

Université de Montréal

**Les cellules dendritiques mérocytiques :
un nouveau sous-type de cellules dendritiques conventionnelles
spécifiquement régulée par *Bim***

par Cindy Audiger

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Microbiologie et Immunologie

Août 2019

© Cindy Audiger, 2019

Université de Montréal

**Les cellules dendritiques mérocytiques :
un nouveau sous-type de cellules dendritiques conventionnelles
spécifiquement régulée par *Bim***

par Cindy Audiger

Directrice de recherche : Dre Lesage
Co-directrice de recherche: Dre Labrecque

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Microbiologie et Immunologie

Président rapporteur: Dr Soudeyns
Membre du jury: Dre Abadie
Examineur externe: Dr Amrani
Représentant de la doyenne Hugo Wurtele

Résumé

À l'inverse des autres sous types de cellules dendritiques conventionnelles (cDC), la présentation de peptides dérivés de corps apoptotiques par les DC mérocytiques (mcDC) cause un bris de la tolérance. Ces cellules induisent le diabète lorsqu'elles présentent des peptides dérivés de cellules bêta du pancréas. De plus, chargées avec des peptides dérivés de cellules tumorales, elles permettent la réactivation des lymphocytes T et l'élimination de la tumeur. Ces propriétés spécifiques aux mcDCs mettent en évidence de nouveaux aspects dans le contrôle des bris de tolérance. Comprendre leur relation avec les autres DCs et leur régulation sont nécessaires pour comprendre les mécanismes associés à la tolérance immune.

Nous avons déterminé que les mcDCs étaient des cDCs. Les mcDCs sont des cellules avec une courte durée de vie et qui induisent une réponse allogénique. Elles expriment le facteur de transcription spécifique aux cDCs, *Zbtb46*. Les mcDCs se différencient à partir des précurseurs communs aux cDCs. Elles expriment le facteur de transcription IRF-4, important pour les cDC2, et son absence affecte leur homéostasie. Cependant, la proximité des mcDCs avec les cDC2 diffère en matière de métabolisme où elles ont des signatures différentes.

Les mcDCs sont retrouvées en plus grand nombre dans un modèle murin de diabète auto-immun spontané (NOD) que dans une lignée de souris résistante (C57BL/6). Notre laboratoire a validé que le locus *Idd13* du chromosome 2 était lié au nombre de mcDCs, suggérant donc qu'un ou plusieurs gènes de ce locus ont un rôle dans la régulation du nombre de mcDCs. En ciblant des gènes polymorphiques entre la souris NOD et la souris C57BL/6, nous avons déterminé que le gène *Bim*, qui code pour une molécule proapoptotique, régule de manière moelle osseuse intrinsèque spécifiquement les mcDCs.

Les mcDCs sont donc un sous-type de cDCs spécifiquement régulé par *Bim*. Ce sous-type de cDCs est une population clé dans les bris de tolérance et comprendre leur homéostasie est primordial pour déterminer leur rôle dans le contrôle de la tolérance immune.

Mots-clés : cellules dendritiques conventionnelles; cellules dendritiques mérocytiques; homéostasie; tolérance immune; *Bim*; apoptose.

Abstract

Unlike other conventional dendritic cells (cDCs) subtypes, presentation of peptides derived from apoptotic bodies by merocytic dendritic cells (mcDCs) is associated with a break of tolerance. Presentation of peptides derived from pancreatic beta cells by mcDC is linked to diabetes induction. However, when loaded with peptides derived from tumor cells, they allow the reactivation of T cells and the elimination of the tumor. These properties specific to mcDC highlight new aspects in the control of break of tolerance. Understanding their relationships with other DCs and their regulation is important for understanding the mechanisms associated with immune tolerance.

We have determined that mcDCs are cDCs. mcDCs are short-lived cells able to induce an allogeneic response. They express the specific cDC transcription factor, *Zbtb46*. mcDCs are differentiated from the cDC common precursors. They express and require IRF-4 for their homeostasis, a transcription factor associated with cDC2 differentiation. However, the proximity of mcDC to cDC2 differs in terms of metabolism where they have different signatures.

mcDCs are found in greater numbers in the mouse model of spontaneous autoimmune diabetes (NOD) than in a resistant line (C57BL/6). Our laboratory validated that the *Idd13* locus of chromosome 2 was linked to mcDC number, thus suggesting that one or more genes of this locus have a role in regulating the number of mcDC. By targeting polymorphic genes between the NOD and C57BL/6 mice, we determined that *Bim* gene, encoding a pro-apoptotic molecule, regulate specifically mcDC in a bone marrow intrinsic manner.

Therefore, mcDCs are a subset of cDCs specifically regulated by *Bim*. This subtype of cDCs is a key player in break of tolerance and understanding their homeostasis is important in determining their role in immune tolerance.

Keywords : conventional dendritic cell; merocytic dendritic cell; Bim; homeostasis; immune tolerance; apoptosis.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières	v
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1. Contexte: le système immunitaire	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. La présentation du non-soi et l'initiation d'une réponse immune	3
1.3. La présentation du soi et la tolérance immune	4
2. Les cellules dendritiques conventionnelles	6
2.1. Introduction.....	6
2.2. Les sous-types de cellules dendritiques conventionnelles.....	10
2.3. L'ontogénie des cellules dendritiques conventionnelles.....	15
3. Les cellules dendritiques non conventionnelles.....	24
3.1. Généralités.....	24
3.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	24
3.3. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes.....	27
3.4. La classification des pDCs et des mo-DCs.....	30
4. Les cellules dendritiques mérocytiques	31
4.1. Phénotype	31
4.2. La spécification en mDC.....	33
5. Les cDCs dans le maintien de la tolérance immune	35
5.1. Mise en évidence du rôle des cDCs dans la tolérance immune	35
5.2. Les cDCs dans la tolérance thymique	37
5.3. Les cDCs dans la tolérance périphérique.....	40
5.4. Les cDCs dans les maladies auto-immunes	43

6. L'immunogénétique	46
6.1. Les variants génétiques	46
6.2. Le modèle NOD	47
6.3. Les souris congéniques	48
7. Hypothèses et objectifs de mon doctorat	50
Chapitre 2: Article 1	51
1. Merocytic dendritic cells compose a conventional dendritic cell subset with low metabolic activity	51
1.1. Abstract	53
1.2. Introduction.....	54
1.3. Materials and methods.....	56
1.4. Results.....	60
1.5. Discussion.....	66
1.6. Acknowledgments	71
1.7. References	72
1.8. Figures	79
Chapitre 3 : Article 2	85
1. BIM determines the number of merocytic dendritic cells, a cell type that breaks immune tolerance	85
1.1. Abstract	87
1.2. Introduction.....	88
1.3. Results.....	91
1.4. Discussion.....	97
1.5. Methods.....	101
1.7. References	106
1.8. Figures	111
Chapitre 4 : Discussion	117
1. Les mcDCs : un sous-type de cDCs qui brise la tolérance	117
1.1. L'origine des mcDCs.....	118
1.2. Exploration du phénotype des mcDCs.....	120
1.3. La phagocytose des corps apoptotiques par les mcDCs.....	122
2. La famille Bcl-2 dans le contexte des DCs	126

2.1. Les cDCs ont des mécanismes différents de survie.....	127
2.2. <i>Bim</i> régule spécifiquement les mcDCs	129
Conclusion	133
Bibliographie.....	135
Annexe 1. Le phénotype des mcDCs.....	i
Annexe 2. Expression de marqueurs de survie par les cDCs.....	ii
Annexe 3. Expression de marqueurs de survie par lignée murine	iii
Annexe 4. Article de revue sur les DCs dans la tolérance immune	iv

