse immunitaire dans plusieurs maladies. En effet, Malhotra et al., ont démontré qu'une expression faible d'un TRA dans le thymus engendre une augmentation des lymphocytes T de haute avidité à cet antigène ce qui pourrait aboutir à l'auto-immunité spontanée<sup>390</sup>. D'autre part, plusieurs études révèlent que les gènes spécifiques au tissu peuvent représenter une cible thérapeutique prometteuse pour les maladies cancéreuses<sup>391, 392</sup>. Par exemple, dans le cas des

patients recevant un traitement d'immunothérapie pour le mélanome, la présence du vitiligo constitue un bon pronostic de survie<sup>393</sup>. Par conséquent, un dérèglement de la tolérance périphérique envers un antigène spécifique aux tissus pourrait être une stratégie prometteuse pour traiter les cancers des tissus et des organes non vitaux. De ce fait, la caractérisation de l'expression des antigènes spécifiques aux tissus, dans le thymus et en périphérie, représente une approche attrayante pour l'immunothérapie ciblée. Ainsi, notre identification des transcrits exclusifs aux ECs extrathymiques pourrait également être pertinente dans la conception des modèles expérimentaux d'immunothérapie. Finalement, nous espérons que les résultats présentés dans le chapitre 3 seront utiles pour identifier des nouveaux biomarqueurs des maladies auto-immunes et aussi des cibles thérapeutiques pour les maladies cancéreuses.

### 4.3 Conclusion et perspectives



**Figure 4-6** Modèle récapitulatif elucidant les principales découvertes dans le cadre de ce travail. Nous avons effectué dans cette étude une analyse comparative de l'expression du CMH I à la surface des cellules épithéliales fraîchement isolées du thymus, peau, colon et des poumons. Nous avons trouvé que l'expression du CMH I est plus élevée à la surface des cellules épithéliales médullaires thymiques (mTECs) par rapport aux cellules extrathymiques. Nous avons dévoilé que les mTECs sont la source principale de l'IFN- $\lambda$  qui agit en boucle autocrine pour amplifier l'expression du CMH I d'environ 30%. Nous avons trouvé également que l'absence de la voie de l'IFN- $\lambda$  abouti à une diminution de l'expression du CMH et induit une perturbation de la tolérance centrale.

### 4.3.1 Expression du CMH I par les cellules épithéliales thymiques et extrathymiques

Nous avons démontré que, en condition physiologique, l'expression du CMH I est hétérogène à la surface des ECs isolées du thymus, de la peau, du colon et des poumons. L'expression du CMH I est 10 à 100 fois plus élevée à la surface des TECs. Les ECs pulmonaires sont caractérisées par une faible expression du CMH I à la surface alors qu'une grande quantité des molécules du CMH I existe dans le milieu intracellulaire. De ce fait, une évaluation de la localisation exacte du pool intracellulaire du CMH I dans les ECs pulmonaires serait pertinente à effectuer dans des travaux futurs. Les poumons sont constamment exposés à des agents pathogènes et une activation défectueuse du système immunitaire peut avoir des conséquences graves. Il est important alors d'évaluer l'impact du niveau d'expression du CMH I sur le fonctionnement pulmonaire dans des conditions physiologiques et inflammatoires. Par conséquent, la création d'une souris transgénique exprimant des niveaux élevés du CMH I serait alors particulièrement pertinente.

L'expression élevée des gènes reliés au métabolisme des lipides dans les ECs extrathymiques représente une piste intéressante à explorer. Nous avons émis l'hypothèse que le métabolisme élevé des lipides entraîne une amplification du trafic membranaire et par conséquent un recyclage continu de la molécule du CMH I ce qui entrave sa détection. Pour confirmer cette hypothèse, nous proposons d'évaluer le niveau d'expression du CMH I chez des souris déficientes pour *Cavl*, régulateur central dans le métabolisme des lipides<sup>394</sup>. Caractérisées par une altération du trafic membranaire, le recours aux souris déficientes pour *Rab5* serait aussi utile pour la confirmation de notre hypothèse.

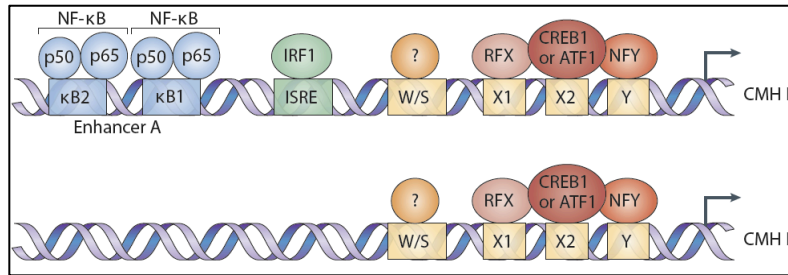
Les résultats présentés dans le chapitre 2 (Figure 2-5 ; B et C) montrent que les mTECs sont la source principale de l'IFN- $\lambda$  qui agit en boucle autocrine ou paracrine pour amplifier l'expression du CMH I. Dans notre analyse, nous avons divisé les mTECs en deux populations, mTEC<sup>lo</sup> (CMH II<sup>lo</sup>) et mTEC<sup>hi</sup> (CMH II<sup>hi</sup>) en se basant sur l'expression du CMH II. Cependant, le recours au CMH II comme un marqueur cellulaire ne tient pas en compte de l'hétérogénéité et la complexité des mTECs. En effet, plusieurs études ont révélé l'existence d'une troisième population connue sous le nom de mTEC post-AIRE caractérisée par une faible expression du CMH II et AIRE<sup>395</sup>. Dans les travaux futurs, nous proposons d'utiliser des marqueurs membranaires plus pertinents afin de



distinguer les différentes populations des mTECs et identifier adéquatement les cellules productrices de l'IFN- $\lambda$ . D'autre part, le *RNA-seq* utilisé dans notre étude n'est pas performant pour explorer des systèmes biologiques complexes et hétérogènes (comme le thymus). Ainsi, le recours au *single cell RNA-seq* dans les travaux futurs serait pertinent afin de caractériser convenablement les cellules productrices de l'IFN- $\lambda$  dans le thymus.

Comparées au CMH II, les molécules du CMH I sont caractérisées par une queue intracellulaire d'environ 40 acides aminés contenant un site de phosphorylation de la tyrosine qui est connu pour jouer un rôle instrumental dans plusieurs processus cellulaires<sup>396</sup>. Plusieurs études ont révélé que les molécules du CMH I sont impliquées dans des fonctions non immunologiques autres que la présentation des peptides<sup>396</sup>. Par exemple, l'expression du CMH I dans le cerveau est étroitement liée à l'âge et influence le développement neuronal prénatal<sup>397-399</sup>. De ce fait, il serait pertinent d'explorer le rôle non immunitaire du CMH I dans le thymus. La queue cytoplasmique du CMH I est codée par deux exons différents (exons 6 et 7)<sup>400</sup>. Nous pensons que le recours aux molécules du CMH I dépourvu de ces deux exons serait utile pour examiner le rôle non classique des molécules du CMH I dans le thymus et les autres tissus extrathymiques.

Le promoteur du CMH I contient, contrairement au CMH II, un élément régulateur de transcription supplémentaire qui est ISRE (élément de réponse stimulé par les IFNs) (Figure 4-3)<sup>401</sup>. De ce fait, nous pensons que l'expression du CMH I devrait être délicatement régulée pour assurer une réponse immunitaire adéquate. En résumé, nous sommes convaincus que l'expression du CMH I, dans les conditions physiologiques, dépend principalement de la coordination étroite entre les facteurs de transcriptions endogènes (tel que NLRC5) et les stimuli extracellulaires (tel que les IFNs).



**Figure 4-7 Séquences régulatrices dans le promoteur proximal du gène CMH I et CMH II.** Schéma illustrant les facteurs et les séquences régulatrices cis régulant l'expression des gènes du CMH I et CMH II. Adapté et reproduit avec la permission de Kobayashi et al<sup>402</sup>.

### 4.3.2 Impact de l'expression du CMH I sur la tolérance centrale

Nos données dévoilent un rôle crucial de l'IFN- $\lambda$  dans l'amplification de l'expression du CMH I à la surface des TECs. Nous avons montré que l'absence de la voie de l'IFN- $\lambda$  aboutit à la manifestation de l'auto-immunité chez les souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>. Supposer que l'auto-immunité observée chez les souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> est causée par une perturbation de la réponse immunitaire en périphérie est toutefois légitime. De ce fait, il serait pertinent de transplanter le thymus des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> dans la capsule rénale des souris *nude* athymique et d'analyser par la suite les marqueurs immunologiques liés au développement de l'auto-immunité chez les souris receveuses. En effet, cette approche confirmera que le développement de l'auto-immunité est dû à la perturbation de la tolérance centrale à cause de l'absence d'IFN- $\lambda$  dans le thymus. Dans des travaux futurs, il serait important d'explorer l'impact de la réduction de l'expression du CMH I à la surface des TECs sur l'éducation des cellules T CD8<sup>+</sup>. Pour ce faire, nous proposons d'effectuer un transfert adoptif des cellules T CD8<sup>+</sup> récoltées des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> à des souris irradiées B6.Rag2<sup>-/-</sup> (souris totalement dépourvue des lymphocytes) et de réaliser par la suite une analyse des marqueurs liés à l'auto-immunité chez les souris receveuses. De plus, nous proposons d'effectuer un séquençage de TCR chez les souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> afin d'étudier l'effet de la voie de l'IFN- $\lambda$  sur le répertoire des cellules T. Il serait aussi intéressant d'utiliser le *single cell RNA-seq* sur les APCs thymiques des souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup>. Cette approche nous apportera les informations requises pour vérifier si la voie d'IFN- $\lambda$  est impliquée dans d'autres mécanismes moléculaires autres que l'amplification de l'expression du CMH I sur les TECs.

Nous tenons à souligner que l'absence de l'IFN- $\lambda$  induit une réduction modérée de l'expression du CMH I à la surface des TECs (environ 30% comparé aux *Wild type*). Nous pensons que les résultats obtenus avec les souris *Ifnlr1*<sup>-/-</sup> sous-estiment les conséquences de la diminution de l'expression du CMH I sur la tolérance centrale. De ce fait, nous proposons d'utiliser des souris doublement déficientes en *Ifnlr1* et *Nlrc5* dans des travaux futurs.

Les études de Bassani-Sternberg et al., soulignent que l'expression élevée du CMH I corrèle avec la diversité des peptides présentés à la surface<sup>403</sup>. Comparativement aux ECs extrathymiques, nous avons démontré que les TECs expriment entre 10 à 100 fois plus des molécules du CMH I ce qui suggère que les TECs présentent à la surface un répertoire peptidique plus diversifié. Étant donné que l'infection virale affecte jusqu'à 60% la composition de l'immunopeptidome du soi<sup>404</sup>, nous pensons que l'amplification de l'expression du CMH I par l'IFN- $\lambda$  dans les TECs, vise à maintenir une tolérance immunitaire contre les antigènes produits durant la réponse inflammatoire lors d'infection virale.

Dans le chapitre 3, nos résultats démontrent que les APCs thymiques expriment environ 93% des gènes qui sont transcrits chez les ECs extrathymiques. Cependant, nous avons révélé l'existence d'une fraction des gènes (de 6 à 7%) exclusivement exprimés chez les ECs extrathymiques. Bien que nos données représentent la première tentative de caractérisation transcriptomique et immunopeptidomique des ECs extrathymiques et les APCs thymiques, il reste encore un bon nombre de points à explorer.

D'abord, l'expression des milliers de TRAs dans les mTECs se distingue par son aspect en mosaïque. Un seul TRA est exprimé uniquement par 1- 3% des mTECs à un moment donné<sup>405</sup>. Par conséquent, nous pensons que le recours au *bulk RNA-seq* ne permet pas la détection des transcrits dans chaque sous-population de mTECs ce qui pourrait surévaluer le nombre des transcrits exclusifs aux ECs extrathymiques rapportés dans notre analyse. Le *single cell RNA-seq* serait alors une approche plus pertinente à adapter pour comparer le transcriptome des APCs thymiques à celui des ECs extrathymiques.

En outre, la contribution d'autres cellules stromales thymiques dans la tolérance centrale a été négligé dans notre analyse. Dans une revue exhaustive de la littérature, Elise R. Breed et al., ont surligné l'implication des cellules B thymiques dans la tolérance centrale. Grâce à leur localisation dans la région médullaire et la jonction cortico-médullaire, les cellules B thymiques jouent un rôle

important dans le développement des  $T_{reg}$  et la délétion des cellules T auto-réactives<sup>322</sup>. De même, Takeshi Nitta et al., ont montré récemment que les fibroblastes thymiques jouent un rôle crucial dans l'établissement de la tolérance centrale en produisant des auto-antigènes uniques nécessaires pour l'éducation des cellules T<sup>406</sup>. Dans l'ensemble, nous pensons qu'il serait pertinent d'inclure, en plus des mTEC et tDCs, les données des cellules B et les fibroblastes thymiques pour les perspectives de recherche des antigènes spécifiques aux ECs extrathymiques.

D'autre part, nos données révèlent que les gènes exprimés exclusivement dans les ECs extrathymiques sont capables de générer des MAPs (de 8 à 22 MAPs) dans leurs tissus correspondants. Il est important de noter que notre analyse a été réalisée dans des conditions non inflammatoires. En plus de moduler la composition de l'immunopeptidome du soi, l'infection virale induit aussi une augmentation des molécules du CMH I<sup>404</sup>. Il serait alors pertinent d'étudier l'impact de l'inflammation sur la fraction des MAPs générées par les transcrits exclusivement exprimés chez les ECs extrathymiques.

Étant donné que ces MAPs sont générés par les transcrits qui ne sont pas détectés dans les cellules induisant la tolérance centrale, cela soulève la question de savoir si ces MAPs sont capables d'induire une réaction immunitaire. Pour évaluer leur immunogénicité, nous proposons d'immuniser des souris B6 avec les DCs autologues pulsés avec des peptides synthétiques dérivés des MAPs uniques aux ECs extrathymiques. Par la suite, nous proposons d'évaluer les marqueurs immunologiques liés au développement de l'auto-immunité chez les souris receveuses. De plus, il serait pertinent de détecter et quantifier les cellules T spécifiques à ces MAPs avec le recours d'un protocole d'enrichissement basé sur la technologie des tétramères. Le marquage avec les tétramères pourrait ensuite être associé à des tests immunitaires fonctionnels comme l'ELISpot.

Par ailleurs, nos résultats révèlent l'existence des MAPs qui ne sont pas détectés chez les mTECs, mais sont partagés exclusivement entre ECs extrathymiques et les tDCs (Figure 3-6; C). Cependant, il n'y a aucune preuve concrète qui montre que les tDCs sont capables d'exprimer des TRAs qui ne sont ni acquis des mTECs ou capturés en périphérie. Ainsi, nous pensons qu'il serait intéressant d'évaluer l'immunogénicité de ces MAPs en utilisant la stratégie décrite ci-dessus. Dans une première caractérisation du répertoire peptidique présenté dans le thymus humain, Eleni Adamopou et al., ont démontré que les tDCs sont capables de présenter exclusivement plusieurs auto-antigènes liés aux maladies auto-immunes<sup>407</sup>. De même, nous proposons aussi d'évaluer

l'immunogénicité des MAPs partagées exclusivement par les ECs extrathymiques et les mTECs, mais pas les tDCs. Les résultats qui découleront de cette analyse représenteraient la première comparaison directe du potentiel des mTEC et tDCs dans l'établissement de la tolérance centrale.

D'autre part, pour vérifier si les transcrits uniques aux ECs extrathymiques ou partagés avec les APCs thymiques sont capables de produire des MAPs, nous avons utilisé les données d'immunopeptidome murin générées par Heiko Schuster et al. Il est important de noter que ces données ont été obtenues en analysant l'intégralité des tissus par spectrométrie de masse<sup>408</sup>. Nous sommes, cependant, convaincus que les cellules résidentes dans le tissu analysé, autre que les ECs (telles que les macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles...), entravent la détection des MAPs produits par les transcrits exclusifs aux ECs extrathymiques. Ces limites ont été minutieusement discutées dans une revue de littérature récente écrite par Nikolai Slavov. En effet, l'auteur préconise l'utilisation du *Single Cell Proteomics by mass spectrometry (SCoPE-MS)* qui permet de quantifier efficacement un large répertoire des protéines dans une seule cellule donnée<sup>409</sup>. Le recours à cette technique serait pertinent dans le cadre de notre étude.

## Références bibliographiques

1. Hashimoto K, Okamura K, Yamaguchi H, Ototake M, Nakanishi T, Kurosaiva Y. Conservation and diversification of MHC class I and its related molecules in vertebrates. *Immunological reviews*. 1999;167(1):81-100.
2. Boegel S, Löwer M, Bukur T, Sorn P, Castle JC, Sahin U. HLA and proteasome expression body map. *BMC Medical Genomics*. 2018;11(1):1-12.
3. Lampson LA. Interpreting MHC class I expression and class I/class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings. *Microscopy research and technique*. 1995;32(4):267-85.
4. Stuart PM. Major histocompatibility complex (MHC): mouse. eLS. 2010.
5. Bjorkman PJ. Structure of Classical Class I MHC Molecules. 2016.
6. Liu J, Gao GF. Major histocompatibility complex: Interaction with peptides. eLS. 2011.
7. Anjanappa R, Garcia-Alai M, Kopicki J-D, Lockhauserbäumer J, Aboelmagd M, Hinrichs J, et al. Structures of peptide-free and partially loaded MHC class I molecules reveal mechanisms of peptide selection. *Nature communications*. 2020;11(1):1-11.
8. Maffei A, Harris PE. Peptides bound to major histocompatibility complex molecules. *Peptides*. 1998;19(1):179-98.
9. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000;404(6779):770-4.
10. Yewdell J. To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Molecular immunology*. 2002;39(3-4):139-46.
11. Schild H, Rammensee H-G. Perfect use of imperfection. *Nature*. 2000;404(6779):709-10.
12. Croft NP, Smith SA, Wong YC, Tan CT, Dudek NL, Flesch IE, et al. Kinetics of antigen expression and epitope presentation during virus infection. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e1003129.
13. Fortier M-H, Caron E, Hardy M-P, Voisin G, Lemieux S, Perreault C, et al. The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(3):595-610.
14. Granados DP, Yahyaoui W, Laumont CM, Daouda T, Muratore-Schroeder TL, Côté C, et al. MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012;119(26):e181-e91.
15. Floor SN, Doudna JA. Tunable protein synthesis by transcript isoforms in human cells. *Elife*. 2016;5:e10921.
16. Ingolia NT, Brar GA, Stern-Ginossar N, Harris MS, Talhouarne GJ, Jackson SE, et al. Ribosome profiling reveals pervasive translation outside of annotated protein-coding genes. *Cell reports*. 2014;8(5):1365-79.
17. Cardinaud S, Moris A, Février M, Rohrlich P-S, Weiss L, Langlade-Demoyen P, et al. Identification of cryptic MHC I-restricted epitopes encoded by HIV-1 alternative reading frames. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(8):1053-63.
18. Mayrand S-M, Schwarz DA, Green WR. An alternative translational reading frame encodes an immunodominant retroviral CTL determinant expressed by an immunodeficiency-causing retrovirus. *The Journal of Immunology*. 1998;160(1):39-50.
19. Shastri N, Schwab S, Serwold T. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annual review of immunology*. 2002;20(1):463-93.
20. Vanderperre B, Lucier J-F, Bissonnette C, Motard J, Tremblay G, Vanderperre S, et al. Direct detection of alternative open reading frames translation products in human significantly expands the proteome. *PloS one*. 2013;8(8):e70698.

21. Schwab SR, Li KC, Kang C, Shastri N. Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules. *Science*. 2003;301(5638):1367-71.
22. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*. 2021;12:469.
23. de Macario EC, Macario A. *Proteases in the Eukaryotic Cell Cytosol*. 2007.
24. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1997;386(6624):463-71.
25. Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes: implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(6):3363-71.
26. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994;78(5):761-71.
27. Schwarz K, de Giuli R, Schmidtke G, Kostka S, van den Broek M, Kim KB, et al. The selective proteasome inhibitors lactacystin and epoxomicin can be used to either up-or down-regulate antigen presentation at nontoxic doses. *The Journal of Immunology*. 2000;164(12):6147-57.
28. Groettrup M, Soza A, Kuckelkorn U, Kloetzel P-M. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunology today*. 1996;17(9):429-35.
29. Heink S, Ludwig D, Kloetzel P-M, Krüger E. IFN- $\gamma$ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(26):9241-6.
30. Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. A third interferon- $\gamma$ -induced subunit exchange in the 20S proteasome. *European journal of immunology*. 1996;26(4):863-9.
31. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL.  $\gamma$ -Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*. 1993;365(6443):264-7.
32. St-Pierre C, Morgand E, Benhammadi M, Rouette A, Hardy M-P, Gaboury L, et al. Immunoproteasomes control the homeostasis of medullary thymic epithelial cells by alleviating proteotoxic stress. *Cell reports*. 2017;21(9):2558-70.
33. Nandi D, Jiang H, Monaco JJ. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN- $\gamma$ -inducible proteasome subunit. *The Journal of Immunology*. 1996;156(7):2361-4.
34. Takahama Y, Ohigashi I, Murata S, Tanaka K. Thymoproteasome and peptidic self. *Immunogenetics*. 2019;71(3):217-21.
35. Craiu A, Akopian T, Goldberg A, Rock KL. Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(20):10850-5.
36. Hammer GE, Kanaseki T, Shastri N. The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity*. 2007;26(4):397-406.
37. Benham AM, Grommé M, Neefjes J. Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading. *The Journal of Immunology*. 1998;161(1):83-9.
38. Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, et al. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science*. 1999;283(5404):978-81.

39. Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, Paschen A, et al. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nature immunology*. 2011;12(1):45-53.
40. Khammari A, Labarrière N, Vignard V, Nguyen J-M, Pandolfino M-C, Knol AC, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous Melan-A/MART-1-specific cytotoxic T lymphocyte clones. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(12):2835-42.
41. Kawahara M, York IA, Hearn A, Farfan D, Rock KL. Analysis of the role of tripeptidyl peptidase II in MHC class I antigen presentation in vivo. *The Journal of Immunology*. 2009;183(10):6069-77.
42. Saric T, Chang S-C, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, et al. An IFN- $\gamma$ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature immunology*. 2002;3(12):1169-76.
43. Paladini F, Fiorillo MT, Tedeschi V, Mattorre B, Sorrentino R. The multifaceted nature of aminopeptidases ERAP1, ERAP2, and LNPEP: from evolution to disease. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1576.
44. York IA, Brehm MA, Zendzian S, Towne CF, Rock KL. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(24):9202-7.
45. Saulle I, Vicentini C, Clerici M, Biasin M. An overview on ERAP roles in infectious diseases. *Cells*. 2020;9(3):720.
46. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime reports*. 2015;7.
47. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology*. 2004;11(10):918-26.
48. Arora S, Lapinski PE, Raghavan M. Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(13):7241-6.
49. Momburg F, Roelse J, Hämmerling GJ, Neefjes JJ. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(5):1613-23.
50. Momburg F, Hämmerling GJ. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Advances in immunology*. 1998;68:191-256.
51. Diedrich G, Bangia N, Pan M, Cresswell P. A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Immunology*. 2001;166(3):1703-9.
52. Morrice NA, Powis SJ. A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Current biology*. 1998;8(12):713-6.
53. Hughes EA, Cresswell P. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Current biology*. 1998;8(12):709-13.
54. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*. 1996;5(2):103-14.
55. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*. 1997;277(5330):1306-9.



56. Momburg F, Tan P. Tapasin—the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Molecular immunology*. 2002;39(3-4):217-33.
57. Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/β 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature*. 1994;368(6474):864-7.
58. Hammond C, Braakman I, Helenius A. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(3):913-7.
59. Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, High S. ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(8):2573-82.
60. Degen E, Cohen-Doyle MF, Williams DB. Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta 2-microglobulin and peptide. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(6):1653-61.
61. Wada I, Imai S-i, Kai M, Sakane F, Kanoh H. Chaperone Function of Calreticulin When Expressed in the Endoplasmic Reticulum as the Membrane-anchored and Soluble Forms (\*). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(35):20298-304.
62. Lehner PJ, Surman MJ, Cresswell P. Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line. *Immunity*. 1998;8(2):221-31.
63. Grandea III AG, Lehner PJ, Cresswell P, Spies T. Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics*. 1997;46(6):477-83.
64. Williams AP, Peh CA, Purcell AW, McCluskey J, Elliott T. Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity*. 2002;16(4):509-20.
65. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of experimental medicine*. 1976;143(5):1283-8.
66. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. 1976. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2010;185(3):1361-6.
67. Barrio MM, Abes R, Colombo M, Pizzurro G, Boix C, Roberti MP, et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8+ T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PloS one*. 2012;7(7):e40311.
68. Leirião P, del Fresno C, Ardavin C. Monocytes as effector cells: Activated L y-6 C high mouse monocytes migrate to the lymph nodes through the lymph and cross-present antigens to CD 8+ T cells. *European journal of immunology*. 2012;42(8):2042-51.
69. Milo I, Sapoznikov A, Kalchenko V, Tal O, Krauthgamer R, van Rooijen N, et al. Dynamic imaging reveals promiscuous crosspresentation of blood-borne antigens to naive CD8+ T cells in the bone marrow. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;122(2):193-208.
70. Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, et al. Cross-presentation of cell-associated antigens by MHC class I in dendritic cell subsets. *Frontiers in immunology*. 2015;6:363.
71. Guillelliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*. 2014;14(8):571-8.

72. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sørensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nature immunology*. 2008;9(5):551-7.
73. Sheng J, Chen Q, Soncin I, Ng SL, Karjalainen K, Ruedl C. A discrete subset of monocyte-derived cells among typical conventional type 2 dendritic cells can efficiently cross-present. *Cell reports*. 2017;21(5):1203-14.
74. Pooley JL, Heath WR, Shortman K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8<sup>-</sup> dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2001;166(9):5327-30.
75. Becker M, Güttler S, Bachem A, Hartung E, Mora A, Jäkel A, et al. Ontogenic, phenotypic, and functional characterization of XCR1<sup>+</sup> dendritic cells leads to a consistent classification of intestinal dendritic cells based on the expression of XCR1 and SIRP $\alpha$ . *Frontiers in immunology*. 2014;5:326.
76. Cerovic V, Houston S, Westlund J, Utraiainen L, Davison E, Scott CL, et al. Lymph-borne CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8<sup>+</sup> T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal immunology*. 2015;8(1):38-48.
77. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Nature immunology*. 2009;10(5):488-95.
78. Kitano M, Yamazaki C, Takumi A, Ikeno T, Hemmi H, Takahashi N, et al. Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(4):1044-9.
79. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2006;126(1):205-18.
80. Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, et al. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *Immunity*. 2009;30(4):544-55.
81. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*. 2007;315(5808):107-11.
82. Hanč P, Fujii T, Iborra S, Yamada Y, Huotari J, Schulz O, et al. Structure of the complex of F-actin and DNGR-1, a C-type lectin receptor involved in dendritic cell cross-presentation of dead cell-associated antigens. *Immunity*. 2015;42(5):839-49.
83. Segura E, Villadangos JA. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic*. 2011;12(12):1677-85.
84. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity*. 2004;21(2):155-65.
85. Kovacsovic-Bankowski M, Rock K. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. 1995;267(5195):243-6.
86. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(22):12889-94.
87. Palmowski MJ, Gileadi U, Salio M, Gallimore A, Millrain M, James E, et al. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *The Journal of Immunology*. 2006;177(2):983-90.

88. Cebrian I, Visentin G, Blanchard N, Jouve M, Bobard A, Moita C, et al. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2011;147(6):1355-68.
89. Accapezzato D, Visco V, Francavilla V, Molette C, Donato T, Paroli M, et al. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(6):817-28.
90. Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature*. 1993;361(6410):359-62.
91. Liu T, Chambers B, Diehl AD, Van Kaer L, Jondal M, Ljunggren H-G. TAP peptide transporter-independent presentation of heat-killed Sendai virus antigen on MHC class I molecules by splenic antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*. 1997;159(11):5364-71.
92. Campbell DJ, Serwold T, Shastri N. Bacterial proteins can be processed by macrophages in a transporter associated with antigen processing-independent, cysteine protease-dependent manner for presentation by MHC class I molecules. *The Journal of Immunology*. 2000;164(1):168-75.
93. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, et al. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*. 2006;177(6):3525-33.
94. Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell*. 1993;75(1):135-46.
95. Gobin SJ, van Zutphen M, Westerheide SD, Boss JM, van den Elsen PJ. The MHC-specific enhanceosome and its role in MHC class I and  $\beta$ 2-microglobulin gene transactivation. *The Journal of Immunology*. 2001;167(9):5175-84.
96. Gobin SJ, Peijnenburg A, Keijsers V, van den Elsen PJ. Site  $\alpha$  is crucial for two routes of IFN $\gamma$ -induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving CIITA. *Immunity*. 1997;6(5):601-11.
97. Chang C-H, Guerder S, Hong S-C, van Ewijk W, Flavell RA. Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity*. 1996;4(2):167-78.
98. Williams GS, Malin M, Vremec D, Chang C-H, Boyd R, Benoist C, et al. Mice lacking the transcription factor CIITA--a second look. *International immunology*. 1998;10(12):1957-67.
99. Robbins GR, Truax AD, Davis BK, Zhang L, Brickey WJ, Ting JP-Y. Regulation of class I major histocompatibility complex (MHC) by nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(29):24294-303.
100. Noronha N, Ehx G, Meunier MC, Laverdure JP, Thériault C, Perreault C. Major multilevel molecular divergence between THP-1 cells from different biorepositories. *International Journal of Cancer*. 2020;147(7):2000-6.
101. Meunier E, Broz P. Evolutionary convergence and divergence in NLR function and structure. *Trends in immunology*. 2017;38(10):744-57.
102. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *cell*. 2010;140(6):821-32.
103. Staehli F, Ludigs K, Heinz LX, Seguí-Estévez Q, Ferrero I, Braun M, et al. NLRC5 deficiency selectively impairs MHC class I-dependent lymphocyte killing by cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology*. 2012;188(8):3820-8.

104. Biswas A, Meissner TB, Kawai T, Kobayashi KS. Cutting edge: impaired MHC class I expression in mice deficient for Nlrp5/class I transactivator. *The Journal of Immunology*. 2012;189(2):516-20.
105. Yao Y, Wang Y, Chen F, Huang Y, Zhu S, Leng Q, et al. NLRC5 regulates MHC class I antigen presentation in host defense against intracellular pathogens. *Cell research*. 2012;22(5):836-47.
106. Neerinx A, Rodriguez GM, Steimle V, Kufer TA. NLRC5 controls basal MHC class I gene expression in an MHC enhanceosome-dependent manner. *The Journal of Immunology*. 2012;188(10):4940-50.
107. Meissner TB, Li A, Biswas A, Lee K-H, Liu Y-J, Bayir E, et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(31):13794-9.
108. Ludigs K, Seguin-Estevez Q, Lemeille S, Ferrero I, Rota G, Chelbi S, et al. NLRC5 exclusively transactivates MHC class I and related genes through a distinctive SXY module. *PLoS genetics*. 2015;11(3):e1005088.
109. Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Zufferey M, Steimle V, Reith W. CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes & development*. 2000;14(9):1156-66.
110. Moreno CS, Emery P, West JE, Durand B, Reith W, Mach B, et al. Purified X2 binding protein (X2BP) cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in the bare lymphocyte syndrome. *The Journal of Immunology*. 1995;155(9):4313-21.
111. Jabrane-Ferrat N, Nekrep N, Tosi G, Esserman L, Peterlin BM. MHC class II enhanceosome: how is the class II transactivator recruited to DNA-bound activators? *International immunology*. 2003;15(4):467-75.
112. Meissner TB, Liu Y-J, Lee K-H, Li A, Biswas A, van Eggermond MC, et al. NLRC5 cooperates with the RFX transcription factor complex to induce MHC class I gene expression. *The Journal of Immunology*. 2012;188(10):4951-8.
113. Van Den Elsen PJ. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Frontiers in immunology*. 2011;2:48.
114. Tong Y, Cui J, Li Q, Zou J, Wang HY, Wang R-F. Enhanced TLR-induced NF- $\kappa$ B signaling and type I interferon responses in NLRC5 deficient mice. *Cell research*. 2012;22(5):822-35.
115. Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 1957;147(927):268-73.
116. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 1957;147(927):258-67.
117. Duerr CU, Fritz JH. Immunoregulatory Mechanisms of Interferon. *Frontiers in immunology*. 2020;11:187.
118. Majoros A, Platanitis E, Kernbauer-Hölzl E, Rosebrock F, Müller M, Decker T. Canonical and non-canonical aspects of JAK-STAT signaling: lessons from interferons for cytokine responses. *Frontiers in immunology*. 2017;8:29.
119. Finter NB. Interferons and interferon inducers. *Interferons and interferon inducers*. 1973.
120. Wheelock EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*. 1965;149(3681):310-1.

121. Freshman MM, Merigan TC, Remington JS, Brownlee IE. In vitro and in vivo antiviral action of an interferon-like substance induced by *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1966;123(3):862-6.
122. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature immunology*. 2003;4(1):63-8.
123. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology*. 2003;4(1):69-77.
124. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews*. 2004;202(1):8-32.
125. Lutfalla G, Holland S, Cinato E, Monneron D, Reboul J, Rogers N, et al. Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *The EMBO journal*. 1995;14(20):5100-8.
126. Cohen B, Novick D, Barak S, Rubinstein M. Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(8):4208-14.
127. Gazziola C, Cordani N, Carta S, De Lorenzo E, Colombatti A, Perris R. The relative endogenous expression levels of the IFNAR2 isoforms influence the cytostatic and pro-apoptotic effect of IFN $\alpha$  on pleomorphic sarcoma cells. *International journal of oncology*. 2005;26(1):129-40.
128. Hardy MP, Owczarek CM, Trajanovska S, Liu X, Kola I, Hertzog PJ. The soluble murine type I interferon receptor Ifnar-2 is present in serum, is independently regulated, and has both agonistic and antagonistic properties. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2001;97(2):473-82.
129. Lewerenz M, Mogensen KE, Uzé G. Shared receptor components but distinct complexes for  $\alpha$  and  $\beta$  interferons. *Journal of molecular biology*. 1998;282(3):585-99.
130. Runkel L, Pfeffer L, Lewerenz M, Monneron D, Yang CH, Murti A, et al. Differences in activity between  $\alpha$  and  $\beta$  type I interferons explored by mutational analysis. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(14):8003-8.
131. Russell-Harde D, Wagner TC, Perez HD, Croze E. Formation of a uniquely stable type I interferon receptor complex by interferon  $\beta$  is dependent upon particular interactions between interferon  $\beta$  and its receptor and independent of tyrosine phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;255(2):539-44.
132. Jaitin DA, Roisman LC, Jaks E, Gavutis M, Piehler J, Van der Heyden J, et al. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN- $\alpha$ 2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN- $\beta$ . *Molecular and cellular biology*. 2006;26(5):1888-97.
133. Wesoly J, Szweykowska-Kulinska Z, Bluysen HA. STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses. *Acta biochimica Polonica*. 2007;54(1):27-38.
134. Krause CD, Lavnikova N, Xie J, Mei E, Mirochnitchenko OV, Jia Y, et al. Preassembly and ligand-induced restructuring of the chains of the IFN- $\gamma$  receptor complex: the roles of Jak kinases, Stat1 and the receptor chains. *Cell research*. 2006;16(1):55-69.
135. Pestka S, Kotenko SV, Muthukumaran G, Izotova LS, Cook JR, Garotta G. The interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine & growth factor reviews*. 1997;8(3):189-206.
136. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN $\gamma$  receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual review of immunology*. 1997;15(1):563-91.

137. Levy DE, Darnell J. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(9):651-62.
138. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nature genetics*. 2013;45(2):164-71.
139. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:929-79.
140. Kotenko SV, Langer JA. Full house: 12 receptors for 27 cytokines. *International immunopharmacology*. 2004;4(5):593-608.
141. Zhou Z, Hamming OJ, Ank N, Paludan SR, Nielsen AL, Hartmann R. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *Journal of virology*. 2007;81(14):7749-58.
142. Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *Journal of virology*. 2006;80(9):4501-9.
143. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *Journal of virology*. 2005;79(6):3851-4.
144. Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2011;31(1):79-87.
145. Haller O, Stertz S, Kochs G. The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes and infection*. 2007;9(14-15):1636-43.
146. Gao S, Von Der Malsburg A, Dick A, Faelber K, Schröder GF, Haller O, et al. Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra-and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. *Immunity*. 2011;35(4):514-25.
147. Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Vlotides G, et al. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2', 5'-OAS and MxA induced by the novel interferon- $\lambda$ s IL-28A and IL-29. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;331(2):543-8.
148. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst SrT, Otte J-M, et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(5):G960-G8.
149. Huang J, Smirnov SV, Lewis-Antes A, Balan M, Li W, Tang S, et al. Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(23):9822-7.
150. Zanoni I, Granucci F, Broggi A. Interferon (IFN)- $\lambda$  takes the helm: immunomodulatory roles of type III IFNs. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1661.
151. Hemann EA, Gale Jr M, Savan R. Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1707.
152. Spann KM, Tran K-C, Chi B, Rabin RL, Collins PL. Suppression of the induction of alpha, beta, and gamma interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *Journal of virology*. 2004;78(8):4363-9.
153. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and  $\lambda$  interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology*. 2004;34(3):796-805.

154. Osterlund P, Veckman V, Sirén J, Klucher KM, Hiscott J, Matikainen S, et al. Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells. *Journal of virology*. 2005;79(15):9608-17.
155. Sirén J, Pirhonen J, Julkunen I, Matikainen S. IFN- $\alpha$  regulates TLR-dependent gene expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-28, and IL-29. *The Journal of Immunology*. 2005;174(4):1932-7.
156. Tissari J, Sirén J, Meri S, Julkunen I, Matikainen S. IFN- $\alpha$  enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *The Journal of Immunology*. 2005;174(7):4289-94.
157. Maher SG, Sheikh F, Scarzello AJ, Romero-Weaver AL, Baker DP, Donnelly RP, et al. IFN- $\alpha$  and IFN- $\lambda$  differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity. *Cancer biology & therapy*. 2008;7(7):1109-15.
158. Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld J-C. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon- $\lambda$ 1: similarities with type I interferon signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(31):32269-74.
159. De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Type I interferons. *International reviews of immunology*. 1998;17(1-4):53-73.
160. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002;13(2):119-34.
161. Lasfar A, Lewis-Antes A, Smirnov SV, Anantha S, Abushahba W, Tian B, et al. Characterization of the mouse IFN- $\lambda$  ligand-receptor system: IFN- $\lambda$ s exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer research*. 2006;66(8):4468-77.
162. Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN- $\lambda$  in murine tumor models. *The Journal of Immunology*. 2006;176(12):7686-94.
163. Numasaki M, Tagawa M, Iwata F, Suzuki T, Nakamura A, Okada M, et al. IL-28 elicits antitumor responses against murine fibrosarcoma. *The Journal of Immunology*. 2007;178(8):5086-98.
164. Abushahba W, Balan M, Castaneda I, Yuan Y, Reuhl K, Raveche E, et al. Antitumor activity of type I and type III interferons in BNL hepatoma model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2010;59(7):1059-71.
165. Andreakos E, Tsiodras S. COVID-19: lambda interferon against viral load and hyperinflammation. *EMBO molecular medicine*. 2020;12(6):e12465.
166. Feld JJ, Kandel C, Biondi MJ, Kozak RA, Zahoor MA, Lemieux C, et al. Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2021;9(5):498-510.
167. Van Laethem F, Saba I, Tikhonova AN, Singer A. Rôle crucial des corécepteurs CD4 et CD8 dans la reconnaissance antigénique des lymphocytes T $\alpha\beta$ . *médecine/sciences*. 2014;30(5):511-3.
168. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:419-66.
169. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395-402.
170. Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nature immunology*. 2012;13(2):121-8.
171. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology*. 2009;28:445-89.

172. Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and their functional regulation. *Cellular & molecular immunology*. 2015;12(5):558-65.
173. Kuka M, De Giovanni M, Iannacone M. The role of type I interferons in CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. *Immunology letters*. 2019;215:19-23.
174. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nature immunology*. 2003;4(4):355-60.
175. O'Connell J. Fas ligand and the fate of antitumour cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*. 2002;105(3):263.
176. Laurent J, Bosco N, Marche PN, Ceredig R. New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes. *International immunology*. 2004;16(8):1069-80.
177. Von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor  $\alpha$ -chain: not just a surrogate. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(7):571-7.
178. Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C, von Boehmer H. Crucial role of the pre-T-cell receptor  $\alpha$  gene in development of  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T cells. *Nature*. 1995;375(6534):795-8.
179. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(12):833-44.
180. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(10):772-82.
181. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*. 2014;14(6):377-91.
182. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S-i, Hayashi H, Takahama Y, et al. Regulation of CD8<sup>+</sup> T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*. 2007;316(5829):1349-53.
183. He X, He X, Dave VP, Zhang Y, Hua X, Nicolas E, et al. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*. 2005;433(7028):826-33.
184. Wang L, Wildt KF, Zhu J, Zhang X, Feigenbaum L, Tessarollo L, et al. Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature immunology*. 2008;9(10):1122-30.
185. Zamisch M, Tian L, Grenningloh R, Xiong Y, Wildt KF, Ehlers M, et al. The transcription factor Ets1 is important for CD4 repression and Runx3 up-regulation during CD8 T cell differentiation in the thymus. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(12):2685-99.
186. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987;49(2):273-80.
187. Kisielow P, Blüthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, Von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4<sup>+</sup> 8<sup>+</sup> thymocytes. *Nature*. 1988;333(6175):742-6.
188. William CS, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature*. 1988;336(6194):73-6.
189. Baldwin TA, Sandau MM, Jameson SC, Hogquist KA. The timing of TCR $\alpha$  expression critically influences T cell development and selection. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(1):111-21.
190. Egawa T, Kreslavsky T, Littman DR, Von Boehmer H. Lineage diversion of T cell receptor transgenic thymocytes revealed by lineage fate mapping. *PloS one*. 2008;3(1):e1512.
191. Breed ER, Watanabe M, Hogquist KA. Measuring thymic clonal deletion at the population level. *The Journal of Immunology*. 2019;202(11):3226-33.



192. Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, et al. CCR7 signals are essential for cortex–medulla migration of developing thymocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(4):493-505.
193. Kwan J, Killeen N. CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *The Journal of Immunology*. 2004;172(7):3999-4007.
194. Anderson MS, Su MA. Aire and T cell development. *Current opinion in immunology*. 2011;23(2):198-206.
195. Derbinski J, Gäbler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenbahn M, et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(1):33-45.
196. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, et al. Fezf2 orchestrates a thymic program of self-antigen expression for immune tolerance. *Cell*. 2015;163(4):975-87.
197. Tomofuji Y, Takaba H, Suzuki HI, Benlaribi R, Martinez CDP, Abe Y, et al. Chd4 choreographs self-antigen expression for central immune tolerance. *Nature Immunology*. 2020;21(8):892-901.
198. Gäbler J, Arnold J, Kyewski B. Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *European journal of immunology*. 2007;37(12):3363-72.
199. Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(8):1039-49.
200. Schlitzer A, Sivakamasundari V, Chen J, Sumatoh HRB, Schreuder J, Lum J, et al. Identification of cDC1-and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nature immunology*. 2015;16(7):718-28.
201. Li J, Park J, Foss D, Goldschneider I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(3):607-22.
202. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009;324(5925):392-7.
203. Cosway EJ, Ohigashi I, Schauble K, Parnell SM, Jenkinson WE, Luther S, et al. Formation of the intrathymic dendritic cell pool requires CCL21-mediated recruitment of CCR7+ progenitors to the thymus. *The Journal of Immunology*. 2018;201(2):516-23.
204. Koble C, Kyewski B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(7):1505-13.
205. Aichinger M, Wu C, Nedjic J, Klein L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(2):287-300.
206. Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirpα+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *The Journal of Immunology*. 2009;183(5):3053-63.
207. Atibalentja DF, Byersdorfer CA, Unanue ER. Thymus-blood protein interactions are highly effective in negative selection and regulatory T cell induction. *The Journal of Immunology*. 2009;183(12):7909-18.
208. Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A, Pachynski R, et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*. 2012;36(3):438-50.
209. Oh J, Shin J-S. The role of dendritic cells in central tolerance. *Immune network*. 2015;15(3):111.

210. Zheng Y, Delgoffe GM, Meyer CF, Chan W, Powell JD. Anergic T cells are metabolically anergic. *The Journal of Immunology*. 2009;183(10):6095-101.
211. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
212. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
213. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology*. 2005;6(3):280-6.
214. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*. 1997;6(4):411-7.
215. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3(5):541-7.
216. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science*. 1995;270(5238):985-8.
217. Cohen PL, Eisenberg RA. *Lpr* and *gld*: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annual review of immunology*. 1991;9(1):243-69.
218. Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends in immunology*. 2004;25(11):610-5.
219. Pellegrini M, Belz G, Bouillet P, Strasser A. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(24):14175-80.
220. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang L-C, Coultas L, Puthalakath H, et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*. 2002;415(6874):922-6.
221. Rodríguez ÉG, Morán GAG. Are autoimmune diseases autoimmune epithelitis? *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]: El Rosario University Press; 2013.
222. Gordon J, Manley NR. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development*. 2011;138(18):3865-78.
223. Tumber T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*. 2004;303(5656):359-63.
224. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. 2014;14(3):141-53.
225. Kia'i N, Bajaj T. *Histology, respiratory epithelium*. 2019.
226. Cheng M, Anderson MS. Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. *Nature immunology*. 2018;19(7):659-64.
227. Cooper GS, Bynum ML, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal of autoimmunity*. 2009;33(3-4):197-207.
228. Nagata S. Apoptosis and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1209(1):10-6.
229. Vitali C, Del Papa N. Classification criteria for Sjögren's syndrome. *Sjögren's Syndrome*. 2016:47-60.

230. Cheng S-T, Nguyen TQ, Yang Y-S, Capra JD, Sontheimer RD. Calreticulin binds hYRNA and the 52-kDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen. *The journal of immunology*. 1996;156(11):4484-91.
231. Fouraux MA, Bouvet P, Verkaart S, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *Journal of molecular biology*. 2002;320(3):475-88.
232. Gordon S, Plüddemann A. Macrophage clearance of apoptotic cells: a critical assessment. *Frontiers in immunology*. 2018;9:127.
233. Pradhan V, Borse V, Ghosh K. PTPN22 gene polymorphisms in autoimmune diseases with special reference to systemic lupus erythematosus disease susceptibility. *Journal of postgraduate medicine*. 2010;56(3):239.
234. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS letters*. 2011;585(23):3689-98.
235. Bomsel M, Alfsen A. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(1):57-68.
236. Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunological reviews*. 2010;234(1):142-62.
237. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183(1):89-103.
238. Arango M-T, Shoenfeld Y, Cervera R, Anaya J-M. Infection and autoimmune diseases. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]: El Rosario University Press; 2013.
239. Moudgil KD, Sercarz EE. Crypticity of self antigenic determinants is the cornerstone of a theory of autoimmunity. *Discovery medicine*. 2009;5(28):378-82.
240. Moudgil KD, Sercarz EE. Understanding crypticity is the key to revealing the pathogenesis of autoimmunity. *Trends in immunology*. 2005;26(7):355-9.
241. La Gruta NL, Gras S, Daley SR, Thomas PG, Rossjohn J. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(7):467-78.
242. Granados DP, Laumont CM, Thibault P, Perreault C. The nature of self for T cells—a systems-level perspective. *Curr Opin Immunol*. 2015;34:1-8.
243. Caron E, Vincent K, Fortier MH, Laverdure JP, Bramouille A, Hardy MP, et al. The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol*. 2011;7:533.
244. Abramson J, Anderson G. Thymic Epithelial Cells. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:85-118.
245. Breed ER, Lee ST, Hogquist KA. Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;84:2-10.
246. Hufford MM, Kim TS, Sun J, Braciale TJ. The effector T cell response to influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:423-55.
247. Beura LK, Wijeyesinghe S, Thompson EA, Macchietto MG, Rosato PC, Pierson MJ, et al. T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity*. 2018;48(2):327-38 e5.
248. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:173-200.
249. Angelova M, Mlecnik B, Vasaturo A, Bindea G, Fredriksen T, Lafontaine L, et al. Evolution of Metastases in Space and Time under Immune Selection. *Cell*. 2018;175(3):751-65 e16.

250. Laumont CM, Vincent K, Hesnard L, Audemard E, Bonneil E, Laverdure JP, et al. Non-coding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci Transl Med*. 2018;10(470):eaau5516.
251. Boegel S, Lower M, Bukur T, Sorn P, Castle JC, Sahin U. HLA and proteasome expression body map. *BMC Med Genomics*. 2018;11(1):36.
252. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*. 1984;38(3):287-92.
253. Ramnath N, Tan D, Li Q, Hylander BL, Bogner P, Ryes L, et al. Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival? *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(8):891-9.
254. Agudo J, Park ES, Rose SA, Alibo E, Sweeney R, Dhainaut M, et al. Quiescent Tissue Stem Cells Evade Immune Surveillance. *Immunity*. 2018;48(2):271-85 e5.
255. Boegel S, Lower M, Bukur T, Sahin U, Castle JC. A catalog of HLA type, HLA expression, and neo-epitope candidates in human cancer cell lines. *Oncoimmunology*. 2014;3(8):e954893.
256. Garrido C, Paco L, Romero I, Berruguilla E, Stefansky J, Collado A, et al. MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion and intrinsic tumorigenicity of melanoma cells. *Carcinogenesis*. 2012;33(3):687-93.
257. Jongsma MLM, Guarda G, Spaapen RM. The regulatory network behind MHC class I expression. *Mol Immunol*. 2019;113:16-21.
258. Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(12):813-20.
259. Meissner TB, Li A, Biswas A, Lee KH, Liu YJ, Bayir E, et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(31):13794-9.
260. Biswas A, Meissner TB, Kawai T, Kobayashi KS. Cutting edge: impaired MHC class I expression in mice deficient for *Nlrc5*/class I transactivator. *J Immunol*. 2012;189(2):516-20.
261. Ludigs K, Seguin-Estevez Q, Lemeille S, Ferrero I, Rota G, Chelbi S, et al. NLRC5 exclusively transactivates MHC class I and related genes through a distinctive SXY module. *PLoS Genet*. 2015;11(3):e1005088.
262. Robbins GR, Truax AD, Davis BK, Zhang L, Brickey WJ, Ting JP. Regulation of class I major histocompatibility complex (MHC) by nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins. *J Biol Chem*. 2012;287(29):24294-303.
263. Staehli F, Ludigs K, Heinz LX, Seguin-Estevez Q, Ferrero I, Braun M, et al. NLRC5 deficiency selectively impairs MHC class I-dependent lymphocyte killing by cytotoxic T cells. *J Immunol*. 2012;188(8):3820-8.
264. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med*. 2006;203(5):1259-71.
265. Yarzabek B, Zaitouna AJ, Olson E, Silva GN, Geng J, Geretz A, et al. Variations in HLA-B cell surface expression, half-life and extracellular antigen receptivity. *Elife*. 2018;7:e34961.
266. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(5):375-86.
267. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse *Stat1* gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*. 1996;84(3):443-50.
268. Huang S-I, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, et al. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*. 1993;259(5102):1742-5.

269. Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science*. 1990;248(4960):1227-30.
270. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992;68(5):869-77.
271. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 2002;298(5597):1395-401.
272. Muller U, Steinhoff U, Reis L, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. 1994;264(5167):1918-21.
273. White JK, Gerdin A-K, Karp NA, Ryder E, Buljan M, Bussell JN, et al. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell*. 2013;154(2):452-64.
274. Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 2011;474(7351):337-42.
275. Bradley A, Anastassiadis K, Ayadi A, Battey JF, Bell C, Birling M-C, et al. The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mammalian genome*. 2012;23(9-10):580-6.
276. Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nature methods*. 2009;6(7):493.
277. Jain R, Gray DH. Isolation of thymic epithelial cells and analysis by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2014;107:3 26 1-15.
278. St-Pierre C, Morgand E, Benhammadi M, Rouette A, Hardy MP, Gaboury L, et al. Immunoproteasomes control the homeostasis of medullary thymic epithelial cells by alleviating proteotoxic stress. *Cell Reports*. 2017;21(9):2558-70.
279. Patenaude J, Perreault C. Thymic mesenchymal cells have a distinct transcriptomic profile. *The Journal of Immunology*. 2016;196(11):4760-70.
280. Li Z, Gothard E, Coles MC, Ambler CA. Quantitative Methods for Measuring Repair Rates and Innate-Immune Cell Responses in Wounded Mouse Skin. *Front Immunol*. 2018;9:347.
281. Graves CL, Harden SW, LaPato M, Nelson M, Amador B, Sorenson H, et al. A method for high purity intestinal epithelial cell culture from adult human and murine tissues for the investigation of innate immune function. *J Immunol Methods*. 2014;414:20-31.
282. Zeineldin M, Miller MA, Sullivan R, Neufeld KL. Nuclear adenomatous polyposis coli suppresses colitis-associated tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis*. 2014;35(8):1881-90.
283. Amaral EP, Ribeiro SC, Lanes VR, Almeida FM, de Andrade MR, Bomfim CC, et al. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathog*. 2014;10(7):e1004188.
284. Bertoncello I, McQualter J. Isolation and clonal assay of adult lung epithelial stem/progenitor cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2011;Chapter 2:Unit 2G 1.
285. Perfetto SP, Ambrozak D, Nguyen R, Chattopadhyay PK, Roederer M. Quality assurance for polychromatic flow cytometry using a suite of calibration beads. *Nat Protoc*. 2012;7(12):2067-79.
286. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20.
287. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.

288. St-Pierre C, Trofimov A, Brochu S, Lemieux S, Perreault C. Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. *J Immunol.* 2015;195(2):498-506.
289. Panter MS, Jain A, Leonhardt RM, Ha T, Cresswell P. Dynamics of major histocompatibility complex class I association with the human peptide-loading complex. *J Biol Chem.* 2012;287(37):31172-84.
290. Hulpke S, Tampe R. The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends Biochem Sci.* 2013;38(8):412-20.
291. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513-45.
292. Selvakumar TA, Bhushal S, Kalinke U, Wirth D, Hauser H, Koster M, et al. Identification of a Predominantly Interferon-lambda-Induced Transcriptional Profile in Murine Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1302.
293. Ye L, Schnepf D, Staeheli P. Interferon-lambda orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(10):614-25.
294. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity.* 2019;50(4):907-23.
295. Caine EA, Scheaffer SM, Arora N, Zaitsev K, Artyomov MN, Coyne CB, et al. Interferon lambda protects the female reproductive tract against Zika virus infection. *Nat Commun.* 2019;10(1):280.
296. Vijayan S, Sidiq T, Yousuf S, van den Elsen PJ, Kobayashi KS. Class I transactivator, NLRC5: a central player in the MHC class I pathway and cancer immune surveillance. *Immunogenetics.* 2019;71(3):273-82.
297. Sansom SN, Shikama-Dorn N, Zhanybekova S, Nusspaumer G, Macaulay IC, Deadman ME, et al. Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* 2014;24(12):1918-31.
298. Meredith M, Zemmour D, Mathis D, Benoist C. Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat Immunol.* 2015;16(9):942-9.
299. Inglesfield S, Cosway EJ, Jenkinson WE, Anderson G. Rethinking Thymic Tolerance: Lessons from Mice. *Trends Immunol.* 2019;40(4):279-91.
300. Breed ER, Watanabe M, Hogquist KA. Measuring Thymic Clonal Deletion at the Population Level. *J Immunol.* 2019;202(11):3226-33.
301. Dzhagalov IL, Chen KG, Herzmark P, Robey EA. Elimination of self-reactive T cells in the thymus: a timeline for negative selection. *PLoS biology.* 2013;11(5).
302. Xing Y, Wang X, Jameson SC, Hogquist KA. Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-kappaB and tonic type I interferon signaling. *Nat Immunol.* 2016;17(5):565-73.
303. Deng Q, Luo Y, Chang C, Wu H, Ding Y, Xiao R. The emerging epigenetic role of CD8+ T cells in autoimmune diseases: A systematic review. *Frontiers in immunology.* 2019;10:856.
304. Wiedeman AE, Muir VS, Rosasco MG, DeBerg HA, Presnell S, Haas B, et al. Autoreactive CD8+ T cell exhaustion distinguishes subjects with slow type 1 diabetes progression. *J Clin Invest.* 2020;130(1):480-90.
305. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Öhlén C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8+ T cells in a model for multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine.* 2001;194(5):669-76.

306. Valentine KM, Davini D, Lawrence TJ, Mullins GN, Manansala M, Al-Kuhlani M, et al. CD8 Follicular T Cells Promote B Cell Antibody Class Switch in Autoimmune Disease. *J Immunol.* 2018;201(1):31-40.
307. Yu D, Ye L. A Portrait of CXCR5(+) Follicular Cytotoxic CD8(+) T cells. *Trends Immunol.* 2018;39(12):965-79.
308. Schuster H, Peper JK, Bosmuller HC, Rohle K, Backert L, Bilich T, et al. The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(46):E9942-E51.
309. Wells AI, Coyne CB. Type III Interferons in Antiviral Defenses at Barrier Surfaces. *Trends Immunol.* 2018;39(10):848-58.
310. Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, et al. Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med.* 2004;200(8):1015-26.
311. Yamano T, Dobes J, Voboril M, Steinert M, Brabec T, Zietara N, et al. Aire-expressing ILC3-like cells in the lymph node display potent APC features. *J Exp Med.* 2019.
312. Fujikado N, Mann AO, Bansal K, Romito KR, Ferre EM, Rosenzweig SD, et al. Aire Inhibits the Generation of a Perinatal Population of Interleukin-17A-Producing gammadelta T Cells to Promote Immunologic Tolerance. *Immunity.* 2016;45(5):999-1012.
313. Yano M, Kuroda N, Han H, Meguro-Horike M, Nishikawa Y, Kiyonari H, et al. Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med.* 2008;205(12):2827-38.
314. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.* 2005;23(2):227-39.
315. Nishikawa Y, Hirota F, Yano M, Kitajima H, Miyazaki J, Kawamoto H, et al. Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation. *J Exp Med.* 2010;207(5):963-71.
316. Bassani-Sternberg M, Braunlein E, Klar R, Engleitner T, Sinitcyn P, Audehm S, et al. Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nat Commun.* 2016;7:13404.
317. Shao W, Pedrioli PGA, Wolski W, Scurtescu C, Schmid E, Vizcaino JA, et al. The SystemMHC Atlas project. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1237-D47.
318. Vizcaino JA, Kubiniok P, Kovalchik K, Ma Q, Duquette JD, Mongrain I, et al. The Human Immunopeptidome Project: a roadmap to predict and treat immune diseases. *Mol Cell Proteomics.* 2020;19(1):31-49.
319. Caron E, Aebersold R, Banaei-Esfahani A, Chong C, Bassani-Sternberg M. A Case for a Human Immuno-Peptidome Project Consortium. *Immunity.* 2017;47(2):203-8.
320. Liston A, Carr EJ, Linterman MA. Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends Immunol.* 2016;37(10):637-46.
321. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(1):21-9.
322. Breed ER, Lee ST, Hogquist KA, editors. Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection. *Seminars in cell & developmental biology*; 2018: Elsevier.
323. Labrecque N, Baldwin T, Lesage S. Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(1):16-26.
324. Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM, et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a

- National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *J Autoimmun.* 2012;39(4):259-71.
325. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377-91.
326. St-Pierre C, Brochu S, Vanegas JR, Dumont-Lagace M, Lemieux S, Perreault C. Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci Rep.* 2013;3(1860):1-10.
327. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* 2002;298(5597):1395-401.
328. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, et al. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell.* 2015;163(4):975-87.
329. Tomofuji Y, Takaba H, Suzuki HI, Benlaribi R, Martinez CDP, Abe Y, et al. Chd4 choreographs self-antigen expression for central immune tolerance. *Nat Immunol.* 2020;21(8):892-901.
330. Melichar HJ, Ross JO, Herzmark P, Hogquist KA, Robey EA. Distinct temporal patterns of T cell receptor signaling during positive versus negative selection in situ. *Sci Signal.* 2013;6(297):ra92.
331. McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med.* 2008;205(11):2575-84.
332. Lebel ME, Coutelier M, Galipeau M, Kleinman CL, Moon JJ, Melichar HJ. Differential expression of tissue-restricted antigens among mTEC is associated with distinct autoreactive T cell fates. *Nat Commun.* 2020;11(1):3734.
333. Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T, Lee YJ, Purtha WE, Lu JV, et al. Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol.* 2016;17(2):187-95.
334. Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A, Pachynski R, et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity.* 2012;36(3):438-50.
335. Yamano T, Nedjic J, Hinterberger M, Steinert M, Koser S, Pinto S, et al. Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity.* 2015;42(6):1048-61.
336. Perera J, Zheng Z, Li S, Gudjonson H, Kalinina O, Benichou JIC, et al. Self-Antigen-Driven Thymic B Cell Class Switching Promotes T Cell Central Tolerance. *Cell Rep.* 2016;17(2):387-98.
337. Nitta T, Tsutsumi M, Nitta S, Muro R, Suzuki EC, Nakano K, et al. Fibroblasts as a source of self-antigens for central immune tolerance. *Nat Immunol.* 2020;21(10):1172-80.
338. Srinivasan J, Lancaster JN, Singarapu N, Hale LP, Ehrlich LIR, Richie ER. Age-Related Changes in Thymic Central Tolerance. *Front Immunol.* 2021;12:676236.
339. Benhammadi M, Mathé J, Dumont-Lagace M, Kobayashi KS, Gaboury L, Brochu S, et al. IFN lambda enhances constitutive expression of MHC class I molecules on thymic epithelial cells. *J Immunol.* 2020;205(5):1268-80.
340. Williams JA, Zhang J, Jeon H, Nitta T, Ohigashi I, Klug D, et al. Thymic medullary epithelium and thymocyte self-tolerance require cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L costimulatory pathways. *J Immunol.* 2014;192(2):630-40.
341. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):833-44.
342. Richards DM, Kyewski B, Feuerer M. Re-examining the Nature and Function of Self-Reactive T cells. *Trends Immunol.* 2016;37(2):114-25.