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1. Les cDCs et les mcDCs chez la souris et l'humain.....	14
Figure 2. Les modèles actuels de différenciations des cDCs.	17
Figure 3. Les rôles des cDCs dans la tolérance centrale.....	39
Figure 4. Le rôle des cDCs dans la tolérance périphérique.	42

Chapitre 2: Article 1

Figure 1. mcDCs exhibit key characteristics of cDCs.....	79
Figure 2. mcDC turnover	80
Figure 3. mcDCs differentiate from pre-cDCs in vivo.....	81
Figure 4. <i>Irf8</i> and <i>Batf3</i> are not required for mcDC differentiation.....	82
Figure 5. mcDC number is decreased in the absence of <i>Irf4</i>	83
Figure 6. mcDCs have a distinct metabolic phenotype.....	84

Chapitre 3 : Article 2

Figure 1. B2m does not determine mcDC proportion.	111
Figure 2. Sirpa unlikely defines mcDC proportion.	112
Figure 3. Bim-deficiency confers a survival advantage to mcDC.....	113
Figure 4. B6.Bim ^{-/-} mice exhibit an increase in mcDC.....	114
Figure 5. Bim regulates mcDC proportion in a bone marrow-intrinsic manner.....	115
Figure 6. NOD cDC show a defect in BIM induction upon poly I:C activation.....	116

Liste des abréviations

Ag	antigène
APCs	cellules présentatrices d'antigènes
ARN	acide ribonucléique
ATAC-seq	assay for transposase-accessible chromatin using sequencing
ATP	adenosine triphosphate
BATF3	basic leucine zipper transcription factor 3
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2
Bcl2l11	BCL2 Like 11
BDCA	blood dendritic cell antigen
BH3	Bcl-2 homology domain 3
BIM	Bcl-2-like protein 11
Blimp-1	PR domain zinc finger protein 1
BMDC	cellules dendritiques dérivées de la moelle
BrdU	bromodeoxyuridine
CCL	chimiokine (CC-motif) ligand
CCR	récepteur à chimiokine
CD	cluster of differentiation
cDC	cellules dendritiques conventionnelles
CDP	common dendritic cell progenitor
CLP	common lymphoid progeniteur
cMoP	common monocyte progenitor
CMP	common myeloid progeniteur
CSF	colony stimulating factor 1
CSFR1	colony stimulating factor 1 receptor
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3
DC-SCRIPT	nuclear receptor co-regulator dendritic cell specific transcript
DCIR2	dendritic cell inhibitory receptor 2
DCs	cellules dendritiques

DT	toxine diphtérique
DTR	récepteur à la toxine diphtérique
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
ESAM2	endothelial cell-selective adhesion molecule
FcR	recepteur Fc
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FLT3R	FMS-like tyrosine kinase 3 receptor
FoxP3	(forkhead box P3
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GAS6	growth arrest specific 6
GMP	granulocyte-macrophage progenitors
GVHD	graft-versus-host disease
HSC	cellules souches hématopoïétique
Idd	insulin dependent diabetes susceptibility 1
IDDM	insulin Dependent Diabetes Mellitus
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	interferon
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IRF	interferon Response Factor
iTreg	T régulateur induit
lif	leukemia inhibitory factor
LMPP	lymphoid-primed multipotential progenitors
LT	lymphocytes T
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mcDC	cellules dendritiques mérocytiques
MDP	précurseur de macrophages/dendritique
merTK	proteine kinase mer
MHC	complexe majeur d'histocompatibilité
MIP1a	macrophage inflammatory protein 1-alpha

MIPb	macrophage inflammatory protein 1-beta
MLR	mixed lymphocyte reaction, réaction lymphocytaire mixte
MS	sclérose en plaques
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer
NLR	récepteur NOD-like
NLT	tissus non lymphoïde
NOD	non obese diabetic mice
nTreg	T régulateur naturel
OVA	ovalbulmine
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	cellules mononuclées du sang périphérique
pDC	cellules dendritiques plasmacytoïdes
PGE2	prostaglandine E2
PRDM1	PR domain zinc finger protein 1
pre-cDC	precuteur des cellules dendritiques conventionnelles
PRR	pattern recognition receptors
PtdSer	phosphatidyle serine (PtdSer),
Rag	recombination Associated Genes
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
Rbp-j	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
RIG-1	récepteur des genes inductible par l'acide rétinoïque
RNA-seq	RNA sequencing
ROS	reactive oxygené specis
scRNAseq	single cell RNA sequencing
Sirp-a	signal-regulatory protein alpha
SLE	lupus érythémateux systémique (SLE)
T1D	diabete de type I
TCR	récepteur des cellules T
TGF-b	transforming growth factor beta

TGFBR1	récepteur 1 au TGF- β
TLR	toll like recepteur
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
Treg	T regulateur
TSP-1	thrombospondine-1
UTP	uridine triphosphate
XCR1	récepteur à chimiokine à motif X- C 1
Zbtb-46	Zinc finger and BTB domain containing 46

Keep going, no matter what
Reginald Lewis, Virginia State University 1965

Remerciements

Je ne pourrais commencer ces remerciements sans mentionner le Dre Sylvie Lesage. Sylvie, plus qu'une superviseure, tu as été un mentor pour moi. Merci pour ta confiance. Tu n'as pas eu peur de me laisser explorer tous les aspects des DCs qui m'intéressaient. Tu m'as donné des opportunités en or comme partir à Cincinnati pour apprendre de nouvelles techniques ainsi qu'un soutien lors de nos discussions sur mon avenir en recherche. J'ai appris énormément pendant ces années dans ton laboratoire.

Je voudrais ensuite remercier le Dre Nathalie Labrecque pour m'avoir donné l'opportunité de rejoindre le Canada. J'ai découvert le monde de la réponse T et NOTCH. Ces connaissances me permettent d'avoir une vision globale de la réponse immune et non seulement de me focaliser sur les DCs qui me passionnent tant.

À mes parents et ma sœur, qui ne comprennent pas toujours pourquoi je fais tout ça et pourquoi je travaille autant. Votre soutien dans mes choix, bons ou moins bons, m'a permis de devenir qui je suis. J'ai la chance d'être libre de jugement et cela me permet de faire évoluer ma vie comme je l'entends.

Ensuite, un doctorat dans un autre pays, c'est aussi des rencontres en Or. Victoria, tu crois en moi plus que moi-même. Tu es une des plus belles choses que ce doctorat m'aura apporté. Ton amitié, ton soutien, nos soirées vins et danses ont été d'une importance incroyable dans mon bonheur ici et ce n'est pas fini. Tu es une des personnes que j'admire le plus.

Fred, le stagiaire du labo d'à côté que j'ai fini par adopter. Tu es une personne incroyable, un ami, un partenaire de travail, un acolyte de verre du vendredi soir, un partenaire de piste de dance et un compagnon de voyage. Je sais que tu vas accomplir de grandes choses.

Roxanne et Lorie. À cette complicité de labo qui est devenu une amitié dans la vie. Vous êtes géniales et je sais que dans 20 ans, on se retrouvera encore pour jaser du bon vieux temps. Ne changez pas.

Felix, Victor et Adrien. Sans vous, ces dernières années de PhD auraient été moins drôles. Merci pour les sessions de karaokés improvisées au labo, les fous rires, les « brainstormings », nos sorties et d'avoir supporté ma passion pour Mariah Carey. On forme une équipe soudée et cela donne des ailes. Je sais que vous réaliserez vos rêves, ne lâchez rien.

Fred et Marion, merci d'avoir été là. Vous êtes géniaux.

À tout les autres qui ont aussi mis de la joie dans ma vie: Mavi, Gérémy, Geneviève, Alexandre, Jacq-Hélène, Oli et Lucille. Merci.

Puis il y a ces amis que j'ai laissés (temporairement) de l'autre coté de l'Atlantique.