343. Yu W, Jiang N, Ebert PJ, Kidd BA, Muller S, Lund PJ, et al. Clonal Deletion Prunes but Does Not Eliminate Self-Specific alpha-beta CD8(+) T Lymphocytes. *Immunity*. 2015;42(5):929-41.
344. ElTanbouly MA, Noelle RJ. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(4):257-67.
345. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6).
346. Mahiddine K, Hassel C, Murat C, Girard M, Guerder S. Tissue-Specific Factors Differentially Regulate the Expression of Antigen-Processing Enzymes During Dendritic Cell Ontogeny. *Frontiers in immunology*. 2020;11:453.
347. Rizzo JM, Romano RA, Bard J, Sinha S. RNA-seq studies reveal new insights into p63 and the transcriptomic landscape of the mouse skin. *J Invest Dermatol*. 2015;135(2):629-32.
348. Evans C, Hardin J, Stoebel DM. Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Brief Bioinform*. 2018;19(5):776-92.
349. Smid M, Coebergh van den Braak RRJ, van de Werken HJG, van Riet J, van Galen A, de Weerd V, et al. Gene length corrected trimmed mean of M-values (GeTMM) processing of RNA-seq data performs similarly in intersample analyses while improving intrasample comparisons. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(1):236.
350. Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Vilo J, Peterson H. gprofiler2 -- an R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g:Profiler. *F1000Res*. 2020;9.
351. Schuster H, Shao W, Weiss T, Pedrioli PGA, Roth P, Weller M, et al. A tissue-based draft map of the murine MHC class I immunopeptidome. *Sci Data*. 2018;5:180157.
352. Roberts N, Horsley V. Developing stratified epithelia: lessons from the epidermis and thymus. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2014;3(6):389-402.
353. Feingold KR. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S417-22.
354. Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(3):169-83.
355. Yewdell JW, Holly J. DRiPs get molecular. *Curr Opin Immunol*. 2020;64:130-6.
356. Ruiz Cuevas MV, Hardy MP, Holly J, Bonneil E, Durette C, Courcelles M, et al. Most non-canonical proteins uniquely populate the proteome or immunopeptidome. *Cell Rep*. 2021;34(10):108815.
357. Bassani-Sternberg M, Pletscher-Frankild S, Jensen LJ, Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(3):658-73.
358. Pearson H, Daouda T, Granados DP, Durette C, Bonneil E, Courcelles M, et al. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J Clin Invest*. 2016;126(12):4690-701.
359. Lancaster JN, Thyagarajan HM, Srinivasan J, Li Y, Hu Z, Ehrlich LIR. Live-cell imaging reveals the relative contributions of antigen-presenting cell subsets to thymic central tolerance. *Nat Commun*. 2019;10(1):2220.
360. Laumont CM, Daouda T, Laverdure JP, Bonneil E, Caron-Lizotte O, Hardy MP, et al. Global proteogenomic analysis of human MHC class I-associated peptides derived from non-canonical reading frames. *Nat Commun*. 2016;7:10238.
361. Shen L, Rock KL. Cellular protein is the source of cross-priming antigen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3035-40.

362. Norbury CC, Basta S, Donohue KB, Tschärke DC, Princiotta MF, Berglund P, et al. CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science*. 2004;304(5675):1318-21.
363. Millar DG, Ohashi PS. Central tolerance: what you see is what you don't get! *Nat Immunol*. 2016;17(2):115-6.
364. Zitvogel L, Perreault C, Finn OJ, Kroemer G. Beneficial autoimmunity improves cancer prognosis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(9):591-602.
365. Lo JA, Kawakubo M, Juneja VR, Su MY, Erlich TH, LaFleur MW, et al. Epitope spreading toward wild-type melanocyte-lineage antigens rescues suboptimal immune checkpoint blockade responses. *Sci Transl Med*. 2021;13(581).
366. Zhang YW, Davis EG, Bai J. Determination of internal control for gene expression studies in equine tissues and cell culture using quantitative RT-PCR. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2009;130(1-2):114-9.
367. Autengruber A, Gereke M, Hansen G, Hennig C, Bruder D. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2012;2(2):112-20.
368. Leclerc M, Mezquita L, Guillebot De Nerville G, Tihy I, Malenica I, Chouaib S, et al. Recent advances in lung cancer immunotherapy: input of T-cell epitopes associated with impaired peptide processing. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1505.
369. Ni J-X, Gao S-H. Understanding the viscera-related theory that the lung and large intestine are exterior-interiorly related. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2012;32(2):293-8.
370. Chefalo PJ, Grandea AG, Van Kaer L, Harding CV. Tapasin<sup>-/-</sup> and TAP1<sup>-/-</sup> macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *The Journal of Immunology*. 2003;170(12):5825-33.
371. Loi M, Müller A, Steinbach K, Niven J, da Silva RB, Paul P, et al. Macroautophagy proteins control MHC class I levels on dendritic cells and shape anti-viral CD8+ T cell responses. *Cell reports*. 2016;15(5):1076-87.
372. Feingold KR. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *Journal of lipid research*. 2009;50:S417-S22.
373. Wang L, Huang W, Li X-M. The Role of Lipid Metabolism in the Development of Lung Cancer. *Lipidomics in Health & Disease*. 2018:7-19.
374. Ko C-W, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020;17(3):169-83.
375. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological reviews*. 2010.
376. Lipp N-F, Ikhlef S, Milanini J, Drin G. Lipid exchangers: cellular functions and mechanistic links with phosphoinositide metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:663.
377. Abumrad NA, Sfeir Z, Connelly MA, Coburn C. Lipid transporters: membrane transport systems for cholesterol and fatty acids. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2000;3(4):255-62.
378. Bankaitis VA. The Cirque du Soleil of Golgi membrane dynamics. *Journal of Cell Biology*. 2009;186(2):169-71.
379. Shaikh S, Mitchell D, Carroll E, Li M, Schneck J, Edidin M. Differential effects of a saturated and a monounsaturated fatty acid on MHC class I antigen presentation. *Scandinavian journal of immunology*. 2008;68(1):30-42.

380. George CX, Das S, Samuel CE. Organization of the mouse RNA-specific adenosine deaminase Adar1 gene 5'-region and demonstration of STAT1-independent, STAT2-dependent transcriptional activation by interferon. *Virology*. 2008;380(2):338-43.
381. Sarkis PTN, Ying S, Xu R, Yu X-F. STAT1-independent cell type-specific regulation of antiviral APOBEC3G by IFN- $\alpha$ . *The Journal of Immunology*. 2006;177(7):4530-40.
382. Lou Y-J, Pan X-R, Jia P-M, Li D, Xiao S, Zhang Z-L, et al. IFR-9/STAT2 functional interaction drives retinoic acid-induced gene G expression independently of STAT1. *Cancer research*. 2009;69(8):3673-80.
383. Vijayan S, Meissner TB, Lee K-H, Liu Y-J, Downs I, Sidiq T, et al. Role of NLRC5 and IRF1 in the induction of MHC class I. *Am Assoc Immunol*; 2019.
384. Casazza RL, Lazear HM. Why is IFN- $\lambda$  less inflammatory? One IRF decides. *Immunity*. 2019;51(3):415-7.
385. De Weerd NA, Nguyen T. The interferons and their receptors—distribution and regulation. *Immunology and cell biology*. 2012;90(5):483-91.
386. Andreakos E, Salagianni M, Galani IE, Koltsida O. Interferon- $\lambda$ s: front-line guardians of immunity and homeostasis in the respiratory tract. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1232.
387. Voisinne G, Gonzalez de Peredo A, Roncagalli R. CD5, an undercover regulator of TCR signaling. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2900.
388. Hasegawa H, Matsumoto T. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo. *Frontiers in immunology*. 2018;9:350.
389. Wang J, Lareau C, Bautista J, Gupta A, Sandor K, Germino J, et al. Single-Cell Multiomics Defines Tolerogenic Extrathymic Aire-Expressing Populations with Unique Homology to Thymic Epithelium. 2021.
390. Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T, Lee YJ, Purtha WE, Lu JV, et al. Tolerance is established in polyclonal CD4<sup>+</sup> T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nature immunology*. 2016;17(2):187-95.
391. Zitvogel L, Perreault C, Finn OJ, Kroemer G. Beneficial autoimmunity improves cancer prognosis. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021:1-12.
392. Dezső Z, Nikolsky Y, Sviridov E, Shi W, Serebriyskaya T, Dosymbekov D, et al. A comprehensive functional analysis of tissue specificity of human gene expression. *BMC biology*. 2008;6(1):1-15.
393. Teulings H-E, Limpens J, Jansen SN, Zwinderman AH, Reitsma JB, Spuls PI, et al. Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2015;33(7):773-81.
394. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(10):8635-47.
395. Abramson J, Anderson G. Thymic epithelial cells. *Annual review of immunology*. 2017;35:85-118.
396. Xia S, Tao Y, Cui L, Yu Y, Xu S. MHC class I molecules exacerbate viral infection by disrupting type I interferon signaling. *Journal of immunology research*. 2019;2019.
397. Chacon MA, Boulanger LM. MHC class I protein is expressed by neurons and neural progenitors in mid-gestation mouse brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2013;52:117-27.
398. Lazarczyk MJ, Kemmler JE, Eyford BA, Short JA, Varghese M, Sowa A, et al. Major Histocompatibility Complex class I proteins are critical for maintaining neuronal structural complexity in the aging brain. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-13.

399. Boulanger LM. MHC class I in activity-dependent structural and functional plasticity. *Neuron glia biology*. 2004;1(3):283-9.
400. Rodríguez-Cruz TG, Liu S, Khalili JS, Whittington M, Zhang M, Overwijk W, et al. Natural splice variant of MHC class I cytoplasmic tail enhances dendritic cell-induced CD8<sup>+</sup> T-cell responses and boosts anti-tumor immunity. *PloS one*. 2011;6(8):e22939.
401. Chelbi S, Dang A, Guarda G. Emerging major histocompatibility complex class I-related functions of NLRC5. *Advances in immunology*. 2017;133:89-119.
402. Kobayashi KS, Van Den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(12):813-20.
403. Bassani-Sternberg M, Bräunlein E, Klar R, Engleitner T, Sinitcyn P, Audehm S, et al. Direct identification of clinically relevant neoepitopes presented on native human melanoma tissue by mass spectrometry. *Nature communications*. 2016;7(1):1-16.
404. Spencer CT, Bezbradica JS, Ramos MG, Arico CD, Conant SB, Gilchuk P, et al. Viral infection causes a shift in the self peptide repertoire presented by human MHC class I molecules. *PROTEOMICS—Clinical Applications*. 2015;9(11-12):1035-52.
405. Kadouri N, Nevo S, Goldfarb Y, Abramson J. Thymic epithelial cell heterogeneity: TEC by TEC. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(4):239-53.
406. Nitta T, Tsutsumi M, Nitta S, Muro R, Suzuki EC, Nakano K, et al. Fibroblasts as a source of self-antigens for central immune tolerance. *Nature Immunology*. 2020;21(10):1172-80.
407. Adamopoulou E, Tenzer S, Hillen N, Klug P, Rota IA, Tietz S, et al. Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus. *Nature communications*. 2013;4(1):1-9.
408. Schuster H, Shao W, Weiss T, Pedrioli PG, Roth P, Weller M, et al. A tissue-based draft map of the murine MHC class I immunopeptidome. *Scientific data*. 2018;5(1):1-11.
409. Slavov N. Single-cell protein analysis by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology*. 2021;60:1-9.

# Annexes

## Annexe 1

<b>Table 1-S1 List of interferon stimulated genes (ISG)</b>		
<b>Gene Name</b>	<b>Gene Description</b>	<b>Ensembl ID</b>
Acod1	aconitate decarboxylase 1	ENSMUSG00000022126
Actg1	actin, gamma, cytoplasmic 1	ENSMUSG00000062825
Actr2	ARP2 actin-related protein 2	ENSMUSG00000020152
Actr3	ARP3 actin-related protein 3	ENSMUSG00000026341
Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	ENSMUSG00000074207
Adh6a	alcohol dehydrogenase 6A (class V)	ENSMUSG00000053054
Anxa13	annexin A13	ENSMUSG00000055114
Aqp4	aquaporin 4	ENSMUSG00000024411
Arg1	arginase, liver	ENSMUSG00000019987
Artn	artemin	ENSMUSG00000028539
Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	ENSMUSG00000046718
Capg	capping protein (actin filament), gelsolin-like	ENSMUSG00000056737
Casp1	caspase 1	ENSMUSG00000025888
Ccl1	chemokine (C-C motif) ligand 1	ENSMUSG00000020702
Ccl11	chemokine (C-C motif) ligand 11	ENSMUSG00000020676
Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	ENSMUSG00000035352
Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	ENSMUSG00000031780
Ccl19	chemokine (C-C motif) ligand 19	ENSMUSG00000071005
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	ENSMUSG00000035385
Ccl20	chemokine (C-C motif) ligand 20	ENSMUSG00000026166
Ccl21a	chemokine (C-C motif) ligand 21A (serine)	ENSMUSG00000094686
Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21B (leucine)	ENSMUSG00000095675
Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	ENSMUSG00000031779
Ccl24	chemokine (C-C motif) ligand 24	ENSMUSG00000004814
Ccl25	chemokine (C-C motif) ligand 25	ENSMUSG00000023235
Ccl26	chemokine (C-C motif) ligand 26	ENSMUSG00000070464
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	ENSMUSG00000000982
Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	ENSMUSG00000018930
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	ENSMUSG00000035042
Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6	ENSMUSG00000018927

Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	ENSMUSG00000035373
Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	ENSMUSG00000009185
Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	ENSMUSG00000019122
Cdc37	cell division cycle 37	ENSMUSG00000019471
Cdc42	cell division cycle 42	ENSMUSG00000006699
Cdc42ep2	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	ENSMUSG00000045664
Cdc42ep4	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4	ENSMUSG00000041598
Ciita	class II transactivator	ENSMUSG00000022504
Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	ENSMUSG00000051159
Cwh43	cell wall biogenesis 43 C-terminal homolog	ENSMUSG00000029154
Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	ENSMUSG00000031778
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	ENSMUSG00000018920
Cyp27b1	cytochrome P450, family 27, subfamily b, polypeptide 1	ENSMUSG00000006724
Dapk1	death associated protein kinase 1	ENSMUSG00000021559
Dapk3	death-associated protein kinase 3	ENSMUSG00000034974
Dnaja3	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A3	ENSMUSG00000004069
Eprs	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	ENSMUSG00000026615
Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	ENSMUSG00000021262
Flnb	filamin, beta	ENSMUSG00000025278
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ENSMUSG00000057666
Gbp10	guanylate-binding protein 10	ENSMUSG00000105096
Gbp2	guanylate binding protein 2	ENSMUSG00000028270
Gbp2b	guanylate binding protein 2b	ENSMUSG00000040264
Gbp3	guanylate binding protein 3	ENSMUSG00000028268
Gbp4	guanylate binding protein 4	ENSMUSG00000079363
Gbp5	guanylate binding protein 5	ENSMUSG00000105504
Gbp6	guanylate binding protein 6	ENSMUSG00000104713
Gbp7	guanylate binding protein 7	ENSMUSG00000040253
Gbp8	guanylate-binding protein 8	ENSMUSG00000034438
Gbp9	guanylate-binding protein 9	ENSMUSG00000029298
Gch1	GTP cyclohydrolase 1	ENSMUSG00000037580
Gm2564	predicted gene 2564	ENSMUSG000000091938
Gm43302	predicted gene 43302	ENSMUSG00000079362
Gm45717	predicted gene 45717	ENSMUSG00000110104
Gm7676	predicted gene 7676	ENSMUSG00000068631
Gsn	gelsolin	ENSMUSG00000026879

Hpx	hemopexin	ENSMUSG00000030895
Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1	ENSMUSG00000025491
Ifitm2	interferon induced transmembrane protein 2	ENSMUSG00000060591
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	ENSMUSG00000025492
Ifitm6	interferon induced transmembrane protein 6	ENSMUSG00000059108
Ifitm7	interferon induced transmembrane protein 7	ENSMUSG00000065968
Ifna1	interferon alpha 1	ENSMUSG00000095498
Ifnar1	interferon (alpha and beta) receptor 1	ENSMUSG00000022967
Ifnar2	interferon (alpha and beta) receptor 2	ENSMUSG00000022971
Ifnb1	interferon beta 1, fibroblast	ENSMUSG00000048806
Ifng	interferon gamma	ENSMUSG00000055170
Ikbke	inhibitor of kappaB kinase epsilon	ENSMUSG00000042349
Il12b	interleukin 12b	ENSMUSG00000004296
Il12rb1	interleukin 12 receptor, beta 1	ENSMUSG00000000791
Il23r	interleukin 23 receptor	ENSMUSG00000049093
Irak1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	ENSMUSG00000031392
Irf1	interferon regulatory factor 1	ENSMUSG00000018899
Irf2	interferon regulatory factor 2	ENSMUSG00000031627
Irf3	interferon regulatory factor 3	ENSMUSG00000003184
irf4	interferon regulatory factor 4	ENSMUSG00000021356
irf5	interferon regulatory factor 5	ENSMUSG00000029771
irf6	interferon regulatory factor 6	ENSMUSG00000026638
Irf7	interferon regulatory factor 7	ENSMUSG00000025498
Irf8	interferon regulatory factor 8	ENSMUSG00000041515
Irf9	interferon regulatory factor 9	ENSMUSG00000002325
Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1	ENSMUSG00000046879
Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2	ENSMUSG00000069874
Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier	ENSMUSG00000035692
Jak2	Janus kinase 2	ENSMUSG00000024789
Jakmip1	janus kinase and microtubule interacting protein 1	ENSMUSG00000063646
Kif16b	kinesin family member 16B	ENSMUSG00000038844
Kif5b	kinesin family member 5B	ENSMUSG00000006740
Kynu	kynureninase	ENSMUSG00000026866
Mb	myoglobin	ENSMUSG00000018893
Med1	mediator complex subunit 1	ENSMUSG00000018160
Mefv	Mediterranean fever	ENSMUSG00000022534

Mir511	microRNA 511	ENSMUSG00000077897
Mmp7	matrix metallopeptidase 7	ENSMUSG00000018623
Mrc1	mannose receptor, C type 1	ENSMUSG00000026712
Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88	ENSMUSG00000032508
Myo18a	myosin XVIII A	ENSMUSG00000000631
Myo1c	myosin IC	ENSMUSG00000017774
Napsa	napsin A aspartic peptidase	ENSMUSG00000002204
Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5	ENSMUSG00000074151
Nmi	N-myc (and STAT) interactor	ENSMUSG00000026946
Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	ENSMUSG00000020826
Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	ENSMUSG00000032690
Oas3	2'-5' oligoadenylate synthetase 3	ENSMUSG00000032661
Otop1	otopetrin 1	ENSMUSG00000051596
Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	ENSMUSG00000034422
Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	ENSMUSG00000022906
Pde12	phosphodiesterase 12	ENSMUSG00000043702
Phf11a	PHD finger protein 11A	ENSMUSG00000044703
Phf11b	PHD finger protein 11B	ENSMUSG00000091649
Phf11d	PHD finger protein 11D	ENSMUSG00000068245
Pitx1	paired-like homeodomain transcription factor 1	ENSMUSG00000021506
Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma	ENSMUSG00000000440
Ptpn2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	ENSMUSG00000024539
Rab11fip5	RAB11 family interacting protein 5 (class I)	ENSMUSG00000051343
Rab12	RAB12, member RAS oncogene family	ENSMUSG00000023460
Rab20	RAB20, member RAS oncogene family	ENSMUSG00000031504
Rab43	RAB43, member RAS oncogene family	ENSMUSG00000030055
Rab7b	RAB7B, member RAS oncogene family	ENSMUSG00000052688
Rasal1	RAS protein activator like 1 (GAP1 like)	ENSMUSG00000029602
Rpl13a	ribosomal protein L13A	ENSMUSG00000074129
Rps6kb1	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1	ENSMUSG00000020516
Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	ENSMUSG00000020641
Setd2	SET domain containing 2	ENSMUSG00000044791
Shmt2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	ENSMUSG00000025403
Slc11a1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	ENSMUSG00000026177
Slc26a6	solute carrier family 26, member 6	ENSMUSG00000023259
Slfn2	schlafen 2	ENSMUSG00000072620