Marie, tes encouragements et ton support ainsi que ton amitié m'ont beaucoup apporté même si la distance n'est pas toujours évidente. J'aurais aimé être plus présente pour toi. Tu es incroyable.

Audrey et Daniel, vous m'avez vue grandir dans ce monde qui est la recherche. Malgré la distance et des vies bien chargées, on a réussi à garder le contact et ça me comble. Merci.

Chapitre 1 : Introduction

1. Contexte: le système immunitaire

1.1. Généralités

Le système immunitaire a pour rôle de protéger les organismes multicellulaires des infections, des pathologies auto-immunes et cancers [1, 2]. Ce système regroupe différents types de cellules et a pour objectif de détecter le soi du non-soi. De façon simplifiée, le système immunitaire peut être séparé en deux, le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

Le système immunitaire inné est une des premières lignes de défense de l'organisme. Il se déclenche en quelques minutes suite à la détection d'un élément du non-soi. Il a une faible spécificité contre les pathogènes détectés, basée notamment sur la détection de motifs conservés. L'immunité innée regroupe les barrières dites physiques, comme la peau ou les muqueuses; les barrières dites chimiques, comme la production de peptides antimicrobiens et les barrières cellulaires, regroupant les différents types de cellules qui vont détecter la présence du non-soi par différents récepteurs de surface ou intracellulaire. À terme, une inflammation locale va se mettre en place et le pathogène ou le corps étranger sera, dans la majorité des cas, éliminé [3].

La réponse du système adaptatif, dont l'activation dépend du système immunitaire inné, se met en place après quelques jours et est spécifique du pathogène détecté. Différents types de cellules immunitaires, tels que les lymphocytes T et B, sont éduqués pour détecter de façon précise le non-soi, par l'expression de récepteurs particuliers en surface [4, 5]. Même si l'idée d'une mémoire innée commence à être décrite dans la littérature [6], la réponse

mémoire du système immunitaire est principalement associée au système immunitaire adaptatif. Ces cellules mémoires vont persister dans l'organisme suite à une première rencontre avec un pathogène et permettront lors d'une réinfection avec ce même pathogène, une défense plus rapide et plus efficace [7, 8].

Les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) sont une famille de cellules qui fait le pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les APCs ont pour rôle de patrouiller l'organisme afin de détecter la présence de pathogènes en périphérie. Une fois détectés, elles migreront aux organes lymphoïdes secondaires, où sont présentes les populations lymphocytaires T, afin d'initier une réponse adaptative. Les lymphocytes T activés rejoindront alors le site de l'infection pour éliminer le pathogène [9]. Les APCs regroupent trois sous-familles de cellules: les macrophages, les cellules B et les cellules dendritiques (DCs). Les lymphocytes B ont aussi un rôle important dans la production d'anticorps. Les macrophages ont une haute capacité de phagocytose sans nécessiter d'activation préalable. Les DCs ont un pouvoir d'activation des lymphocytes T (LT) naïfs supérieurs aux autres sous types d'APCs, ce qui rend ces cellules importantes dans l'initiation d'une réponse immune [10].

La réponse immunitaire adaptative est donc initiée par les APCs. Leur capacité à discriminer le non-soi, tel que la présence de pathogènes; du soi, c'est-à-dire les cellules de l'organisme, est finement régulée et permettra d'induire ou non une réponse immune en fonction des antigènes (Ag) présentés par les APCs.

1.2. La présentation du non-soi et l'initiation d'une réponse immune

Les APCs expriment différents récepteurs, dont les récepteurs de reconnaissance des pathogènes (pattern recognition receptors; PRRs), qui leur permettent de reconnaître des motifs conservés par les microorganismes (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). À l'état immature, les APCs sondent continuellement l'environnement à la recherche d'un signal de danger. L'interaction d'un PRR avec son ligand entraîne la maturation des APCs. Ces dernières augmenteront l'expression des molécules de costimulation (CD80, CD86), du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de type II (MHC-II), ainsi que de certains récepteurs de migration comme CCR7 afin de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires où sont localisés les LT naïfs. C'est dans ces organes que les APCs présenteront, via leur MHC, des peptides antigéniques dérivés du pathogène aux cellules T CD8⁺ ou CD4⁺, ayant un récepteur de cellule T (TCR) spécifique du peptide présenté dans le contexte du MHC de type I (MHC-I) ou du MHC-II, respectivement. La réponse immunitaire adaptative se met alors en place et le pathogène sera éliminé. La voie de présentation des antigènes (Ag) par le MHC-I ou le MHC-II dépend de l'origine endogène ou exogène des Ag respectivement [11].

L'interaction du TCR avec le complexe peptide-MHC présenté par les APCs, correspondant au signal 1, n'est pas suffisante pour induire l'activation d'un LT naïf. En effet, l'activation des LT est extrêmement régulée et deux autres signaux sont requis. Le second est un signal de costimulation tel que l'interaction de CD80/86 sur l'APC avec le récepteur CD28 exprimé sur les LT. Le troisième est un signal de cytokines comme l'IL-12 par exemple. La combinaison de ces trois signaux est primordiale pour l'activation des lymphocytes. En absence d'un de ces signaux, les cellules T seront inhibées et aucune réponse immune ne sera alors initiée [12].

La détection et présentation du non-soi par les APCs sont donc finement régulées. Différents paramètres liés aux APCs, aux cellules T, ainsi qu'à l'environnement sont requis pour permettre l'activation optimale des cellules T et l'initiation d'une réponse immune adaptative.

1.3. La présentation du soi et la tolérance immune

En absence d'inflammation, les APCs sont dites immatures et peu immunogènes, phénotype caractérisé par une faible expression des molécules de co-stimulations et du CMH-II, notamment. Dans cet environnement, elles présenteront des Ag dérivés du soi aux lymphocytes, ce qui conduira à l'activation transitoire puis à l'anergie ou délétion des ces dernières [13]. Ce mécanisme est important pour contrôler l'auto-réactivité des cellules T et B et sera détaillé plus loin dans l'introduction.

Lors de leur patrouille, les APCs peuvent aussi détecter des cellules de l'organisme en apoptose nommées corps apoptotiques [14]. L'apoptose est un phénomène physiologique important pour l'embryogenèse et le renouvellement des cellules dans les organes et tissus. La phagocytose de ces corps apoptotiques, nommée éfferocytose, suit un schéma d'induction spécifique [15, 16]. Dans un premier temps, le recrutement de l'APC au site d'apoptose est induit par un signal « find me » produit par les cellules en apoptose, tels que le lysophosphatidylcholine (LPC), l'adénosine triphosphate (ATP) et l'uridine triphosphate (UTP). Ces signaux forment un gradient chimioattractant qui permet le recrutement des APCs. Le second signal est le « eat me signal » et est exprimé en surface des cellules apoptotiques. L'expression par exemple de phosphatidyl serine (PtdSer), des molécules du complément, ainsi que le changement de charge des lipides et glycoprotéines de surface, sont entre autres,

des signaux qui seront associés à la phagocytose de ces corps apoptotiques par les APCs. Différents récepteurs, présents en surface des APCs, sont capables de reconnaître ces « eat me » signaux tels que CD14, CD91 ou le récepteur tyrosine kinase (merTK) qui reconnaissent respectivement ICAM3, C1q et la protéine GAS6 (growth arrest specific 6). L'interaction des « eat me » molécules avec les récepteurs d'efférocytoses induit la phagocytose des corps apoptotiques. Cette phagocytose d'élément du soi en apoptose n'induit pas la maturation des APCs mais conduit à la sécrétion de différentes molécules anti-inflammatoires comme la prostaglandine E2 (PGE2), l'IL-10 ou TGF- β [17, 18]. Ces molécules anti-inflammatoires agissent sur l'environnement immunitaire et induisent une tolérance du système immunitaire, c'est-à-dire une non-réponse. L'élimination des corps apoptotiques est importante pour l'organisme. En effet, une mauvaise élimination de ces cellules peut induire leur nécrose et conduire à la mise en place d'inflammation locale [14]. Différentes maladies auto-immunes sont décrites comme liées à un défaut de l'élimination des corps apoptotiques, telles que le lupus érythémateux systémique (SLE), la sclérose en plaques (MS) ou le diabète de type I (T1D), mais aussi certains cancers ou maladies du développement [19-21].

Si la détection du non-soi est primordiale pour protéger l'organisme des infections par l'activation des LT, la présentation du soi est aussi nécessaire pour éviter une activation de ces derniers qui pourraient être néfastes pour l'organisme. Même si toutes les APCs peuvent présenter du soi et du non-soi, leur capacité à induire une réponse immune ou à induire un état de tolérance peut varier. Les DCs ont un potentiel d'activation des LT naïfs lors d'une présentation d'Ag du non-soi supérieur aux autres populations d'APCs et présentent, de plus, un fort potentiel de tolérance de la réponse T lors d'une présentation d'Ag du soi [22]. Ces

deux caractéristiques font des DCs, un type cellulaire prisé dans le développement de stratégies vaccinales antitumorales ainsi que dans le contrôle des maladies auto-immunes [23, 24]. Les DCs sont une famille de cellules hétérogènes dont chaque sous-type présente des particularités qui leurs sont propres. Il est donc nécessaire de prendre en considération la complexité de cette famille pour comprendre l'activation et la polarisation du système adaptatif ainsi que le développement de maladie.

2. Les cellules dendritiques conventionnelles

2.1.Introduction

2.1.1. Historique de la caractérisation des cellules dendritiques conventionnelles

Les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) ont été décrites pour la première fois par le Dr Steinman en 1973. Lors d'une culture *in vitro* de cellules de rate de souris, il observe la présence d'une nouvelle population cellulaire qui adhère au plastique et qui présente des dendrites; morphologie différente de celle des macrophages [25]. Ces dendrites seront à l'origine de leur nom. Il démontrera ensuite, par des expériences de réaction mixte leucocytaire (MLR), que ces cellules induisent une forte réponse allogénique *in vitro* en comparaison aux autres populations d'APCs [26]. De plus, il mettra en évidence leur meilleure capacité d'activation, supérieure aux autres APCs, dans des modèles de stimulation Ag spécifique [27].

La découverte des DCs a amené les chercheurs à explorer leurs phénotypes afin de mieux comprendre cette famille cellulaire, au rôle important dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative. La caractérisation des cDCs est un domaine en perpétuelle évolution, révélant la complexité de cette famille de cellules. Les cDCs spléniques murines ont d'abord

été caractérisées comme n'exprimant pas les immunoglobulines (Ig) ou les Fc récepteurs (FcR), associés aux macrophages, permettant de suggérer que les cDCs sont une famille à part entière du système immunitaire [28]. Par la suite, il sera établi que les cDCs expriment de forts niveaux de MHC-II [29, 30] ainsi que le marqueur 33D1 (ou DCIR2) [30, 31]. Ce dernier marqueur sera décrit des années plus tard comme étant spécifique d'une sous population particulière de cDCs [32]. En effet, dans le milieu des années 90, une étude montrera que les cDCs spléniques regroupent en réalité deux sous-types particuliers nommés à l'époque les cDCs CD8 α^+ et les cDCs CD8 α^- [33]. Cette hétérogénéité se compliquera grâce à l'avancée technologique et sera couverte plus loin dans l'introduction. Il est à présent admis que les cDCs sont des cellules exprimant le marqueur hématopoïétique CD45, le MHC-II et l'intégrine CD11c et dont les marqueurs de cellules T (CD3, TCR), B (CD19, B220), NK (*Natural Killer*; NK1.1, DX5), de granulocytes (Gr-1, Ly6G) et de macrophages (F4/80, Ly6C) sont absents [34]. Comprendre le phénotype des cDCs est primordial pour déterminer la présence d'équivalents humains ainsi que pour approfondir nos connaissances sur ces cellules en matière de fonction, ontogénie et potentiel thérapeutique.

2.1.2. L'homéostasie des cDCs

Les cDCs sont des cellules ayant un fort potentiel d'activation des LT et qui ont un rôle majeur dans l'initiation d'une réponse adaptative. Déterminer leur homéostasie est primordiale pour comprendre la cinétique d'une réponse immunitaire ainsi que dans l'optique de leur utilisation en thérapie cellulaire.

Pendant longtemps, les cDCs ont été considérées comme des cellules différenciées de façon terminale, non prolifératives avec une courte demi-vie. Des études utilisant le BrdU,

(Bromo-deoxyUridine) analogue de la thymidine qui s'incorpore dans les cellules en division, ont mis en évidence que deux heures après l'injection, une faible proportion des cDCs sont positives pour le BrdU dans la rate [35, 36]. Après trois jours d'exposition au BrdU, 50% des cDCs sont positives au BrdU démontrant un taux de renouvellement rapide de ces cellules. De manière intéressante, la demi-vie des cDCs varie en fonction de leur localisation et des sous-types, suggérant que chaque sous-type présente des caractéristiques qui leurs sont propres [37].

La limite du BrdU est le fait qu'il s'incorpore dans les cellules en division que ce soit le précurseur ou la cellule fille dérivée de ce précurseur. Cependant, des études du cycle cellulaire, basées notamment sur l'utilisation du marqueur de prolifération Ki67, ont démontré que 5% des cDCs de la rate sont en cycle cellulaire, appuyant l'argument que les cDCs sont capables de proliférer [32]. Dans le but de confirmer ce résultat, une équipe de recherche a transplanté des morceaux de rate de souris dans une souris receveuse exprimant un marqueur allogénique distinct. Les cDCs du greffon n'ont donc plus de précurseurs de la moelle ou circulant. Dans ces conditions, les cDCs du greffon et du récipient incorporent le BrdU de la même façon, confirmant que les cDCs sont capables de proliférer dans les organes lymphoïdes périphériques et/ou de se différencier d'un précurseur splénique [38].

L'utilisation de parabioses, où le système circulatoire de deux souris C57BL/6 est joint pendant 45 jours, permet d'étudier de façon plus précise l'homéostasie d'une population de cellules en termes de demi-vie, cinétique de remplacement et capacité migratoire [39]. Ces expériences montrent qu'après 45 jours, les cDCs ne s'équilibrent pas entre les deux parabiontes, confirmant la courte demi-vie des cDCs en opposition aux LT par exemple qui eux s'équilibrent parfaitement. Suite à la séparation des souris, les cDCs dérivées du

parabionte sont entièrement remplacées par les cellules dérivées de précurseurs endogènes en 10 à 14 jours, contre 21 jours pour les LT [38].

Ces différentes études suggèrent que les cDCs sont donc issues d'un recrutement continu de précurseurs circulant dans le sang qui, une fois dans le tissu ou organe, vont se différencier en cDCs. Les cDCs pourront alors y proliférer. Cependant, lorsque les cDCs sont chargées avec un peptide antigénique, leur persistance pourra atteindre 14 jours, augmentant alors leur capacité à interagir et activer les LT spécifiques du complexe peptide-MHC [38, 40, 41]. L'homéostasie des cDCs varie de plus en fonction du sous-type de cDCs. Il est donc nécessaire de comprendre l'hétérogénéité des cDCs afin d'élucider de façon précise les propriétés intrinsèques à chaque sous-type [32, 36].