SncA	synuclein, alpha	ENSMUSG00000025889
Socs1	suppressor of cytokine signaling 1	ENSMUSG00000038037
Sp100	nuclear antigen Sp100	ENSMUSG00000026222
Sp110	Sp110 nuclear body protein	ENSMUSG00000070034
Spink2	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2	ENSMUSG00000053030
Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	ENSMUSG00000026104
Stat2	signal transducer and activator of transcription 2	ENSMUSG00000040033
Stx11	syntaxin 11	ENSMUSG00000039232
Stx4a	syntaxin 4A (placental)	ENSMUSG00000030805
Stx8	syntaxin 8	ENSMUSG00000020903
Stxbp1	syntaxin binding protein 1	ENSMUSG00000026797
Stxbp2	syntaxin binding protein 2	ENSMUSG00000004626
Stxbp3	syntaxin binding protein 3	ENSMUSG00000027882
Stxbp4	syntaxin binding protein 4	ENSMUSG00000020546
Syncrin	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	ENSMUSG00000032423
Tdgf1	teratocarcinoma-derived growth factor 1	ENSMUSG00000032494
Tgtp1	T cell specific GTPase 1	ENSMUSG00000078922
Tnfsf10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	ENSMUSG00000039304
Trex1	three prime repair exonuclease 1	ENSMUSG00000049734
Trex2	three prime repair exonuclease 2	ENSMUSG00000031372
Trim21	tripartite motif-containing 21	ENSMUSG00000030966
Trim56	tripartite motif-containing 56	ENSMUSG00000043279
Trp53	transformation related protein 53	ENSMUSG00000059552
Tspan1	tetraspanin 1	ENSMUSG00000028699
Txk	TXK tyrosine kinase	ENSMUSG00000054892
Ubd	ubiquitin D	ENSMUSG00000035186
Vamp3	vesicle-associated membrane protein 3	ENSMUSG00000028955
Vamp4	vesicle-associated membrane protein 4	ENSMUSG00000026696
Vamp8	vesicle-associated membrane protein 8	ENSMUSG00000050732
Vim	vimentin	ENSMUSG00000026728
Vps26b	VPS26 retromer complex component B	ENSMUSG00000031988
Was	Wiskott-Aldrich syndrome	ENSMUSG00000031165
Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1	ENSMUSG00000026573
Xdh	xanthine dehydrogenase	ENSMUSG00000024066
Zyx	zyxin	ENSMUSG00000029860

## Annexe 2

Table 2-S1 List of genes uniquely expressed in extrathymic ECs		
Genes uniquely expressed in skin ECs	Genes uniquely expressed in colon ECs	Genes uniquely expressed in lung ECs
Eif5a13-ps	Chil5	Tsnaxip1
Gm16087	Eif5a13-ps	Ptprb
Ptprb	Gm44040	Atp7b
Gm5599	Gm5599	Gli1
H2al1h	Gm6913	C1qtnf7
Gli1	Gm10561	Gm6913
C1qtnf7	Mir124-2hg	Gm28729
Gm11793	Gm42528	Gm11592
Gm13568	Cd46	Gm37464
Gm45563	Gm44623	Mir124-2hg
Gm37149	Chp2	Terb1
Gm12866	Gm26315	Gm44623
Gm28625	K230015D01Rik	Gm43050
Gm7870	Gm15608	Cep295nl
Gm43050	Hoxb5	K230015D01Rik
Chp2	Olfir57	Gm15608
Hoxb5	Gm37261	Hoxb5
Olfir57	Gm11380	Olfir57
Lama1	Gm27046	Vgll3
Gm27046	Hes2	Slc7a10
Vgll3	Gm16505	Fam26e
En1	Gm6044	Gm15337
Fam26e	2210406O10Rik	Gm16505
Lenep	Hspe1-ps3	Gm6044
Gm15396	Rdh16	Gm44900
Pgk1-rs7	Ms4a8a	Tsix
Gm45114	Gm44867	Ms4a8a
Gm7760	Gm12720	Gm12963
Gm11970	Gm42902	Gm44867
Gm3756	Gm37909	Gm12720

RP23-149L23.1	Gm5766	Xrra1
A430110C17Rik	Prdm14	Gm3756
Gm20699	Gm45080	Gm11764
Gm15648	Ceacam12	Gm20699
Gm4035	Gm4035	Gm15648
Rdh16f1	Rdh16f1	Gm45080
3632451O06Rik	3632451O06Rik	3632451O06Rik
Gm11496	Gm29560	Tmem591
Lrrc7	9030619P08Rik	Irx5
Gm16060	Gm11496	Gm12996
Irx5	E330011O21Rik	Gm20778
Rps12-ps20	Gm11826	E330011O21Rik
Gm15410	Gm37339	Itgbl1
Gm28659	Proc	Mlcl
E330011O21Rik	Gm11410	Gm43428
Wnt3	Cyp2d26	Proc
Gm12816	Cyp24a1	T2
Gm11826	Slc16a9	Gm11410
Itgbl1	Gm11273	Gm19589
Gm12318	Lmx1a	Slc35f3
Gm20512	Olfir1031	Slc16a9
Slc16a9	Arhgap20	2310014F06Rik
Gm11273	Gm8989	Arhgap20
Arhgap20	Gm42684	Cthrc1
Mrgprb11-ps	4930589O11Rik	Iqcd
Zfp652os	Pde11a	Gm5265
BC024386	Cyp2w1	Zfp354b
Gm15994	Iqcd	Gm15598
Cyp2w1	H2a11k	Gm38284
Gm5265	Gm6745	Aspa
Csta1	Gm933	Krt88
9330154J02Rik	Csta1	Gm17103
Gm19950	Gm16011	Fam13c
Fam13c	Aspa	Fbxl22
Rps19-ps5	Fbxl22	Rps8-ps1
Aknad1	Gm43581	4632428C04Rik

Gm42746	Rps8-ps1	Ccdc81
Gm16049	Hoxd13	Gm12098
Gm43493	Gm28373	Gm13655
Gm2546	Gm13655	Gm16253
Ddr2	Gm16046	9230117E06Rik
Gm6641	5033404E19Rik	Gm20536
Gm45552	Gm20536	Gm45862
Gm20416	Rpl17-ps1	Ddr2
Gm14845	Ighv1-42	Gm5850
Hoxc13	Gm2546	Bmp5
Gja5	Rpl26-ps4	Clec1a
Gm5835	Gm16090	Fbxo47
A630095N17Rik	Ddr2	Gja5
Hnrnpa112-ps	Bmp5	Mak
C7	Gm43314	1700016H13Rik
Gm12271	Gm5523	Cfap99
Gm11989	Gm14863	C7
S100a11-ps	Gm13328	8030453O22Rik
Gm15191	1700016H13Rik	Gm11989
RP23-23P9.5	Gm5835	C77370
1700057G04Rik	6430590A07Rik	Mfsd4b1
1700001P01Rik	Igkv9-120	Gm19426
Gm42822	Gm37091	9030622O22Rik
Gm13198	Gm11989	RP23-152A3.2
Tagln3	Olfir905	Fbxo15
RP23-118L13.2	9030622O22Rik	Dnah12
Gm15954	Slc34a1	RP23-174M1.1
Gm43537	Gm19027	Gm42696
Rpl12-ps1	Gm8798	4930444P10Rik
RP24-93F20.12	A430078I02Rik	RP23-152I9.4
Gm8250	Spin4	5033403H07Rik
Olr1	Gm15954	D030047H15Rik
Gm9726	Gm6576	Gm12367
Cpa4	Scgb2b15	Rpl
Gm7783	Len4	Chrm3
Gm13219	Gm42878	Pi15

Gm5407	Rpl12-ps1	Efcab5
RP23-114G13.7	Slc26a1	Gm5278
Gm28286	Rnf212	Gm20692
Gm13532	Gm6395	Cdk14
Ankdd1a	Gm15032	Gm43523
Gm45233	RP24-314N20.2	Efcab12
Skal	Gm3150	Runx1t1
RP23-442A13.3	Gm45074	Ccdc170
Pi15	4930596I21Rik	Gm32950
Gm14906	Gm8355	Gm45151
RP23-100M12.7	Gm45233	Abca8a
Gm15566	Chrm3	Nhlrc4
Gm37850	Cyp2c68	Gm45332
Gm2710	Skal	Adamts13
Zcchc5	Gm45889	Thegl
Runx1t1	Arl14	Trpc6
Abca8a	Gm15616	Akr1c14
Fam83a	Cbln3	RP24-421I12.1
Mmp27	Efcab5	4930524O07Rik
Sfrp4	RP23-100M12.7	4930594M22Rik
Gm16863	Nags	Gm6181
RP24-408O23.2	Runx1t1	RP23-115A18.1
Gm21013	Abca8a	Gata6
Hist1h2aj	Abcc6	March4
Gm11514	Cyp4x1	Nox4
Gata6	Akr1c14	Gm15402
Nox4	Gm16863	Lemd1
Tyrl	Gm42869	Kcnk12
Rdh1	Sv2c	Gdnf
Gdnf	Rpl31-ps7	Npr3
Npr3	Fbxo48	Lepr
Gm36378	4930524O07Rik	Fam198b
Gm16034	Gm32540	RP23-110E20.5
Gm5561	RP23-115A18.1	Kenj8
Gm5528	Gata6	Ugt8a
Gm11879	Gm11366	1700013F07Rik

H2a11d	Gm16206	RP23-386F15.2
Fam198b	Rdh1	Prkg1
Kcnj8	Lepr	Syt10
Serpina3e-ps	Dner	Nr1h5
Gm38287	Olf165	Cdh5
RP23-386F15.2	Gm44146	Ecm2
Gm14141	Gm9974	Kif14
Gm8200	Gm38271	Gm15347
Gm38014	Gm5528	Stmnd1
Gm43518	Gm11879	C530005A16Rik
Cdh5	Fam198b	Gm20755
Ecm2	Gm15331	Col13a1
Gm5860	Sval3	Lrrc34
Kif14	Gm12616	Gm44509
Gm9845	Ugt8a	Armc3
Gm38380	Smpx	Ildr2
Gm16567	RP23-386F15.2	B430010I23Rik
Col13a1	Gm28309	Gm13669
Gm25813	Cdh5	Scp2-ps2
Gm6767	Ecm2	RP23-184O11.3
Gm12599	Kif14	F5
Gm44509	Gm15604	Serpina3m
Gapdhs	Rdh9	Rsph14
Flg2	BC048644	Sorbs2os
Dlx1	Mup-ps23	Gm20695
Rnf224	Gsdmcl2	Gm26788
Ildr2	Lrrc66	Zfp454
Gm5963	Nrap	Gm43933
Gm43956	Gm6767	B9d1os
Gm3654	Hist1h3e	Lrp2
Gm3045	Nkx2-2	Gm8292
Rpl21-ps6	Gm44509	Rnf138rt1
Gm44702	RP24-134C11.1	A430027H14Rik
Gm26788	Ighv1-81	Gm27960
RP24-275P22.2	Gm13669	Slc16a12
Gm11760	Scp2-ps2	Fgf7

3100002H09Rik	Hottip	Tbx4
Mettl21b	Gm12231	Gm14232
Gm12038	RP23-106F10.1	Gm26602
Gm6240	Gpx2-ps1	Gm42421
Gm20476	Kcnab3	Gm12912
Gm8292	Gm29103	G6b
Gm3835	Gm20695	Gm20412
Gm5745	Gm43966	Gm13778
RP23-80P5.1	Gm43054	Ednrb
Fgf7	Rpl31-ps16	Lca5l
Gm11450	4930526L06Rik	Dnah7c
Gm6292	Defb37	Gm13056
Gm14232	Otc	D630024D03Rik
Rpl23a-ps5	Gm11945	Spata18
Gm12912	Gm8292	Arhgef38
G6b	Slc16a12	Gm13816
Gm12469	Cxxc4	Gm21119
Gm37234	RP24-282C4.11	Palm3
Gm13778	Gm11450	Ftcd
Gm6564	Gm44274	Nek10
Ednrb	Gm15400	Acot6
RP24-233B16.8	2810459M11Rik	Gm14892
Gm1840	Gm26602	Kctd8
Gm16073	Gm12912	Gm26719
Ephb1	Gm37666	Gm17383
Gm37106	G6b	Gm43118
Clec2f	Gm11483	B430319H21Rik
Gm2541	Iqch	9330121J05Rik
Acot6	9030616G12Rik	Gm27184
Gm17383	Gm6564	Gm16052
Gm10029	Wfdc8	Gm15475
Scepl0s	Gm13056	Fam159a
Kcnk4	Syce3	Gm10257
Gm12944	D630024D03Rik	D630002J18Rik
Pnpla1	Gm7204	Gas2l2
Gm13349	Arhgef38	Ttll7

Tll7	Ern2	Plekhd1
Gucy1a3	RP23-426E11.3	Prr36
Serpina3b	Cdh26	2310026L22Rik
A530013C23Rik	Slc10a2	Gucy1a3
Trpm1	Cyp4f40	Tex11
Gm4654	Acot6	Lrrc6
Gm6065	Gm14892	Gm11491
Gm26670	RP24-181E5.4	RP24-381P6.1
Ushbp1	RP24-345M16.5	Gm26563
Gm14650	Gm37098	1700012C08Rik
Halr1	Gm10029	Ushbp1
9230102O04Rik	Gm8979	4930505A04Rik
Gm15186	Gm27184	Gm15186
Gm42984	Mapk8ip2	Gm29266
Samd11	Foxa3	Jhy
BC024139	Gm16052	Gm15510
2810030D12Rik	Gm12944	Gm14412
Gm16599	Gm10257	Wdr63
Rpl21-ps5	Pnpla1	1700001C02Rik
Wfdc5	D630002J18Rik	Slc4a5
Ndufa4l2	Gm13652	Zc3h12b
Gm8692	9130017K11Rik	Ndufa4l2
Gm15872	Tll7	4930522O17Rik
Bcl6b	Plekhd1	Gm44868
Gm45420	Gm19269	Gsto2
Gm19557	Npffr1	Prr18
Kcne4	4732490B19Rik	Bcl6b
Gm6450	Gucy1a3	Gm36569
Rnf222	Atp8b5	Gm15851
Gm13523	Gm6065	Kcne4
Trim72	A1cf	2410004I01Rik
Ctf2	Casq2	Spag16
Gm26652	Gm45445	Gm379
Gm10157	Sptbn5	Gm11398
Gm43034	Gm45457	Gm12057
Slc28a3	BC024139	Svs5



Gm19434	2810030D12Rik	Trim72
Gm26508	AI854703	Gm10157
Gm6457	Gm12466	Gm43034
Hlf	Gm29156	Slc28a3
Tnfaip8l3	Slc7a9	Gm37296
Gm42636	Hist1h2bp	Gm26508
Gm10075	Gm14412	Hlf
Gm43439	Nt5c1a	Gm42636
Has1	Wdr63	Gm10075
Svepl	Gm44599	Slc17a2
Popdc3	Gm37788	Gm45507
Gm14156	Wfdc6b	Has1
Gm6939	Clec2h	Svepl
Gm12347	Gsto2	Ryr2
Gm43788	Xk	Popdc3
Gm13162	Gm19557	Gm17134
Gm28959	Gm11535	Fsip1
Gm9920	Gm12596	Efhc2
Mtag2	Gm14251	Gm28959
Gm5292	Kcne4	Gm9920
Gm16278	Gm45041	Maats1os
Tnfsf18	Cd200r2	Gm42956
Trim52	Gm379	H2-M6-ps
Gm18753	Gm11398	Gm14324
Gm15660	Trim72	Stx19
Mc5r	Tm4sf4	Gm13750
Stx19	Gm26652	Sp5
Gm13750	Btn1a1	Elmod1
Hist1h2af	Eldr	Dnah3
Elmod1	Gm37760	Maob
Maob	Gm10157	Gkn3
Tmprss11f	Gm11735	Itpka
Gkn3	Slc28a3	4732471J01Rik
Itpka	Gm26508	Gm15222
RP24-91J7.1	Gm42636	RP24-91J7.1
Ppara	Gm10075	Ppara

Gm20528	F630040K05Rik	Itga11
Gm2453	Slc17a2	Platr22
Itga11	Has1	Gm7893
Gm14636	Svep1	Gm13304
Gm13304	Gm17134	Slco4c1
Gm2445	Gm37315	Gm7831
Gm8731	9230105E05Rik	Hnf1b
Gm5883	Gm9920	Mamdc2
Jam2	Sult4a1	Jam2
Gm20518	Gm4735	Sox2
Gm29253	BC018473	Gm12294
Krtap11-1	Gm5121	Rnf144a
Gm15888	Gm9905	Gm12766
Gm13935	Gm14324	RP23-152I9.3
Gm9103	Stx19	Gm7269
Cwh43	Hist1h4j	2010001K21Rik
Gm128	4930594C11Rik	Ak7
Rpl28-ps2	Fev	Myo16
Gm8182	Gm13750	Morn3
Gm28967	Hist1h2af	1010001N08Rik
Hpdl	Gjb1	Gm13187
Lce6a	Maob	Oacyl
2010001K21Rik	Negr1	Fam196a
Col6a6	Itpka	Ttc21a
Srrm4	4732471J01Rik	Gm42835
Prss23os	Ppara	Gm14168
Dpfl	Gm20528	Flnc
Gm42532	Hoxa11os	Bmp4
Mc1r	RP24-181E5.3	Styx11
Gm4929	Guca1b	Gm44487
RP23-186B12.3	Gm14636	Gm16192
Gm7935	Gipr	Iqub
D5Ert615e	Srd5a2	Ccdc121
Flnc	Gm44955	Frmd8os
Bmp4	2010010A06Rik	Tead4
Styx11	Gm5883	4933425M03Rik

Gm43311	Ccl28	Gm21399
Gm17122	Gm17197	Klhl3
Gm13769	Gm9670	Tfpi2
Kcnc4	1700011H14Rik	Ogn
Gm17148	RP24-318O6.2	Pdia2
Gm16192	Hnf1b	Gm15728
Gm43573	Tcf23	Akap14
1700047K16Rik	Gm37145	Ttc34
Tead4	Jam2	Lrrc74b
Gm17271	RP24-84C23.5	Cfap54
Tfpi2	Gm35000	Gm20554
Gm43791	Gm20518	Adamts5
Ogn	Gm12504	Zkscan4
Gm16585	0610031O16Rik	Tmem71
Gm15728	Gm29253	Rptoros
Panx3	Gm15888	Mars2
Efhd1os	Gm44033	Gm17182
Gm20554	Gm12669	1810020O05Rik
Adamts5	9130024F11Rik	Erc2
Gm3745	Gm4221	Gm15551
Mars2	Gm43455	Svs2
RP24-200F4.4	Drd3	Cfap100
Exoc3l2	St8sia5	Gm15675
Gm13622	Cwh43	Gm6970
Gm42892	Apol6	Crnde
B230369F24Rik	Hsd3b3	Map3k21
Gm15675	Gm13039	Gm20544
RP23-55G19.3	Rpl28-ps2	Gm5844
Gm7251	D030040B21Rik	Frem1
H2-M9	Hpd1	Mycbpap
Crnde	Gm8349	Trpv6
Gm17099	Gm12985	Gm15972
Gpr37	Nr1i3	Olfml2b
Gm20544	2010001K21Rik	Armc2
Trpv6	Gm42532	Gm28933
Gm15972	Naalad11	Gm31659

Rspo3	Hoxa11	Gm13470
Olfml2b	Gm830	2010309G21Rik
Csf3	Gm12712	Gm4524
Gm12587	1010001N08Rik	Cmya5
Rpl7a-ps7	9130221F21Rik	Col4a4
Gm14376	Pla2g2a	Nkx2-1
Gm36937	9130227L01Rik	1700020N18Rik
Gm4524	Gm12860	Gm45236
Abca12	Rgs7	D030018L15Rik
Grip1os3	Unc5cl	Fam166b
Gm17130	Gm11830	Gm26973
RP23-340G24.10	Bmp4	Gm37087
Tll1	Dgkg	Ccdc151
Gm8880	Gm44487	Ninj2
Gm11816	Gm16192	Gm8539
Bach2it1	Dnah8	Zswim5
Hist2h2bb	2210417A02Rik	Gm22118
S1pr5	Gm14298	Rps12-ps10
Emx2	Frmf8os	RP23-358M4.7
Krt35	Tead4	Gm29240
Skint6	4933425M03Rik	Gm26578
Wnt16	Gm21399	Aspn
Rps12-ps10	Klhl3	Gm43960
RP23-358M4.7	Tfpi2	4933406P04Rik
Gm15009	Ogn	Slc2a12
Krtap8-1	Gm15728	Tspan2os
Gm11539	B3gnt6	Gm7173
Aspn	Evx1	Gm15807
4933417D19Rik	Gm4335	Olf1336
Slc2a12	RP23-225H6.1	Gp5
Gm8649	Rims4	Gm20594
Gm10631	Hmga2	RP23-287L13.5
Skint5	RP23-134M7.3	1200007C13Rik
Gm11878	E130215H24Rik	Alpk3
Gm5849	Rptoros	Sema3g
Olf1336	Mars2	Gm14964

Gm6433	Gm45344	Bloc1s2-ps
Gm20594	Gm12643	Ntf3
Sema3g	Gm15675	Gm6213
Gm5147	Gm12630	Gm29201
Bloc1s2-ps	RP24-373J20.5	Myct1
Ntf3	Gm15199	Aass
Gm29201	Map3k21	Gm14843
Gm5453	Gm17099	Ankef1
Myct1	Bhlha15	Tex26
Stpg3	Gm20544	Rnf225
RP23-424I1.1	Gm5844	Tc2n
Gm5560	Mycbpap	Ttll13
Gm20732	4633401B06Rik	Mfrp
Gm43494	Trpv6	Gm28925
Krtap7-1	Gm15972	A830073O21Rik
Gm43421	G730013B05Rik	Tmem132d
Rnf225	Olfml2b	C230014O12Rik
Gm44386	Gm44855	Olf1342
Gm45834	Gm44973	Sntn
Svopl	Gm31659	Gm45852
Gm10702	Gm25386	Scd4
Gpr1	Gm7420	Zfp72
Gm29344	Gm26739	Gm33051
Mfrp	Abca12	Cdrt4
Gm14603	RP24-458J4.7	Baiap2l2
Gm28555	Gm45236	Fbxo16
Gm16580	Gm37087	Kcnk7
Gm11472	Gm6060	Gm8174
Gm12005	Bach2it1	Colgalt2
Gm9529	Hist2h2bb	AU018091
Gm5445	Hrh1	1700018A04Rik
Dsglc	Zswim5	Gm24685
Rpl13-ps3	Rps12-ps10	Ttll8
BC117090	Gm12408	Sox6
Gm7327	Gm43778	Ccdc89
2310015K22Rik	Gm10658	1700034E13Rik

Gm14866	RP24-570M12.3	Gm7308
Gm2399	Mettl7a2	Gm12525
Kcnj16	Gm11539	Gm38075
Cd209f	Aspn	Fam180a
Kcnk7	Gm44695	RP24-366H8.3
Hoxb5os	Fut9	Gm16295
Gm8174	Gm7173	Hydin
RP23-212M22.4	Olfr1336	Nphp4
AU018091	Gm20594	A330076H08Rik
Gm44917	Cyp2d37-ps	Gm12037
Rpp25	Ugt2b5	Pla2g12b
Lax1	Bloc1s2-ps	Dtna
Gm35986	9530080O11Rik	Gm12275
Aatk	Gm10020	2310040G07Rik
Krt26	Otud7a	Gm12695
Aoc3	Gm7765	Wisp2
Gm13666	Fbxw24	Pnma1
Sox6	Gm5560	Abhd12b
Fam181b	Gm14843	Zbtb32
Gm15694	Ptprh	Gm42841
Fam180a	A330102I10Rik	Kcnj13
Gm38247	Gm43421	Panct2
RP24-366H8.3	Gm24146	RP24-185I21.1
Gm16477	Gm44386	Gm11771
Gm12037	Tc2n	Gm43037
Gsdmc	Sval1	Gm14512
Gm37292	L3mbtl4	Plin5
Gm44691	Gm28925	Fgf10
C730045M19Rik	Pax6	Tvp23bos
Gm44698	Rps4x-ps	Gm36963
4921514A10Rik	Gm16580	Gm10874
Ccdc27	Gm15730	Gm29538
Gm9970	Gm45877	Gm13558
Gm28308	Gm11127	Irs3
Gm29099	Rpl13-ps3	RP23-130L13.2
Wisp2	Vmn2r29	Pitpnm3

Pcdh19	Ceacam2	Asb14
Sdr16c5	Isx	Dusp26
Abhd12b	Zfp72	Gm13111
Gm20568	Gm33051	Gm17228
Zbtb32	Gm7467	Cfap73
Rpl27-ps2	Baiap212	Muc16
Gm11223	A930041C12Rik	Usp13
Gm9320	Hoxb5os	Plpp7
Gm8813	Rpl31-ps6	Gm13050
C1qtnf9	RP23-212M22.4	Dbdd1
Mup9	Rpp25	BC030870
Gm29538	Ccdc50-ps	Gm26882
Shc2	Gm45912	Adgrl4
Acp7	Gm1123	RP23-164P21.3
RP23-130L13.2	Clca4a	Dnah7a
Pitpnm3	Abo	Gm16499
RP23-18L24.3	Zfp239	RP23-370L19.2
Gm18294	Sox6	Olf907
Ccdc106	Tmed6	Prss57
Dusp26	Gm26892	Tmem232
Pla2g4e	RP23-18L24.4	4921507P07Rik
Krt28	Gm12631	Cpn2
Gm42769	Gm4691	Gm9823
Hoxc8	Gm15694	Hspa12b
Krtap3-3	Samd12	Gm37694
Gm43061	Gm15903	Gm15382
Gm15763	Gm10717	Gm44421
Hist1h1a	2310079G19Rik	Gm12844
Gm16279	Gm38247	A930001A20Rik
Rncr4	4930447N08Rik	Gm44763
Gm37198	RP24-366H8.3	Gm13351
Gm13094	Gm25925	Nek5
Gm15738	Gm37783	Ereg
Gm6285	Gm45269	Gm17052
Adgrl4	Mrps36-ps2	Efcab10
Hist1h3c	1700016G22Rik	Gm45258

Gm5388	Pitx1	Spag17
Duox1	Gcnt3	Pde7b
Olfir907	Pla2g12b	Tmprss11g
Cacna2d3	Gsdmc	Shh
Gm16210	Gm42788	Gm20547
Hspa12b	2810404F17Rik	Gm26672
Gm20422	Gm28523	Vtn
RP24-284M17.2	Gm12275	Egfl6
Gm11938	Gm43742	Gm6517
Ctla2b	Gm28940	Gm26717
Gm12226	Cyp2c55	4930412C18Rik
Gm45205	E230025N22Rik	Gm43820
Olfir39	Hist1h2bf	Gm42846
Fgf5	Gm17025	Gm16072
Gm19566	Fgl1	Trem1
Tubb4b-ps2	Gm28308	Gm42470
Gp1bb	Igkv6-17	Fign
4930438A08Rik	Nr1h4	Tmem204
Gm32536	Gm20568	Vtcn1
Krt31	Panct2	Gm43268
Ereg	Gm5529	Gm6750
Gm14023	Hoxd10	Gm45055
Gm37255	Gm9320	Crocc2
Shh	Vwa5b2	1700030C12Rik
Shox2	Gm5110	Armc4
Ebf2	Gm38303	Gm11512
Dio3	Gm43011	1700028P14Rik
Vtn	Gm45622	RP23-354J5.3
Egfl6	Gm10384	Phtf1os
Gm7816	Shc2	Gm42451
Hist1h3b	Gm15200	Fam216b
Gm2986	Pitpnm3	Gm15796
Gm27247	Klb	Slc19a3
Slc26a3	Gm17228	Olfir1033
4930431P19Rik	Hist1h1a	Gm45805
Exosc6	Gm16279	Apc2



Tmem204	Gm38268	Gm29237
Gm45630	Gm13050	Gm5689
Ryr1	Gm45000	Nat8f3
Gm7434	Gm13094	RP24-381P6.3
Gm11439	Gm9125	Gm17333
Gm43787	BC030870	Sfrp2
RP23-416I23.9	Hist1h3c	Fbxl13
Gm12176	Dok7	Gm8121
Twist2	Gm5388	Kcnf1
9530013L04Rik	Olfir907	Il22ra1
Asphd2	Hoxd11	Lrrc9
Olfir1033	Hist1h2an	Gpr39
Gm7502	4921507P07Rik	Fpr2
Gm14138	Cpn2	Meox2
Gm37939	Gm43745	Otx1
2410124H12Rik	1700024J04Rik	Edn3
Syt15	Gm14393	Gm16188
Sfrp2	RP24-284M17.2	A230103J11Rik
Gm12618	EU599041	Gm8210
RP24-131G14.10	Gm10718	Wfdc3
Gm9619	Urad	1700095J03Rik
Il22ra1	Gm12844	D830026I12Rik
Hoxb7	D330045A20Rik	9130015G15Rik
Grid2ip	RP23-115A18.3	Lrfn3
Gm7634	B230322F03Rik	Gm6341
Meox2	A730089K16Rik	Gm37285
Gm42651	Scgb2b17	Slc38a5
5830418P13Rik	Gm37844	Fn3k
Gm8210	Mgat4c	Tecrl
Wfdc3	Gp1bb	Sbk3
D830026I12Rik	Nek5	Gm4750
Gm10293	Slc25a34	Fam150a
Gm37113	Gm43141	Gm16794
Lrfn3	Gm44985	Dydc2
Gm6341	Ereg	Hrct1
Rpl29-ps5	Gm17052	Zbbx

Gm17827	Gm45258	Cped1
Gm15712	Gm14023	Ugt1a6b
Slc2a5	Pde7b	Gm44775
H2allm	Gm8325	Gm29763
Il20ra	Scgb2b7	Map7d3
Gm43336	Oxct2a	Gm281
Sele	Gm15595	Gm28857
Lvrn	RP23-128A23.3	Gm7363
Cped1	Gm44609	Nwd1
RP23-55A6.4	Gm16341	Gm44812
Ugt1a6b	Dio3	Bbs10
Gm42508	Nr1i2	Pde3a
Gm45737	Gm12536	Cd93
Gm6677	Gm11534	Papolb
Gm7363	Gm7816	Kenq5
E030024N20Rik	Gm44834	Gm37027
Rpl15-ps5	1700003I22Rik	Gm14861
Rpl19-ps9	Galnt16	1500035N22Rik
Tmeff2	Gm13882	AY036118
Gm11824	Hist1h3b	Golt1a
Rpl21-ps12	RP23-434A12.5	Hepacam
Gm13664	Gm11695	Gm45495
Gm9964	Slc26a3	Clec14a
Cfd	4930431P19Rik	Gm13339
Rnf223	Gm42470	Erich2os
H2allf	Vtcn1	Gm42836
Cd93	Lrrc19	Foxf2
Hist1h4f	Kdm4dl	4932443I19Rik
Nova1	Lancl3	Gm38079
Gm37027	Rpl30-ps11	Hmcn1
Gm6434	Gm11512	Gm44280
Scarna10	RP23-416I23.9	Spata20
Gm42556	Gm10263	Cckar
Ywhaq-ps1	Gm36945	Lmod2
Gm11263	Gm12435	RP24-374N16.7
Gm45495	Hoxa10	C1qtnf5

Gm19620	Rdh18-ps	Sdpr
Mrgprb2	Celf5	Dnah6
Gm7117	Gm7502	Sema6b
Adad2	Olf1116	Kank4
Hist2h2ac	Gm5689	Gm45314
Gm6520	Gm14138	Mterf1b
Necab3	Gm37674	RP23-228C13.5
Hmcn1	Gm27985	Gm15268
Gm45253	Gm10676	Gm10642
Gm45525	Serpinf2	Gm20442
RP24-374N16.7	Themis3	Gm6108
Gm9696	Gm45330	Acss3
Epor	Gm12618	Gm18953
Gm10566	Gm12517	Gm13413
Gm43240	Kcnf1	Glp1r
Gm37653	Il22ra1	Cldn15
C1qtnf5	Gm14706	Nanos1
Det	Hoxb7	Gm11611
Sdpr	Gpr39	Wdr27
Gm13252	D630011A20Rik	Gm6334
Fndc9	Gm42605	RP23-80D20.2
Sema6b	Edn3	4933403O08Rik
Mterf1b	C530043K16Rik	Cd55b
RP23-228C13.5	Igkv4-57-1	Papln
Gm15268	Olf1794	Gm37986
A530041M06Rik	Vdac3-ps1	Shisa7
C130079G13Rik	Gm8210	Podxl
Gm10642	Wfdc3	Olf1750
Mettl7b	Gm5218	Gm45133
Gm5416	Gm10293	Ttc29
Gm26035	Pla2g10	2010320O07Rik
Gm6108	Lrfr3	Kif26b
Acss3	Gm44642	Gm26908
Padi3	Gm6341	Rapsn
Gm4866	Grik2	4930480K23Rik
Gm18953	Gm44768	Wnt7a

Gm13413	Gm37285	RP23-138K22.2
RP24-462I5.2	RP24-84C23.4	Gpr153
Cldn15	Mptx1	Samd13
Gm45692	Gm44253	Slc22a22
Gm11611	Slc2a5	9530036O11Rik
Gm43565	Rps12-ps26	Wdr38
RP23-80D20.2	Cyp2d10	4930547M16Rik
Mif-ps3	H2a11m	9530077C05Rik
Gm6028	Fn3k	Crfl1
Papln	Gm43336	Adrb3
Gm37986	Gm15368	Gm15634
Gm10260	Gm42631	Fam47e
Podxl	Snora73a	RP24-282C4.13
Gm12917	Olftr78	Esm1
Krt27	Gm15657	Gm43809
Gm45059	9530018H14Rik	Wt1
Gm45133	Gm42938	D930020B18Rik
Kif26b	Gm4750	4833427G06Rik
Gpr153	Cped1	Rap1gapos
Wdr38	RP23-55A6.4	Lrrc71
Cbx3-ps7	Rgs8	RP23-419K14.11
Apoo-ps	Ugt1a6b	Fads3
Gm44122	Gm4714	Lrtm2
Gm4945	Tdrd12	Cldn5
Gm7287	RP23-160A1.5	Plekhdl1os
Crfl1	Sstr1	Gm44808
Adrb3	Gm28857	Pcyt1b
Fam47e	Gm7363	Gm16160
Hoxd8	Hrc	Gm26894
Aadacl2	D930036K23Rik	Gm14158
Mettl5os	Olftr267	Gm45311
Hoxc5	Krtap4-16	Gm11520
Rps12-ps21	Rpl19-ps9	Gm8566
E030042O20Rik	Ighv1-12	Rbpjl
Gm20684	Myo3a	Gm16208
Gm6543	Rpl21-ps12	Tmem132c

Fads3	Gm9964	Rerg
Gm8724	Pde3a	Gm6057
Gm43794	Slc30a10	Cfap221
Cldn5	Ckmt2	Sox5
Trpc4	Gm26812	Ccdc160
Pik3c2g	2010109A12Rik	BC043934
Gm45311	Tmem174	Gm26723
Prss12	AY036118	Gm15483
Rerg	Golt1a	Gm10115
Sox5	Scarna10	Iqca
Gm8526	Gm11263	Gm26736
Gm5127	2210019I11Rik	Prdm6
Dhrs9	Gm45495	Tnni3k
Gm5687	Clec14a	Tiel
H2a11b	Gm19620	Ccdc180
Ptx3	RP23-360L4.2	Adcy8
Gm15483	Gm13339	Prex2
Gm27151	Rpl35a-ps7	Gm43437
Tiel	Gm7117	Dnaaf1
Gm37809	Gm5587	Cfap57
Abcg4	Gm45206	Gm37499
RP24-286J14.3	Wdr17	E430024P14Rik
Gm9134	Hist2h2ac	Gm15892
Gm44940	Cyp2u1	1700021F13Rik
Gm7803	Gm6520	Mzb1
Prex2	Gm14730	Erich2
Mmp10	Hmcn1	Mmrn2
Cd209g	Fmo4	Gm26526
RP23-358O14.2	Cyp2c66	Gm43703
Cfap57	Acot4	Olfir729
Hoxa9	Gm10566	Dydc1
Gm7850	Dct	Rcan2
Gm43008	Sdpr	Agtr1a
Gm6155	Sema6b	Gm15998
Gm13035	Mterflb	Gm14409
Mzb1	RP23-228C13.5	Adam32

Gm16229	Gm35106	Spag8
Mmrrn2	A530041M06Rik	Gm8464
Rcan2	Nr5a2	Gm5898
Gm16020	Gm10481	1700003E16Rik
Agtr1a	Mettl7b	Fam81b
Gm14921	Gm20442	Gm3724
Gm44153	RP23-225H6.2	Gm43017
RP23-151L20.3	Gm26035	Irx3os
1700011L22Rik	Slc10a5	Ldlrad1
Gm4987	Acss3	Gm12473
H2al1i	Gnal	Lgi3
Gm9959	Gm18953	Gm9001
1700003E16Rik	Gm13413	Gm29044
Gm3724	RP24-462I5.2	Agr3
Gm17934	Cldn15	Gm6981
Gm15707	Gm12468	Peg10
Gm12590	Nanos1	Kcnip4
Ptch2	RP23-80D20.2	Syt9
Gm5084	Gm6028	Sema3e
5830416I19Rik	Gm37986	B930082K07Rik
Gm26712	Gm10260	4732496C06Rik
Gm15918	Shisa7	Gm43343
Ntrk2	Podxl	Gm13199
Irx3os	RP23-288C18.3	Gm26641
Gm7027	Gm45133	Tcf21
Gm15502	Gm4525	Gm15304
Gapdh-ps14	Adgrf1	Abcc9
Gm29228	Malrd1	Etohd2
Elov13	2010320O07Rik	Rpl31-ps11
Gm13268	Gm26908	Cfap157
Sema3e	Gm16556	Lrriq3
Gm18131	4930480K23Rik	Gm35315
3110080O07Rik	Samd13	Gm43429
Abcc9	9530036O11Rik	Abca6
Etohd2	Gm27149	Adcy4
Gm15210	Gm44122	Wif1

Gm12602	Gm7287	Cda
Rpl31-ps11	Ctrf1	Hopxos
Gm7335	Hoxd8	Col28a1
Stk19-ps1	Gm28330	Gm13862
B930036N10Rik	Gm45715	Ccdc103
Gm3940	9230111E07Rik	Catip
Abca6	Gm43809	Gm6560
Rps15-ps2	Rprml	Gm17530
Tmem252	E230001N04Rik	Gm16006
Gm5879	E030042O20Rik	Syt14
Adcy4	Gm5256	Adamts15
Mroh6	Rap1gapos	Ptgis
Gm14165	RP23-438J1.7	Gm14225
Gm14053	RP23-419K14.11	Cd109
S1pr4	Gm6335	Gm16364
Wif1	4921536K21Rik	1810008I18Rik
Gm45239	Fads3	Tmc3
Hopxos	Gm5884	Pm20d2
Gm17214	Plekhd1os	Cdk11
Prrt2	Pik3c2g	Tmem178
Gm7867	Duox2	Gabra3
Tpt1-ps1	Gm5424	Lamc3
Adamts15	Gm13363	Prmt8
Ptgis	Gm45004	Gm7468
Cd109	Gm45311	E330018M18Rik
Otop3	Hao2	Mlana
Gm5900	Tmem132c	RP23-447F22.4
Scml2	Rerg	Nrip3
H2allg	Sox5	C5ar1
Gm7860	Gm10110	Gm28289
Btnl9	AI481877	Thsd1
Gm9750	Dhrs9	Piezo2
Gm17825	Gm15483	Gm43085
4930405N21Rik	Pnliprp2	Gm8098
Gm29994	Krt39	Tspan11
Pm20d2	Gm26736	Ftl1-ps2

Gm13511	Gm6266	Gm26671
Gm4853	RP24-286J14.3	Rab3c
Gabra3	Pax4	C430014B12Rik
Gm12307	Gm7803	Gm6969
Gm37025	Prex2	Mfsd4b3
Gm13688	Ankdd1b	Gm14493
Nrip3	Ces2d-ps	Gm6030
C5ar1	Chodl	4933406C10Rik
Gm10913	Ins15	Tekt3
Thsd1	Hoxa9	B230206H07Rik
Gm16353	Gm7850	2900005J15Rik
Slc16a14	Tmem182	Ankfn1
Gm15406	Slc9a3	Gm43712
Gm38282	E430024P14Rik	Gm19280
Gm37260	Rpl21-ps4	Gm15541
Tspan11	Gad2	Pon1
Gm16297	Gm15947	Dcdc5
7530428D23Rik	RP24-189I2.4	Ccdc146
Gm45749	Gm27817	Zfp977
Krt33a	Fzd9	Omd
Klra13-ps	Gm29107	Angptl8
Gm38384	Olfir729	Muc20
Gm17828	Gm8662	Caps2
Gm14493	Rcan2	Ccna1
B230206H07Rik	Mtnr1a	C87198
Gm45700	Gm21738	Gm11274
Dio2	Gm16020	Wnt2
Gm16143	Agtr1a	Atp6v0c-ps1
1700030L20Rik	Gm14921	Col4a3
Gm5644	Gm14409	Gm12264
Ankfn1	Gm8464	Gm6977
Rpsa-ps12	Tdrd1	Mmp3
Gm43712	Gm5898	Slc2a10
Gm8976	Gm43654	Dach1
Gm7730	Gm43017	Fmo6
Gm45243	D630023O14Rik	Fancb