2.1.3. L'hétérogénéité des cDCs

Les cDCs sont une famille complexe de cellules. Le phénotype de ces cellules est variable d'un tissu à un autre au sein d'un même organisme et peut différer entre l'homologue murin et humain, rendant difficile la caractérisation de l'hétérogénéité des cDCs. Les nouvelles technologies d'analyses permettant d'explorer la complexité immune au niveau d'une seule cellule telle que le *single cell RNA sequencing* (scRNAseq) ou la cytométrie multicouleurs non supervisée (CyTOF), ont cependant permis une avancée considérable dans la compréhension de l'hétérogénéité des DCs murines et humaines. Le scRNAseq permet de déterminer le transcriptome de chaque cellule à partir d'une population hétérogène. Les cellules partageant une signature en ARNm seront regroupées de façon non biaisée en clusters [42]. Au moins cinq populations (clusters) de DCs ont été mises en évidence dans la rate de souris [43] et six populations de DCs parmi les cellules mononuclées du sang périphérique

(PBMCs) humain [44]. Une étude comparative des cellules immunes souris versus humain dans un modèle de cancer a caractérisé quatre populations de DCs conservées entre les deux espèces [45]. La découverte de nouveaux marqueurs de surface par le scRNAseq complémenté par des analyses au niveau protéique via le CyTOF ont confirmé l'hétérogénéité des DCs dans différents tissus que ce soit murin [46] ou humain [46, 47].

Le phénotype des DCs est hautement variable. Il est de plus en plus accepté de classer les DCs selon leurs fonctions plutôt que leurs phénotypes [41]. Les DCs sont donc divisées en deux populations majeures de cDCs; les cDCs de type 1 (cDC1) et de type 2 (cDC2) et une population de DCs non conventionnelle, les cellules dendritiques plasmacytoides (pDCs). Ces différents sous-types de DCs présentent de plus une hétérogénéité au sein de leur propre groupe. Comprendre l'hétérogénéité des sous types de cDCs, en termes de phénotypes et de fonctions, est donc primordiale pour élucider leurs rôles dans l'initiation d'une réponse adaptative ainsi que dans la mise en place d'un état de tolérance lors de la présentation du soi.

2.2. Les sous-types de cellules dendritiques conventionnelles

2.2.1. Les cellules dendritiques conventionnelles de type 1

Les cDC1 murines sont présentes dans la majorité des organes et tissus de l'organisme. Historiquement, elles sont reliées à l'expression de CD8 α et DEC205 et à l'absence de CD11b [48]. D'autres marqueurs de surface seront par la suite décrits tel que XCR1 [49], Clec9a (ou DNNGR1) [50, 51] et CD24 [30] dans les organes lymphoïdes. Dans les tissus, tels que la peau ou les intestins, les cDC1 expriment CD103, DEC205 et la langerine, mais n'expriment pas CD8 α ni CD11b [52-54]. La glycoprotéine CD8 α n'est pas exprimée sur les cDCs humaines, et ce indépendamment de leur localisation [55, 56]. Les cDC1 humaines sont caractérisées par

l'expression de XCR1 [57, 58], Clec9A [50, 59] et BDCA3 (CD141) [60] et partagent les mêmes caractéristiques fonctionnelles que leur équivalent murin[61]. D'une façon générale, les cDC1, indépendamment de l'espèce et de leurs localisations, expriment le facteur de transcription IRF-8 [62].

Les cDC1 produisent de hauts niveaux d'IL-12 suite à leur activation, cytokine inflammatoire importante pour l'activation des LT et des NK, par exemple [63, 64]. Elles sont plus efficaces dans la présentation d'Ag exogènes via le MHC-I aux LT CD8⁺ par la présentation croisée [65-67] et à l'inverse moins efficaces dans la présentation d'Ag via le MHC-II aux LT CD4⁺ que les autres sous types de cDCs [41, 67, 68]. Ces deux particularités leur confèrent une forte capacité dans le contrôle des pathogènes intracellulaires [63, 69-71]. Les cDC1 sont, de plus, essentielles à l'activation des LT CD8⁺ lors d'une réinfection et dans la génération de LT mémoires résidentes notamment par la présentation croisée [72, 73]. Le rôle majeur des cDC1 dans l'activation des LT CD8⁺ est couplé à leur localisation [74]. En effet, elles sont présentes dans la pulpe rouge et blanche, ainsi que dans la zone marginale de la rate, ou dans le sinus subcapsulaire des ganglions lymphatiques drainant. De façon générale, les cDC1 se situent dans des endroits où circulent les Ag par le système sanguin ou lymphatique. Elles migreront ensuite dans la zone T afin de présenter ces Ag aux LT CD8⁺ [75-78]. Ces propriétés font des cDC1 un des sous-types de cDCs ciblés notamment en immunité anti-tumorale [79, 80].

Les cDC1 ont une capacité plus élevée à phagocyter des corps apoptotiques que les autres sous types de cDCs ou APCs [81, 82]. Elles expriment différents récepteurs impliqués dans la capture de ces cellules apoptotiques comme Clec9A, CD36, et merTK [83-86]. La

présentation de corps apoptotiques se fera par la présentation croisée et sera associée à l'induction de la tolérance des LT [82].


2.2.2. Les cellules dendritiques conventionnelles de type 2 (cDC2)

Chez la souris, les cDC2 sont caractérisées par l'expression de CD11b [87]. Cependant plusieurs sous-types ont été décrits via l'expression de marqueurs tels que CD4, Sirp- α (CD172), CXCR3, DCIR2, ESAM2 [46, 87-89]. Dans les intestins, deux sous types de cDC2 sont retrouvés en fonction de l'expression ou non de CD103 associée à l'expression de CD11b [90, 91]. Chez l'humain, les cDC2 sont caractérisées par l'expression de CD1c (nommé aussi BDCA1 [56, 92] et sont sous-divisées en trois populations dans le sang, en fonction des marqueurs de surfaces CD163 et Sirp- α [46, 47]. L'hétérogénéité des cDC2 est présente en fonction des tissus, mais aussi au sein d'un même individu [47]. Malgré la haute variabilité du phénotype des cDC2 chez l'humain et la souris, il est admis que l'expression du facteur de transcription IRF-4 est spécifique à cette sous-population particulière [62].

Les cDC2 ont une forte capacité à activer les LT CD4⁺ par la présentation de peptides antigéniques dans le contexte du MHC-II [41, 67, 68] et sont de ce fait retrouvées à proximité des LT CD4⁺ de la zone marginale de la rate [77]. On les retrouvera aussi dans la zone interfolliculaire et la zone lymphatique des ganglions lymphatiques [78]. Elles sont de plus spécialisées dans la détection de pathogène intracellulaire via leur haute expression de récepteurs senseurs d'acide nucléique, comme le récepteur des gènes inductibles par l'acide rétinoïque (retinoic-acid-inducible gene, RIG-1) ou les récepteurs de type NOD (NLR) [93]. Dans les intestins, les cDC2 produiront, entre autres, de l'IL-23 en réponse au microbiote, une cytokine nécessaire pour la différenciation des cellules T en Th17 [94-96]. Les cDC2

expriment le TLR7, requis pour la détection des ARN simple brin [93, 97]. De plus, elles sont importantes pour le recrutement des autres cellules du système immunitaire par leur constitutive capacité à produire de hauts niveaux (supérieur aux cDC1) de MIP1a, MIP1b et RANTES, production augmentée suite à une activation du TLR7 ou du TLR9 [98].

Les cDCs sont donc une famille hétérogène de cellules en termes de phénotypes, de localisations et de fonctions. De façon simplifiée, les cDC1 sont importantes pour la présentation croisée, l'activation des LT CD8⁺ ainsi que la phagocytose des corps apoptotiques tandis que les cDC2 sont liées à l'activation et la polarisation des LT CD4⁺ (Figure 1). La caractérisation précise de chaque sous-type est donc primordiale pour comprendre leurs rôles dans le contrôle des infections, la pathogenèse des maladies auto-immunes, ainsi que pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancer par exemple. Afin de comprendre l'hétérogénéité des cDCs, les chercheurs se sont intéressés à déterminer comment ces différents sous-types sont générés et comment leurs localisations peuvent affecter leurs phénotypes [99, 100].



	cDC1	cDC2	mcDC
Mouse	CD8a ⁺ (LT) CD103 ⁺ (NLT) CD24 ⁺ CD205 ⁺ IRF-8 ⁺	CD11b ⁺ CD4 ⁺ or CD4 ⁻ ESAM ^{hi} or ESAM ^{low} CXCR3 ⁺ or CXCR3 ⁻ DCIR2 ⁺ or DCIR2 ⁻ CD103 ⁺ or CD103 ⁻ (NLT) IRF-4 ⁺	CD8a- CD11b-
Human	XCR1 ⁺ Clec9A ⁺ BTLA ^{hi} CD14 ⁻ Sirp-a ⁻	Sirp-a ⁺ XCR1 ⁻	unknow
	CD141 ⁺	CD1c ⁺ CD1a ⁺ (Skin) CD1b ⁺	unknow
	- Cross presentation - CD8 T cells activation - efferocytosis : -> tolerance	- CD4 T cells activation	- Efferocytosis : -> break of tolerance

Figure 1. Les cDCs et les mcDCs chez la souris et l'humain

En bleu, les marqueurs retrouvés exclusivement dans les modèles murins. En orange, les marqueurs spécifiques aux DCs humaines. En violet, les marqueurs partagés par les DCs murines et humaines. Les fonctions spécifiques de chaque sous-type sont représentées en jaune. (LT, tissus lymphoïdes; NLT, tissus non lymphoïdes). Adapté de [101].

2.3.L'ontogénie des cellules dendritiques conventionnelles

2.3.1. L'origine des cDCs

2.3.1.1. Les stades de différenciation des cDCs

Les cDCs dérivent des cellules souches multipotentes hématopoïétiques résidentes de la moelle osseuse (HSCs). La HSC pourra générer un progéniteur multipotent de la lignée lymphoïde et myéloïde (LMPP). Le LMPP se différencie en deux sous types de précurseurs, le précurseur commun de la lignée myéloïde (CMP) et le précurseur commun de la lignée lymphoïde (CLP) [102]. Les CMP se développeront ensuite en précurseurs des granulocytes et macrophages (GMP) et en précurseur des macrophages et DCs (MDP). Les MDP perdent alors leur potentiel de différenciation en granulocyte pour se différencier en progéniteur commun des monocytes (cMoP) et en précurseur commun des DCs (CDP). Les cMoP se différencient exclusivement en monocyte. Les CDP en fonction de leur expression de CSFR1, ou non, se différencient préférentiellement en précurseur spécifique des cDCs (pré-cDCs) ou en précurseurs des pDCs respectivement [103-105] (Figure 1A). Les pré-cDCs quitteront la moelle osseuse pour rejoindre la périphérie et se différencier en cDCs. Un précurseur antérieur aux pré-cDCs nommé pro-DC a été caractérisé dans la moelle et dans le sang de souris [103].

Cette voie linéaire de différenciation des cDCs n'est pas la seule qui permet de générer des cDCs (Figure 2A). Différentes études montrent que les cDCs peuvent se différencier à la fois via la voie myéloïde (CMP) et la voie lymphoïde (CLP). Des transferts *in vivo* de CMP et de CLP permettent de générer des cDCs dans la rate et le thymus notamment[106]. Ces études démontrent donc que la différenciation des cDCs est très régulée et que plusieurs voies sont présentes pour générer ces cellules. Étant donné le rôle majeur des cDCs dans l'initiation ou la

tolérisation d'une réponse immune, la non-redondance de ces voies permet différentes alternatives de différenciations de ces cellules en cas de défauts.

La majorité des études sur la différenciation des cDCs favorise un modèle de différenciation binaire, où un précurseur donne naissance à des progéniteurs des deux linéages, myéloïde versus lymphoïde. Cependant, de plus en plus d'études suggèrent que les populations de précurseurs présentent, et ce à des stades très tôt de la différenciation, tels que le LMPP, des signatures spécifiques des cDCs. Une méthode utilisant des code-barres qui permettent d'identifier chaque cellule et sa progéniture a démontré que les LMPP sont une population hétérogène où une cellule aura une signature lymphoïde et une autre myéloïde [107]. Par la suite, il a été démontré que cette trajectoire de différenciation en cDCs a déjà lieu au stade du HSPC [108]. Ces études révèlent la complexité du choix de différenciation d'un progéniteur et remettent en question les concepts actuels sur l'origine sur cDCs (Figure 2B).

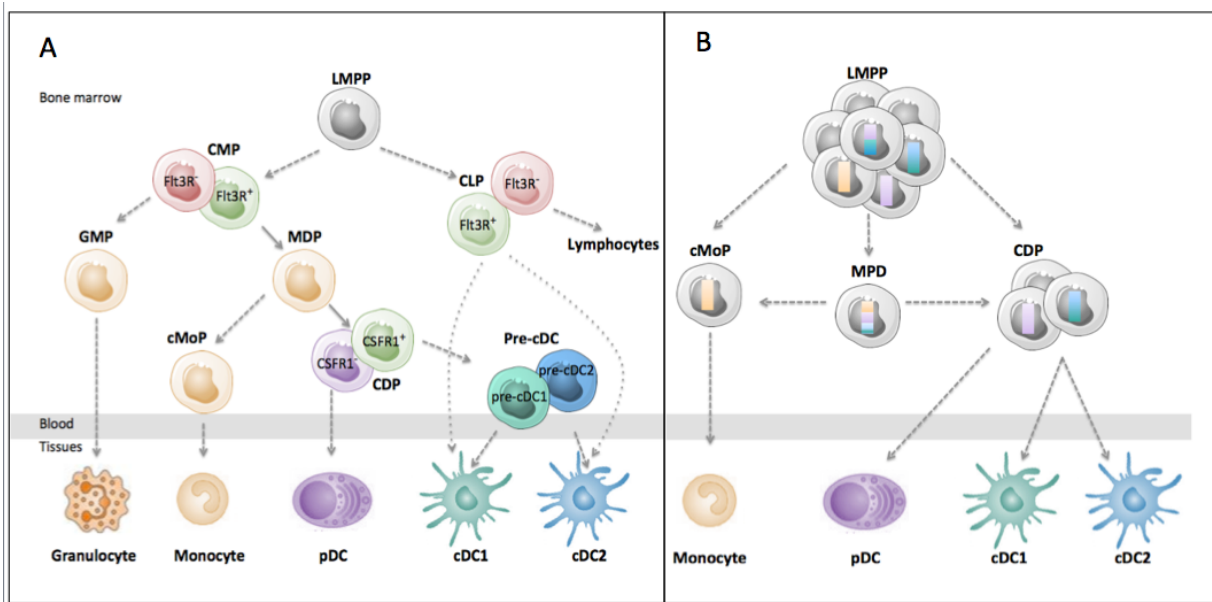


Figure 2. Les modèles actuels de différenciations des cDCs.

A) Modèle simplifié de différenciation linéaire des cDCs. Les LMPP présents dans la moelle osseuse se différencient en CMP ou CLP. Les CMP vont préférentiellement se différencier en GMP puis en granulocyte, mais les CMP exprimant le récepteur au Flt3L vont se différencier en MDP, progéniteurs bipotents, qui pourront se différencier en monocytes ou en CDP. Les CDPs exprimant le récepteur CSFR1 pourront se différencier en pré-cDC. Cette population hétérogène contient des progéniteurs préférentielles pour les sous-types de cDC1 et cDC2.