Itih5	5830416I19Rik	Gm45818
Gm43720	Ntrk2	Clstn2
Gm14398	Gm15502	Gm38393
Gm14688	Gm29044	Gm44431
Gm42776	Agr3	Ccbe1
Gm5451	Gm29228	Gm9687
Gm15497	Gm13268	Gm5566
Gm43289	Gm17669	Ankrd45
Gm7504	2310016G11Rik	Gm28044
Omd	Ldb3	Scara5
Gm7722	Gm13199	Emcn
Gm9083	Gm26641	Oit3
Rpl5-ps1	Tcf21	Gm17344
Gm15466	Gm43525	4930562C15Rik
Gm8502	Gm15304	Pate4
Gm5279	Etold2	Dnah1
Gm6525	Rpl31-ps11	Pcsk1
Piwil2	Lrriq3	Platr21
Wnt2	Gm28588	4930506C21Rik
Gm20786	Gm35315	C6
Atp6v0c-ps1	Gm43429	D130043K22Rik
Il1f8	Galnt6os	Gm37829
Ptprr	Htr4	Gm20463
Mmp3	Gm5843	Pde6a
Gm45187	9130410C08Rik	Doc2a
Rpl3-ps2	Rps15-ps2	Nnmt
Gm42797	Tmem252	Gm17354
Gm7561	Gm5879	Gm5876
Dach1	Cyp2d40	Rab40b
Rps2-ps4	Erich4	Gm32200
Mirg	Ms4a12	Gria1
Gm5	Gm14165	Gm5559
Ucn2	Gm15638	Fgf2
Il17rd	Wif1	Gm16432
Fancb	Cda	Gm12523
Gm16276	Col28a1	Gucylb3

Gm11687	Gm6560	RP24-390M17.1
Gm9687	Gm45073	Daw1
Gm15715	Gm5340	Gm22043
Gm5566	Gm17530	G730003C15Rik
RP23-104D6.2	RP23-444E13.1	Gm38197
Scara5	Ccdc92b	Gm13246
Emcn	E230020D15Rik	Gpm6a
Gm5312	Adamts15	Gm37752
Gm20637	Gm44041	Elfn1
Gm43738	Hoxa13	Gm17087
Tpd52-ps	Gm8618	Gm45792
Gm11937	C1ca4b	Ankrd66
Gm3828	Scml2	Hmgcll1
Gm6633	Celsr3	Gdf9
Il22ra2	1810008I18Rik	Gm13841
Rpsa-ps2	Pm20d2	Gm42757
Ebf3	Gm16984	Gm37516
Gm11525	Cdk11	Gm43609
Rbm8a2	Gm42614	Gm11963
Dsc1	Gpr119	Tmem178b
Nnmt	Kcnv2	Gata5
Gm17354	RP23-447F22.4	Tbx2
Llph-ps1	Hoxd12	Lrguk
Gm10775	Gm43181	Ifit1bl2
Npbwr1	Gm17909	Gm11407
Rab40b	BC025446	Col4a6
Rpl27a-ps1	Nrip3	2510017J16Rik
Cdh6	Bmp8b	Gm42675
Gm45319	Gm3839	Fam198a
Dlx2	Piezo2	Gm17077
Gm7384	D330020A13Rik	1700097M23Rik
Fgf2	Myt1	Fam184a
Gm9774	Gm7123	Pih1h3b
Gm42514	Gm7429	Gm16118
Lrrn2	Gm10719	Lrrc43
Gm9701	7530428D23Rik	1700001L19Rik

Gm13380	Ugt2b35	Gm28055
Gm11604	Gm45749	1700022I11Rik
Gucy1b3	Rab3c	Ism1
G730003C15Rik	9130208D14Rik	Zfp708
Gm13246	Gm5485	Gm29427
Rnf165	C430014B12Rik	Mdh1b
Olfr398	Gm6969	Gm12164
RP23-449K22.2	Lrr1	Npn2
Gm45792	Mfsd4b3	Eno4
Rps19-ps8	Gm14493	Apobec4
Gm5829	Gm6030	Rftn2
Gdf9	Gm34821	C030032O16Rik
Gm13841	4933406C10Rik	Gm1661
Hipk4	Gm2308	Zfp879
Hist1h3g	Pkhd1	Plcb1
Rpl21-ps7	Gm16143	Kif27
Fam167b	Gm43712	Sycp1
Anapc15-ps	Acsm3	Aplnr
Gm5921	RP23-70B19.5	9430065F17Rik
Tbx2	Gm8976	Gm33248
Mrgprb3	Gm7730	Pcdhga8
Hist1h2bm	Itih5	Slc35g3
Gm38374	Gm14398	Zfp133-ps
Col4a6	Hist1h2ab	Plscr4
Smarce1-ps1	Gm5451	Abra
Rpl36-ps9	Pla2g10os	Scarna13
RP23-265F16.6	Rfx6	Got111
Gm7676	Gm7504	Sox17
Gm10571	Greb1	Magix
Ism1	Gm15895	Gm5640
C130032M10Rik	Gm9083	Gm37401
Kprp	Angptl8	Gm45379
H2al1c	Cyp2c69	Ppp1r3c
RP23-257B9.1	Ccna1	Srpx
Tcap	Gm12209	Gm43126
Gm45181	Gm44152	Lrp2bp

Krtap15	Atoh1	Phex
Gm42679	Gm27383	Ak9
Gm42816	Olfrl161	Ppp1r42
RP23-158J3.1	Tubal3	Gm29233
Gm2796	B430219N15Rik	Slc16a4
H60c	Gm6977	Mbl1
Lgr5	Ptpr	Wnt3a
Rftn2	Gm37979	Tnfrsf25
Gm26737	Gm30613	Stpg1
Gm12971	Slc2a10	Slc35d3
Gm8520	Rpl3-ps2	Astn2
Gm45774	RP24-83B1.3	Cacna2d4
Adgrf2	Fstl4	1700024G13Rik
Aplnr	Gm11578	Gm14387
9430065F17Rik	Dach1	Gm19918
Kens1	Gm11560	Gm26569
Rpl13a-ps1	Mirg	Gm43843
Pdzd7	1700064H15Rik	Efcc1
Gm12458	9430093N23Rik	Veph1
Gm5937	Il17rd	A230057D06Rik
Plscr4	Fancb	Gm37313
Scarna13	Gm25843	Gm28229
Msx2	Gm38393	Gm37204
Cd300lg	Gm9687	Mkln1os
Gm18562	Gm5566	Chst4
Gm43309	Avpr1b	Gad1os
Gm23085	RP23-424C4.7	Slc25a18
Sox17	Slc36a1os	Gm13713
Heph1l	Gm27454	Gm11767
Gm9238	Scara5	Gm12946
Gm2539	Pkdrej	RP23-136M3.13
Hmga1-rs1	2010106E10Rik	Zfp820
Eno1b	Gm23927	
Ppp1r3c	Pcsk1	
Lhx6	Igkv14-111	
RP24-418L10.2	Pcsk1n	

Hmgb1-ps6	C2cd4c	
Srpx	Gm27572	
Il31ra	Gm15373	
Gm7909	Gm45397	
Serpinb3b	Rpsa-ps2	
Gm29233	Pde6a	
Gm10284	Gm44267	
Wnt3a	Gm11437	
Tnfrsf25	Myrip	
Tcf15	1500005C15Rik	
Acer1	Naip1	
4930412O13Rik	4930509E16Rik	
Gm15779	Gm11525	
Crispld1	Pitx2	
Gm43843	Gm5876	
Gm8806	Neurod1	
Itga2	Gm10358	
Gm37313	Rab40b	
Gm28229	C030029H02Rik	
Mkln1os	Gm5559	
Gm8925	Gm7384	
Fam83c	Gm11619	
Gm13409	Gm42514	
Gm13548	Gm9515	
Gm12946	Tex12	
Gm10364	Gm8463	
Gm11599	Gm16432	
Gm24105	Grin1os	
	Bmp8a	
	Gm11604	
	Gucy1b3	
	Gsdmcl-ps	
	Ugt2b36	
	Gm38319	
	RP24-390M17.1	
	Gm13246	

2310069B03Rik
Gm4412
Tmem181c-ps
Oxct2b
Gm37752
Gm9958
4833422M21Rik
Sult1b1
Gm17087
Gm45792
Slc38a11
Platr26
Gm44432
Gm13841
Hipk4
Hist1h3g
Gm9117
Gm17619
Gm43609
Gm11963
Gm8540
Rps2-ps13
Hist1h2bm
Ifit1bl2
Asb16
RP23-2A21.2
Cyp2d9
RP23-265F16.6
Pdzd3
Gm15710
Bcas1os1
Gm12164
Gm13261
Gm42975
Pla2g2c
H60c

Lgr5
Rftn2
Gm26737
C030032O16Rik
Cyp2c65
Amd-ps3
Gm4961
Plcb1
Slco1a6
9430065F17Rik
Rpl13a-ps1
Pdzd7
Gm12482
Gm5937
Plscr4
Scarna13
Scgb1b3
Gm9238
Gm37401
Gm45379
Hmga1-rs1
RP24-418L10.2
Gm16243
Gm29233
Slc13a2
Gm28040
Tnfrsf25
Fbxw22
C330021F23Rik
RP23-156N5.2
Acer1
Slc35d3
5031415H12Rik
Gm43823
RP23-345J24.2
Hrg

Gm14387	
A230103L15Rik	
Chrm1	
Gm10268	
Gm43843	
Gm13421	
Cyp2d34	
Itga2	
Gm28229	
Chst4	
Gm8925	
Gm16307	
Fam83c	
Gm11767	
RP23-184H3.5	
Gm16005	
Zfp820	
Gm24105	



**Table 3-S2 List of MAP-source genes translated only in extrathymic ECs**

MAP-source genes unique to skin ECs			MAP-source genes unique to colon ECs			MAP-source genes unique to lung ECs					
H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>			
Bmp4	Abcc9		Acsm3	Foxa3	Nr5a2	Mlc1	Caps2	Hydin			
Ptprb	Aoc3		Bmp4	Lgr5	Pde3a	Bmp5	Gria1	Pde3a			
	Btnl9		Bmp5	Ppara	Sdpr	Ptprb	Abcc9				
	Lgr5		Nrlh4	Ptpr		Ednrb	Dach1				
	Nox4		Nrl12			Glp1r	Tbx4				
	Sdpr		Nrl13				Bmp4		Sdpr		
											Tead4
											Mmrn2
											Thsd1
											Gata6
Nox4											
Edn3											
Kank4											
						Tie1					

<b>Table 4-S3 List of MAP-source genes shared exclusively by extrathymic ECs (extraTECs) and thymic DCs (tDCs)</b>								
MAP-source genes shared exclusively by skin ECs and tDCs			MAP-source genes shared exclusively by colon ECs and tDCs			MAP-source genes shared exclusively by lung ECs and tDCs		
H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>
Ston1	Pgap1		Mertk	Eepd1	Gvin1	Cd38	Eepd1	Mertk
	Zeb2		Cd38	Pgap1		Ston1	Pgap1	Gvin1
			Ston1	Zeb2		Zbed6	Hecw2	
			Zbed6			Esyt3	Zeb2	

<b>Table 5-S3 List of MAP-source genes shared exclusively by extrathymic ECs (extraTECs) and mTECs</b>								
MAP-source genes shared exclusively by skin ECs and mTECs			MAP-source genes shared exclusively by colon ECs and mTECs			MAP-source genes shared exclusively by lung ECs and mTECs		
H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>
Acer2	Acox1		Acer2	Cd177	Dpyd	Abcb9	Ace	Clic5
Ano1	Anxa8		Ano1	Egfr	Lama3	Acer2	Aqp1	Cnn1
Epas1	Cd248		Ano9	Ephb2	Muc2	Ano1	Cpeb1	Lama3
Fat2	Cpeb1		Ccl11	Gpat3	Nos2	Cftr	Cspg4	Myo1d
Fzd6	Cspg4		Cftr	Lama2	Prom1	Dpyd	Egfr	Ptprk
Lama3	Dapl1		Clic5	Lamb2	Synpo	Ehd2	Kcnn3	Ptprm
Lbp	Dmd		Cnn1	Liph		Elf3	Lamb2	
Myo1d	Dsg3		Degs2	Mpdz		Epas1	Mfap4	
Ptprm	Egfr		Disp2	Nfib		Gpc3	Mpdz	
Rbp2	Lamb2		Dmbt1	Npas2		Gpr88	Nfib	
Xrcc5	Matn2		Dpep1	Pak6		Hkdc1	Padi4	
	Mfap4		Elf3	Pigr		Lbp	Pard3	
	Nfib		Epas1	Pof1b		Mark1	Podn	
	Padi4		Ggt6	Ptprg		Mia	Prom1	
	Pak6		Gstal	Ripk4		Nptx1	Ptprg	

	Podn		Hkdc1	Sgsm1		Osr1	Ripk4	
	Postn		Mark1	Tead1		Plce1	Sall2	
	Prom1		Mep1b	Tgm3		Pof1b	Synpo	
	Ripk4		Mgat3	Trib2		Rbp2	Tead1	
	Tbx15		Mia	Trpc1		Rgs9	Tmod1	
	Tead1		Myo1a	Vwf		Sgpp2	Tmtc1	
	Tgm3		Myo1d			Sulf1	Trib2	
	Tmtc1		Pcsk5			Trpm6	Trpc1	
	Vwf		Plce1			Upk3b	Vwf	
	Zfp30		Rbp2			Xrcc5		
			Sgpp2					
			Sulf1					
			Syn					
			Trpm6					
			Xrcc5					
			Zgl6					

<b>Table 6-S3 List of MAP-source genes expressed in extrathymic ECs (extraTECs) and thymic APCs (mTECs and thymic DCs (tDCs))</b>								
MAP-source genes shared by skin ECs and thymic APCs			MAP-source genes shared by colon ECs and thymic APCs			MAP-source genes shared by lung ECs and thymic APCs		
H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup>	H2-D <sup>b</sup>	H2-K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>
Abcg1	Abca2	Ap1b1	Abcg2	Abcb6	Stab1	Abcg2	Abca1	Stab1
Acox1	Abca7	Ap2a1	Atp9a	Frmd6	Tlr3	Atp9a	Abcb6	Tlr3
Ado	Abcd1	Ap2a2	Cgnl1	Lifr	Abcd1	Cgnl1	Adecy3	Acox1
Ampd2	Abl2	Cpeb2	Dnal1	Mafb	Acox1	Dnal1	Csf1r	Alg12
Ano10	Acaca	Drg2	Emb	Mmp15	Aip	Emb	Lamp3	Als2
Anxa4	Acbd6	Ep400	Eya2	Per2	Alg12	Eya2	Lifr	Ap1b1
Ap4s1	Adk	Fas	Galk1	Pparg	Als2	Fmnl3	Mafb	Ap1g1
Arpc3	Agfg1	Fmnl2	Gipc2	Aatf	Amfr	Galk1	Mmp15	Ap2a1
Arrb2	Aip	G3bp2	Ptgr1	Abca2	Ap1b1	Ghr	Per2	Ap2a2
Atp5e	Aktip	Ilk	Rrp12	Abca7	Ap1g1	Gpnmb	Pparg	Apbb2
Atr	Als2	Lyst	Smtn	Abcd3	Ap2a1	Gpx3	Rgl1	Ascc3

Bag6	Anxa2	Med23	Tbx3	Abi3	Ap2a2	Tbx3	Aatf	Atrx
Baz2a	Ap1g1	Mta2	Ypel1	Abl2	Ascc3	Ypel1	Abca2	C2cd3
Bcas3	Ap3b1	Mtmt6	Aar2	Acaca	Bag6	Aar2	Abca7	Cbr2
Brat1	Ap4e1	Nav1	Abcg1	Acs11	Birc6	Abcg1	Abcd1	Chd8
Btg3	Api5	Nipa1	Acap2	Adck5	Chd8	Acad9	Abi3	Cpeb2
Cav2	Apoe	Nol11	Acly	Adk	Clcn2	Acap2	Abl1	Ddx10
Ccng1	Aqr	Plin2	Actn4	Adpgk	Cnot4	Acly	Abl2	Ddx46
Cdk2	Ascc3	Ppard	Ada	Afap1	Cpeb2	Acsf2	Acaca	Ddx6
Cenpo	Asfla	Stt3b	Ado	Agfg1	Ddx6	Acs14	Acs11	Drg2
Chd1	Ash11	Tanc1	Ahsa1	Aimp1	Dlg1	Ada	Adck1	Ehd1
Cherp	Aste1		Akt1	Aimp2	Drg2	Ado	Adcy6	Ep400
Clcn2	Atad5		Alg8	Aktip	Ehd1	Agap3	Adk	Esyt2
Cnot1	Atel1		Ampd2	Ano6	Erbb3	Akt1	Adnp	Exoc4
Cnot3	Atg2b		Ano10	Ap3b1	Esyt2	Alg14	Adpgk	Fas
Cnot4	Atg7		Anxa4	Armc8	Fas	Ampd2	Afap1	Fem1c
Cog1	Atm		Anxa7	Ash11	Fem1c	Ano10	Aff4	Fmnl2
Copg2	Baz1b		Ap3d1	Aste1	Fmnl2	Anxa4	Agfg1	Fntb
Cox14	Bbs4		Ap4e1	Atad5	G3bp2	Anxa7	Aimp1	Fry
Cul3	Bcam		Ap4s1	Atg2b	Hltf	Ap3d1	Aimp2	G3bp2
Cwc22	Bcar3		Apbb2	Atp5h	Hook1	Ap4s1	Aip	Here2
Dapk1	Bcl10		Arpc3	Bag2	Huwe1	Aqr	Aktip	Huwe1
Deakd	Bcl9		Arrb2	Bag4	Ilk	Arpc3	Amer1	Ilk
Ddx27	Bcor		Atp5e	Baz1a	Ldha	Arrb2	Amfr	Keap1
Ddx46	Bnip3		Atp9b	Bbs4	Lyst	Asap3	Ampd3	Lyst
Ddx6	Brca2		Avl9	Bcar3	Macf1	Atp5e	Ano6	Macf1
Dhrs3	C1qbp		Baz2a	Bccip	Mta2	Atp9b	Ap3b1	Mon2
Disp1	C2cd3		Bcas3	Bcl9	Mtmt6	Atr	Ap4e1	Mta2
Dock1	Cby1		Brat1	Bcor	Nav1	Avl9	Api5	Myh10
Dock6	Ccna2		Btbd1	Birc2	Nlrc4	Bag6	Apoe	Mylk
Dpp8	Ccnd3		Btg3	Blm	Nol11	Baz2a	Armc8	Nav1
Eci2	Ccs		Cand1	Bnip3	Nop56	Bcas3	Asb13	Ndrgl
Eif3a	Cd47		Cav2	Brca2	Pan2	Brat1	Asfla	Nfl
Eif3k	Cdc37		Cbr1	C1qbp	Pcid2	Brd8	Ash11	Nipa1
Elf1	Celf2		Ccne2	C2cd3	Plcb2	Bri3	Aste1	Nisch
Fancc	Cenpe		Ccng1	Carm1	Plcg1	Bscl2	Asx12	Nlrc5
Fem1c	Cep85		Ccng2	Casz1	Poc5	Btg3	Atad5	Nod1