B) Modèle simplifié de différenciation non linéaire. Les LMPP sont décrits comme multipotents. Il est cependant suggéré qu'elles expriment un biais de lignée spécifique pour la génération de monocyte ou de cDCs. Les LMPPs monopotents (marqués d'une seule couleur) vont générer, soit des monocytes, soit des cDCs. Les LMPPs tripotents (marqués de trois couleurs) vont pouvoir se différencier en monocytes et en DCs, via l'intermédiaire d'un MDP et CDP bipotents. Les CDP pourront ensuite être séparés en précurseurs spécifiques des pDCs et en précurseurs des cDCs.

LMPP, progéniteur multipotent de la lignée lymphoïde; CMP, progéniteur myéloïde commun; CLP, progéniteur lymphoïde commun; GMP, précurseur des granulocytes et macrophages; MDP, progéniteur des macrophages; cMoP, progéniteur commun des monocytes. Figure réalisée d'après [102-108]

2.3.1.2. Le rôle des facteurs de transcription et cytokines

La spécification de chaque sous-type de précurseurs vers une différenciation en cDCs est hautement régulée par l'expression, ou non, de facteurs de transcription et par la présence de cytokines.

Zbtb46 est un facteur de transcription exprimé dès le stade pré-cDCs jusqu'aux cDCs [109, 110]. Lorsque son expression est forcée dans des progéniteurs de la moelle, un biais de différenciation en cDCs est observé [110]. Cependant, l'absence de *Zbtb46* n'est pas associée à une diminution des cDCs. Les cDCs générées en absence de *Zbtb46* gardent l'expression du récepteur au G-CSF et du facteur inhibiteur de leucémie (lif), normalement réprimé lors de la différenciation. Ces résultats suggèrent que *Zbtb46* n'est pas requis pour la différenciation des cDCs, mais est spécifique à la voie de différenciation cDCs [110].

Un facteur de transcription important dans l'orientation d'une différenciation vers les cDCs est PU.1. PU.1 est un membre de la famille des facteurs de transcription E-26 (*E26-transformation-specific*, ETS) et est exprimé par les CDP et les cDCs [111-113]. En absence de *PU.1* chez des souris déficientes, un défaut en cDCs est observé [111]. De plus, des expériences où l'expression de *PU.1* est forcée dans des précurseurs, suggèrent un rôle dose-dépendant de PU.1 dans le choix de différenciation macrophage versus cDCs [114-116].

L'expression de PU.1 est associée de façon dose dépendante à l'expression du récepteur du Flt3L (Flt3R ou CD135) par les cellules [111]. De manière intéressante, seules les CMP et CLP exprimant le Flt3R pourront se différencier en cDCs [117, 118], démontrant un rôle important du Flt3L pour la génération des cDCs. En absence du Flt3R ou de la cytokine, un défaut en cDCs est observé. Ce défaut est beaucoup plus dramatique en absence de la cytokine que du récepteur [119-121]. En absence du récepteur pour le Flt3L, les

précurseurs de cDCs augmentent leur sensibilité pour d'autres cytokines telles que le M-CSF ou CSF et pourront se différencier, expliquant la présence, cependant moindre, de cDCs dans ces souris [122]. L'injection de Flt3L *in vivo* conduit à une augmentation du nombre de précurseurs, de cDCs, mais aussi de pDCs, suggérant que la signalisation du Flt3L n'est pas spécifique seulement aux cDCs, mais est aussi requise pour la différenciation des DCs non conventionnelles [118].

De plus, PU.1 contrôle l'expression d'autres facteurs de transcription décrits comme étant importants pour les cDCs tel que *DC-SCRIPT*. L'absence de *DC-SCRIPT* conduit à un défaut en cDCs et une augmentation des pDCs. Cette étude démontre aussi que l'expression de PU.1 induit une répression de gènes impliqués dans la différenciation en pDCs et induit l'expression de gènes requis pour la différenciation et la fonction des cDCs tel que *Zbtb46* [123].

Le facteur de transcription *Irf8* est important pour la génération des cDCs. En effet, son expression ou non dans les LMPP permet de distinguer deux sous-types de progéniteurs. Les LMPP exprimant IRF-8 se différencient à partir des LMPP n'exprimant pas IRF-8. L'expression de ce facteur de transcription conduit à l'ouverture de la chromatine au niveau d'enhancers impliqués dans le linéage des cDCs, démontrant un rôle épigénétique dans la voie de différenciation [124]. Ces études suggèrent donc que la différenciation des cDCs ne suivrait pas un modèle de différenciation binaire, mais que les précurseurs sont une population déjà hétérogène où l'épigénétique et l'environnement peuvent marquer très tôt leur orientation en cDCs.

Cette hétérogénéité des précurseurs se retrouve aussi au stage pré-cDC. L'utilisation de scRNAseq sur la population de pré-cDC a permis de caractériser au moins quatre sous types

de précurseurs avec des signatures transcriptomiques distinctes, dans la moelle osseuse et dans la rate, qui se différencieront préférentiellement en cDC1 ou cDC2 [125, 126].

2.3.2. La spécification en cDC1

2.3.2.1. Précurseurs

Les pré-cDCs sont une population hétérogène de précurseur. Au sein de cette population, un sous type de cellules nommé pre-cDC1 a une capacité de différenciation préférentielle en cDC1 *in vivo*. Ce sous-type de pré-cDCs est caractérisé dans deux études différentes par l'absence de l'expression de Ly6C et de Siglec-H [125] ou par l'expression de CD117 et l'absence de CD115 [126]. Dans la rate, l'expression de CD24 a été associée avec une différenciation préférentielle des pré-cDCs en cDC1 [127].

De manière intéressante, des transferts *in vivo* de CLPs ont démontré que ces dernières vont préférentiellement se différencier en cDC1 plutôt qu'en cDC2 tandis que les CMP produiront un nombre similaire de cDC1 et cDC2, suggérant un biais cDC1/cDC2 très tôt dans la voie de différenciation [128]. Une autre étude publiée par l'équipe du Dr Naik démontre même une signature cDC1 dès le stade HSPC, progéniteur multipotent à la fois impliqué dans la voie myéloïde et lymphoïde [108]. Cela permet d'émettre l'hypothèse que le biais cDC1/cDC2 est présent très tôt dans le développement. L'avancée technologique combinant maintenant du scRNAseq avec de l'ATAC-seq, qui permet de voir les signatures épigénétiques, devrait ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension de la différenciation des cDCs et des cellules dendritiques en général [129].

2.3.2.2. Le rôle des facteurs de transcriptions et des cytokines

La différenciation en cDC1 est aussi affectée par l'expression de certains facteurs de transcription. Un des facteurs de transcription le plus décrits comme étant requis pour la différenciation en cDC1 est IRF-8. En absence de *Irf8*, un défaut en cDC1 CD8 α ⁺ et CD103⁺ est observé dans les organes lymphoïdes et dans la peau [130, 131]. IRF-8 contrôle notamment l'expression de gènes impliqués dans la production d'IL-12 [132]. Cependant, IRF-8 est aussi important pour la prolifération et le maintien des MDPs, impliqués dans le développement des cDCs, pDCs et monocytes. *Irf8* a donc un rôle important dans les précurseurs des cDCs en général et le maintien de son expression dans les pre-cDC1 sera associé avec leur différenciation en cDC1 [124, 133].

Le maintien de l'expression de IRF-8 dans la différenciation des cDC1 est lié à l'expression du facteur de transcription *Batf3*. L'absence de *Batf3* conduit à un défaut spécifique des cDC1 et pré-cDC1 dans le sang et la rate, mais pas dans la moelle osseuse. De manière intéressante, les pre-cDC1 de la moelle osseuse expriment IRF-8 en absence de *Batf3*, mais une fois en circulation, un défaut d'expression d'IRF-8 est observé, suggérant une régulation du maintien d'IRF-8 par BATF3 dans la différenciation des pre-cDC1 en cDC1 [126].