Fen1	Chac1		Ccn1	Cby1	Ppard	Cand1	Ate1	Nol11
Fv1	Chd8		Ccz1	Ccna2	Sbno1	Cav2	Atg2b	Nop56
Gpat4	Clip1		Cdc16	Ccnd3	Stt3b	Ccne2	Atg7	Nr1d2
Gpt	Cmc1		Cdk2	Ccs	Syne1	Ccng1	Atm	Pan2
Hac11	Cope		Cdk4	Cd2ap	Syne2	Ccng2	Atp5h	Pcid2
Haus3	Coq9		Cers5	Cdc20	Tanc1	Ccn1	Atrn	Pcna
Hells	Cox7c		Cers6	Cdc37	Tap2	Ccz1	Bag2	Phf2
Hexb	Cul7		Chd1	Cdc51	Tln1	Cdc16	Baz1a	Plcg1
Hip1r	Cul9		Cherp	Cdv3	Wdfy3	Cdk2	Baz1b	Plrg1
Hpgds	Cxcr2		Chp1	Celf1	Xpot	Cenpo	Bbs4	Poc5
Hsf2	Dep1b		Clock	Cenpe	Yif1a	Cers5	Bcam	Ppard
Igf1r	Ddb1		Clspn	Cep70	Zfp62	Cers6	Bcar3	Pygm
Ipo11	Ddx10		Cnih4	Cep85	Zw10	Chd1	Bccip	Sbno1
Ipo8	Ddx5		Cnot1	Chac1		Cherp	Bcor	Setx
Itp2	Decr2		Cnot3	Chd9		Clen2	Birc2	Sf3b3
Jund	Dek		Cnot8	Chmp3		Clock	Birc6	Sgk1
Kat2a	Dhcr7		Cog1	Clip1		Cnih4	Blm	Stt3b
Lmf2	Dhx15		Cog8	Cmc1		Cnn2	Bnip3	Syne1
Lsm2	Dhx32		Copg2	Cog4		Cnot1	Bra2	Syne2
Ltbp3	Dmx11		Coq7	Cope		Cnot3	C1qbp	Tanc1
Matr3	Dnmt1		Cox14	Coq9		Cog1	Cand2	Tap2
Msh2	Dock7		Cul2	Cox7c		Copg2	Casz1	Tcf25
Mtmt1	Dpp3		Cul3	Csde1		Cox14	Cbr4	Tln1
Mtor	Edem3		Cwc22	Cul7		Cul2	Cby1	Ubr4
Myd88	Edf1		Cxcr4	Cul9		Cul3	Ccna2	Vps8
Myh9	Efr3a		Dapk1	Dapk3		Cwc22	Ccnd3	Xpot
Myo1b	Ehd1		Dcakd	Dep1b		Cxcr4	Cent1	Zw10
Myo7a	Eif1		Ddx27	Ddb1		Dapk1	Cer12	
Nacc2	Eif3i		Ddx47	Ddx10		Dcakd	Ccs	
Nampt	Elf4		Dhx29	Dek		Ddx27	Cd2ap	
Narf	Elmo1		Dnpep	Der11		Ddx47	Cd47	
Narf1	Elmo2		Dock1	Dhcr7		Dhrs3	Cdc20	
Ncdn	Elp2		Dock6	Dhx15		Disp1	Cdc37	
Nedd4	Ep300		Drg1	Dhx32		Dock1	Cdc51	
Nisch	Epn2		Dyrk2	Dmx11		Dock6	Celf2	
Nod1	Erh		Ece2	Dnmt1		Drg1	Cep70	

Nop56	Ermp1		Ech1	Dock7		Dyrk2	Cep78	
Nosip	Esyt2		Eci2	Dpp3		Ech1	Cep85	
Nude	Ets2		Ehd4	Dqx1		Eci2	Chac1	
Ogg1	Exd2		Ehf	Dtl		Ehf	Chd9	
Pa2g4	Exoc3		Eif3a	Dtx2		Eif3a	Chmp3	
Pan2	Ext2		Eif3b	Edem3		Eif3b	Cinp	
Phtf1	Eya3		Eif3k	Edf1		Eif3c	Cldn1	
Plec	Fbx15		Eif3l	Efnb2		Eif3k	Clip1	
Ppwd1	Fes		Elf1	Efr3a		Eif3l	Cmc1	
Prex1	Flii		Emc1	Eif1		Elf1	Cnot4	
Prps1	Foxj3		Ep400	Eif3i		Emc1	Cog4	
Psm3	Foxm1		Epc2	Elf4		Epc2	Cope	
Pwp2	Foxo3		Ercc2	Elmo1		Ercc2	Coq9	
Rbl2	Foxp1		Erp44	Elp2		Erf	Cox7c	
Rel	Frmd8		Exoc4	Ep300		Esyt1	Csde1	
Rer1	Fry		Exoc7	Epn2		Fance	Cstf2	
Riok3	G2e3		Fance	Erb2		Fen1	Cul4b	
Rpap3	Gfpt1		Flnb	Erh		Fgd2	Cul7	
Rrp36	Git1		Fnta	Ermp1		Flnb	Cul9	
Sar1a	Gmeb2		Fntb	Etaa1		Fnta	Dapk3	
Sbno2	Golm1		Foxk1	Ets2		Foxk1	Dcp1b	
Scap	Gon4l		Fv1	Exd2		Fv1	Ddb1	
Senp6	Gpd1l		Gale	Exoc6		Gbp4	Ddx5	
Setd3	Gpkow		Glr3	Ext2		Gbp5	Dek	
Sf3a1	Gpsm1		Gpat4	Eya3		Gcc1	Der1l	
Sgk1	Grhl1		Gstm1	Fbx15		Gpat4	Dgkz	
Smg8	Grn		Haus3	Fem1b		Gpt	Dhcr7	
Snx27	Gtdc1		Hck	Fes		Gstm1	Dhx15	
Sos1	Hcfc1		Hdac4	Flii		Hac1l	Dhx32	
Srprb	Herc2		Helb	Foxj3		Haus3	Dhx57	
Ssbp2	Herc6		Hells	Foxo3		Hbp1	Dlg1	
Ssrp1	Hgs		Helz	Foxp1		Hck	Dmx1l	
St7l	Hipk1		Herc2	Frmd8		Helb	Dnmt1	
Stat3	Hipk2		Hexb	Fsd1l		Hells	Dock7	
Stt3a	Hmox1		Hic2	G2e3		Helz	Dock8	
Surf4	Hsdl2		Hip1r	G3bp1		Hexb	Dpp3	

Tcf25	Huwe1		Hpgds	Gcc2		Hic2	Dtx2	
Tdg	Inf2		Hsf2	Gcnt4		Hip1r	Edem3	
Tex2	Ino80		Ift52	Gfpt1		Hltf	Edf1	
Tgds	Ipo4		Igf1r	Gga3		Homez	Efr3a	
Tmc6	Keap1		Insr	Ggt5		Hsf2	Eif1	
Tmx2	Kif1b		Ipo11	Gin1		Idua	Eif3i	
Tob1	Kifc1		Ipo7	Gmeb2		Igf1r	Elf4	
Tpd52	Lamp2		Ipo8	Golm1		Il4ra	Elmo1	
Trim2	Ldhb		Irak2	Gon4l		Ipo11	Elmo2	
Tsr1	Lonp2		Irak4	Gpd11		Ipo8	Elp2	
U2af2	Lrch3		Irf1	Gpkow		Irak2	Ep300	
Ubr1	Lrif1		Itpr1	Grhl1		Itpr1	Epha2	
Ubr2	Lrp4		Itpr2	Gm		Itpr2	Epn2	
Ubr4	Lrwd1		Jund	Gtde1		Jak3	Erbp2	
Utp20	Ltn1		Kat2a	Hcfc1		Jund	Erh	
Uxs1	Luzp1		Keap1	Herc6		Kank3	Ermp1	
Vma21	Ly6d		Lacc1	Hgs		Kat2a	Etaa1	
Vps16	Ly86		Lgmn	Hipk1		Kif1a	Ets2	
Vps29	Macf1		Lin37	Hipk2		Kif1b	Exd2	
Vps41	Magi3		Lmf2	Hira		Lacc1	Exoc3	
Vps51	Manba		Lrp10	Hmox1		Lin37	Exoc6	
Wdr20	Mark2		Lsm1	Ifit1		Lmf2	Ext2	
Wipi2	Mbnl2		Lsm10	Ino80		Lsm10	Fanc1	
Xpo1	Mcm6		Lsm2	Ipo4		Lsm2	Fbx15	
Yif1a	Mcts1		Ltbp3	Irf2		Ltbp3	Fem1b	
Ypel5	Med14		Lyn	Isg15		Lyn	Fes	
Znfx1	Med27		Lztr1	Itch		Matr3	Fgd5	
Zw10	Mib1		Magt1	Kcmf1		Mcmbp	Fhod1	
Abcg2	Mon2		Matr3	Kifc1		Mdm2	Flii	
Atp9a	Msl2		Mcmbp	Kiz		Med12	Foxj3	
Dnal1	Msmo1		Mcu	Klc1		Micu1	Foxm1	
Emb	Mta3		Mdm2	Lamp2		Mks1	Foxo3	
Eya2	Mttr4		Micu1	Lcor		Mob3a	Foxp1	
Galk1	Mylip		Mkfn2	Ldhb		Mob3c	Frmd8	
Ypel1	Mylk		Mks1	Limk2		Mrs2	Fsd11	
	Myo9a		Mob3c	Lonp2		Msh2	Fto	

Naa15	Mpi	Lrch3	Mtmr1	G2e3
Nadk	Mrs2	Lrif1	Mtor	G3bp1
Ncf2	Msh2	Lrp4	Mutyh	Gcc2
Ncor1	Mtmr1	Luzp1	Myd88	Gin1
Ndrp1	Mtor	Madd	Myh9	Git1
Nfix	Myd88	Magi3	Myo1b	Gmeb2
Nfkb2	Myh10	Manba	Myo5a	Golm1
Nlrc5	Myh9	Map4	Myo7a	Gon4l
Nomol	Myo1b	Mark2	Nampt	Gpd1l
Npc1	Myo5a	Mast4	Narf	Gpkow
Nprl3	Myo7a	Mavs	Narfl	Gpsml
Nsd1	Nacc2	Mcm10	Ncdn	Grn
Ntng2	Nampt	Mcm6	Ncf2	Gsel
Oasl2	Narf	Mcts1	Ndrp2	Gtdc1
Oat	Narfl	Med23	Ndrp3	Hcfc1
Orc3	Ncdn	Med27	Nedd4	Hdac6
Orc5	Ncf2	Mib1	Ngly1	Herc6
Otud4	Ndrp2	Mib2	Nmt1	Hgs
Paf1	Nedd4	Mkl1	Noc2l	Hipk1
Paip1	Ngly1	Mkln1	Nol6	Hipk2
Parp2	Nisch	Mon2	Nosip	Hmox1
Pcbp1	Nmt1	Mpp5	Nsf	Hyou1
Pcm1	Noc2l	Msl2	Nudc	Ifit3
Pcna	Nod1	Mtf1	Nxt1	Il16
Pdcd5	Nol6	Mtmr4	Ogg1	Ing1
Pdia3	Nosip	Mtmr7	Oma1	Ing2
Pds5b	Nsf	Myb	Pa2g4	Inmt
Per1	Nudc	Mylip	Pde5a	Ino80
Pex13	Nudt7	Mylk	Peli1	Ipo4
Phf12	Oasl1a	Myo9a	Phf14	Irf2
Pi4kb	Ogg1	Myzap	Phtfl	Isg15
Pias2	Oma1	N4bp1	Pin1	Itch
Pja2	Otub1	Naa15	Pkd1	Itsn2
Pkd2	Pa2g4	Naa16	Plcb3	Kdm6a
Plal1a	Pde5a	Nadk	Plec	Kiz
Plcgl	Pef1	Ncor1	Plin2	Klf4



Pleg2	Peli1	Ncor2	Pomt2	Klhl8
Plk2	Phf14	Ndrp1	Ppt2	Lace1
Plod1	Phtf1	Nf1	Ppwd1	Lamp2
Plod3	Pick1	Nfix	Prps1	Ldha
Plrg1	Pin1	Nfkb2	Psm3	Ldhd
Pnkp	Plcb3	Nit2	Psme1	Limk2
Ppih	Plec	Nomo1	Pwp2	Lonp2
Ppm1b	Plin2	Npc1	Rbl2	Lrch3
Prc1	Plrg1	Nprl3	Rbm4b	Lrfl1
Preb	Pomp	Nqo2	Rel	Lrig2
Prkdc	Pomt2	Nsd1	Rer1	Lrp4
Prkra	Pon2	Nsd3	Rfc2	Lrwd1
Ptcd2	Pop5	Oasl2	Rfwd3	Ltn1
Pxk	Ppt2	Oat	Riok3	Luzp1
Pygl	Ppwd1	Orc3	Rnf10	Ly6d
Rab14	Prdx3	Otud5	Rpap3	Ly86
Rab5a	Prex1	Paf1	Rprd2	Madd
Rab5b	Prps1	Paip1	Rreb1	Magi3
Rab5c	Psm3	Pak4	Rrp36	Manba
Rasa3	Pwp2	Parp2	Rufy2	Manea
Rbbp4	Rbl2	Parp9	Sae1	Map4
Rbbp7	Rbm4b	Pcbp1	Sar1a	Mark2
Rbm33	Rdm1	Pcm1	Saraf	Mast4
Rbm47	Rel	Pcna	Sbno2	Maz
Rbm5	Rer1	Pcd5	Scap	Mbd1
Rc3h2	Rfc2	Pde1b	Senp6	Mbnl2
Rin3	Rfwd3	Pdia3	Sept2	Mcm6
Rint1	Riok3	Pds5a	Sept7	Mcts1
Rnft1	Rnf10	Pds5b	Sf3a1	Med14
Rrbp1	Rpap3	Pecr	Sf3a3	Med27
Rrn3	Rpn1	Per1	Smg8	Mib1
Rtcb	Rprd2	Pex13	Snx27	Mib2
Sav1	Rreb1	Phf12	Sos2	Mkln1
Sbno1	Rrp1b	Pi4kb	Sox4	Mob1a
Scly	Rrp36	Pias2	Sp110	Mpp5
Sdc4	Sae1	Pja2	Spns2	Msl2

Sf3b1	Sar1a	Pkd2	Spopl	Msmo1
Sf3b4	Saraf	Plcg2	Sspl3	Mta3
Sgk3	Sbno2	Plk2	Srprb	Mtf1
Sgsm2	Scap	Plod1	Ssrp1	Mtmr3
Sgta	Setd3	Plod3	St5	Mtmr4
Shc1	Sf3a1	Pnkp	St7l	Mtmr6
Sin3b	Sf3a3	Ppih	Stap2	Mtmr7
Six5	Sf3b3	Ppm1b	Stat3	Mylip
Smad4	Sgk1	Ppm1j	Stk40	Myo10
Smc3	Smg8	Preb	Stt3a	Myo9a
Snx14	Sos1	Prkdc	Surf4	Myof
Soga1	Sp110	Prkra	Tbk1	Myzap
Sp1	Spns2	Psm2	Tdg	N4bp1
Sp2	Spopl	Ptcd2	Tet3	Naa15
Srbd1	Srprb	Pxk	Tex2	Nadk
Ssna1	Ssh3	Pygl	Tgds	Nbr1
Stag1	Ssrp1	Pygm	Tlcl1	Ncf1
Stat1	St5	Rab14	Tmc6	Ncor1
Stx12	St7l	Rab5a	Tmco3	Ncor2
Susd2	Stap2	Rab5b	Tmem2	Ndr4
Syne1	Stat3	Rab5c	Tmod3	Nfix
Syvn1	Stk24	Rbbp7	Tmx2	Nfkb2
Tab2	Stk25	Rbm47	Tob1	Nfrkb
Taco1	Stk40	Rbm5	Tpd52	Nit2
Tasp1	Stt3a	Rc3h2	Trim2	Nlgn2
Tdrd3	Sulf2	Reps1	Trpm4	Nmd3
Ten1	Surf4	Ric8b	Tsr1	Nomo1
Thap3	Swt1	Rif1	Ttf1	Npat
Tln1	Synj1	Rint1	U2af2	Npc1
Tmc4	Tada1	Rnft1	Ubr1	Nprl3
Tmcc1	Tbk1	Rock2	Ubr2	Nr2c2
Tnpo3	Tcea3	Rrbp1	Ubr5	Nsd1
Toe1	Tcf25	Rrn3	Unc50	Nsd3
Tonsl	Tdrd7	Rtcb	Usf1	Ntng2
Top2b	Tet2	Saall	Usp9x	Nup54
Tpst1	Tet3	Scaf8	Utp20	Oasl2

Trak1	Tex2	Scly	Uxs1	Oat
Trim3	Tgds	Sdc4	Vps16	Ofd1
Trip4	Thoc2	Setx	Vps29	Orc3
Trrap	Tmc6	Sf3b1	Vps41	Otud5
Ttc19	Tmcc3	Sf3b4	Vps51	Pacs1
Ttil	Tmco3	Sgk3	Wapl	Paf1
Tulp3	Tmx2	Sgsm2	Wdr20	Paip1
Txnl1	Tob1	Shc1	Wipi2	Pak4
Uba3	Top2a	Sin3b	Xpo1	Parp2
Ufl1	Trim2	Six5	Xpo7	Parp9
Ulk2	Trnt1	Slx4	Xylt2	Pcbp1
Usp11	Trpm4	Smad4	Yif1a	Pcm1
Vav3	Tsr1	Smap2	Yif1b	Pent
Vps11	Ttf1	Snx14	Ypel5	Pcd5
Vps35	U2af2	Sp1	Znfx1	Pde1b
Vps8	Ubr1	Sp2	Pir	Pdia3
Wdfy3	Ubr2	Sp4		Pds5a
Wdr48	Ubr4	Sprtn		Pds5b
Wdr5	Ubr5	Srbd1		Pecr
Wdr59	Unc50	Srpkl		Per1
Wdr5b	Urgep	Ssna1		Pex13
Wdr7	Usf1	Stag1		Phf12
Wdr76	Utp20	Strbp		Pi4kb
Wdtc1	Uxs1	Stx12		Pias1
Xpot	Vma21	Syvn1		Pias2
Zfp90	Vps16	Tab2		Pja2
Zmiz1	Vps29	Taco1		Pkd2
Zmym2	Vps41	Taf2		Pkn3
Zyx	Vps51	Taok1		Plcg2
Abca1	Wapl	Tasp1		Pld2
Abcb6	Wasl	Tdrd3		Plk2
Csflr	Wdr20	Thap3		Plod1
Lifr	Wipi2	Tmc4		Plod3
Maib	Xpo1	Tmcc1		Pnir
Mmp15	Xrn1	Tnpo3		Pnkp
Per2	Xylt2	Tonsl		Ppih

	Pparg		Ypel5	Top2b			Ppm1b	
	Rgl1		Znfx1	Tpm1			Ppm1j	
			Zpr1	Tpp2			Prc1	
			Satb2	Traf7			Preb	
			Upp1	Trak1			Prkdc	
				Trap1			Prkra	
				Trim3			Psm2	
				Trip4			Psmf1	
				Trrap			Ptbp3	
				Ttc19			Ptcd2	
				Ttk			Ptprc	
				Tulp3			Pxk	
				Txnl1			Pygl	
				Uaca			Rab14	
				Ubl7			Rab43	
				Ufl1			Rab5a	
				Utp18			Rab5b	
				Vapb			Rab5c	
				Vav3			Rap2a	
				Vps11			Rbbp7	
				Vps35			Rbm27	
				Vps8			Rbm33	
				Wdr48			Rbm47	
				Wdr55			Rbm5	
				Wdr59			Rc3h2	
				Wdr5b			Rgs12	
				Wdte1			Ric8a	
				Xpr1			Ric8b	
				Yif1b			Rif1	
				Zbp1			Rint1	
				Zfhx3			Rnft1	
				Zhx2			Rock2	
				Zmiz1			Rrbp1	
				Zmym2			Rrn3	
				Zyx			Rtcb	
				Zzef1			Saall	

				Pxdn			Sav1	
							Sc5d	
							Scaf8	
							Scly	
							Sdc4	
							Senp7	
							Sept1	
							Sept4	
							Sf3b1	
							Sf3b4	
							Sgip1	
							Sgk3	
							Sgsm2	
							Sgta	
							Shc1	
							Sik3	
							Sil1	
							Sin3b	
							Six5	
							Slfn5	
							Slx4	
							Smad4	
							Smc3	
							Smc6	
							Smg7	
							Snx14	
							Soga1	
							Sp1	
							Sp2	
							Sp4	
							Sprtn	
							Srbd1	
							Srpk1	
							Ssna1	
							Stag1	
							Stag2	

							Stat1	
							Stat4	
							Ston2	
							Stx12	
							Sympk	
							Syvn1	
							Tab2	
							Tab3	
							Taco1	
							Taf2	
							Taf5l	
							Taok1	
							Tasp1	
							Tdrd3	
							Tecr	
							Thada	
							Thap3	
							Tmc4	
							Tmcc1	
							Tmcc2	
							Tnp03	
							Toe1	
							Tonsl	
							Top2b	
							Tor3a	
							Traf7	
							Trak1	
							Trap1	
							Trim3	
							Trip4	
							Trrap	
							Tsc2	
							Ttc19	
							Ttc27	
							Ttc28	
							Ttc3	

							Tti1	
							Tulp3	
							Txn1	
							Uaca	
							Uba3	
							Ube2o	
							Ubl7	
							Ufl1	
							Ulk2	
							Unk	
							Uspl1	
							Vat1	
							Vav3	
							Vprbp	
							Vps11	
							Vps35	
							Wdfy3	
							Wdr48	
							Wdr59	
							Wdr5b	
							Wdr7	
							Wdr76	
							Wdte1	
							Xpo5	
							Xpr1	
							Zfhx3	
							Zfp62	
							Zhx1	
							Zmiz1	
							Zmym2	
							Zyx	
							Map1b	
							Pxdn	