2.3.3. La spécification en cDC2

2.3.3.1. Précurseurs

Comme pour les cDC1, un sous type de pré-cDCs ayant un potentiel de différenciation en cDC2 a été caractérisé par l'expression de Ly6C et l'absence de Siglec-H [125] ou par

l'expression de CD115 et l'absence de CD117 [126]. De plus, dans la rate, les pré-cDCs exprimant de bas niveaux de CD24 vont préférentiellement se différencier en cDC2 [127].

Les cDC2 sont une population beaucoup plus hétérogène que les cDC1. En effet, les cDC1 vont varier en termes de phénotypes et de fonctions de façon dépendante de leur environnement, tandis qu'une haute hétérogénéité du phénotype des cDC2 est observée à la fois en fonction de leurs localisations, mais aussi au sein d'un même organe. De ce fait, différents facteurs de transcription sont impliqués pour la différenciation des différents sous-types de cDC2.

2.3.3.2. Le rôle des facteurs de transcriptions et des cytokines

Les cDC2 expriment le facteur de transcription IRF-4 par opposition aux cDC1 qui expriment et requièrent IRF-8. L'absence d'IRF-4, dans des modèles de souris déficientes, est associée à une réduction spécifique du nombre du sous-type de cDC2 CD11b⁺ qui exprime CD4⁺, dans la rate et les ganglions lymphatiques drainants [62, 134]. Cependant, des cDC2 CD11b⁺ sont présents dans la peau en absence d'*Irf-4*, mais ces dernières sont incapables de migrer de la peau aux ganglions lymphatiques drainants suggérant que IRF-4 ne seraient pas requis pour leur différenciation, mais pour leur migration [135].

Le facteur de transcription REL-B est hautement exprimé dans les cDC2 de la rate, mais pas par les cDC2 des autres tissus. En absence de ce dernier, un défaut en cDC2 CD11b⁺CD4⁺ est observé [136, 137]. REL-B est un membre de la famille de NF-κB et peut agir en répresseur ou activateur de la transcription, notamment via son interaction avec la sous-unité p50 ou p52 de NF-κB [138]. Cependant, le mécanisme par lequel REL-B contrôle le développement des cDC2 CD11b⁺CD4⁺ n'est pas encore bien caractérisé.

L'utilisation de chimères hématopoïétiques a démontré que REL-B régule de façon cellulaire intrinsèque seulement les cDC2 CD11b⁺CD4⁺Esam⁺ de la rate, mais n'est pas important pour la différenciation des cDC2 CD4⁺Esam⁻ spléniques ni pour les cDC2 des autres tissus [139].

Les cDC2 peuvent aussi être sous-divisées en fonction de leur expression et dépendance au récepteur Notch-2 et à son effecteur Rbpjk. La délétion ubiquitaire, ou spécifique aux cellules exprimant CD11c de Rbpj, induit une diminution du nombre de cDC2 CD11b⁺ESAM⁺ dans la rate ainsi qu'une diminution des cDC2 CD11b⁺CD103⁺ dans les intestins [88, 140].

Les cDCs sont donc une famille de cellules hétérogènes. Les cDCs expriment de hauts niveaux de MHC-II et de CD11c. Leur phénotype varie en fonction des tissus et peut-être différent chez l'humain. Les cDCs se différencient principalement par une voie myéloïde, mais peuvent aussi provenir de la voie lymphoïde. Cependant, l'avancée des techniques a permis de démontrer une signature transcriptomique de cDCs dès le stade LMPP et HSPC, remettant en question le schéma actuel de différenciation. Les cDCs sont divisées en deux grandes familles, les cDC1 et les cDC2. Chaque sous-type est dépendant de facteurs de transcription distincts et possède des fonctions qui leurs sont propres. Comprendre l'hétérogénéité des cDCs, en termes de fonctions, phénotypes et différenciations est un domaine actuellement en plein essor. En effet, déterminer les spécificités de chaque sous-type permettra notamment de mieux comprendre leurs rôles dans l'initiation ou la tolérisation d'une réponse immune.

3. Les cellules dendritiques non conventionnelles

3.1. Généralités

La caractérisation des cellules dendritiques a permis la mise en évidence d'une riche diversité en terme de sous-type et a complexifié leur classification. Les DCs regroupent les cDCs, décrites précédemment, ainsi que les DCs dites non conventionnelles telles que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et les cellules dendritiques dérivées de monocytes (mo-DCs). Les cDCs et les DCs non conventionnelles partagent des similitudes phénotypiques. Cependant, les DCs non conventionnelles ont des propriétés fonctionnelles qui leur sont spécifiques ainsi que des voies d'ontogénie différentes des cDCs, remettant en question leur classification parmi les cellules dendritiques.

3.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDCs ont d'abord été décrites chez l'humain comme une population de cellules présente dans le sang périphérique produisant de hauts niveaux d'IFN de type I (α et β) [141-143] puis dans un modèle murin en 2001 [144-146]. Les pDCs ont une morphologie comparable aux plasmocytes, mais à l'inverse de ces dernières, elles vont, suite à leur activation par un agent viral, produire de fortes quantités d'IFN- α et pourront activer les lymphocytes T naïfs, suggérant que ces cellules font partie de la famille des DCs [147]. Les pDCs expriment notamment le TLR7 et le TLR9 au sein du compartiment endosomal permettant la détection des ARN et des ADN viraux respectivement [148]. L'activation de ces récepteurs conduit entre autres à la production d'IFN de type I via la voie de signalisation Myd88/IRF-7 [149]. De plus, leur déplétion dans différents modèles murins conduit à un

défaut dans le contrôle d'infection aiguë et chronique, leur conférant un rôle majeur dans le contrôle des infections [149, 150].

3.2.1. Leur phénotype

Comme les cDCs, les pDCs n'expriment pas les marqueurs lymphocytaires (CD3 et TCR) et les marqueurs de cellules NK (NK1.1, DX5). Cependant, les pDCs murines se distinguent des cDCs par l'expression de niveau intermédiaire de CD11c et l'expression de B220 [146], en opposition aux cDCs qui sont CD11c^{fort}B220^{neg}. Les pDCs se caractérisent de plus par l'expression de Siglec-H [151], BTS2 (ou mPDCA-1) [152], CD2 et Ly6C [153], non exprimés par les cDCs. Chez l'humain, les pDCs n'expriment pas CD11c, mais elles exprimeront BDCA2, CD123 ainsi que CD2 [154]. Chez la souris et chez l'humain, les pDCs peuvent exprimer CD8a et CD4 révélant un premier degré d'hétérogénéité de cette famille de cellules. D'autres marqueurs, notamment des récepteurs de migration, peuvent ou non être retrouvés sur les pDCs en fonction de leur localisation [155]. De façon générale, les pDCs murines et humaines expriment et sont dépendantes du facteur de transcription E2.2 [156, 157] ainsi que de IKAROS [158].

Les pDCs se retrouvent principalement dans la moelle osseuse où elles se développent et rejoignent la zone T des ganglions lymphatiques drainants via la circulation sanguine et leur passage via les HEVs, à l'inverse des cDCs qui privilégient la voie lymphatique [159]. Les pDCs seront aussi présentes dans la pulpe blanche de rate [160], dans le thymus [161], dans le petit intestin et le colon [162] par exemple. La migration des pDCs est régulée notamment par l'expression de récepteurs de migrations spécifiques. Par exemple, la migration au thymus et

au petit intestin est dépendante de CCR9 tandis que la migration au colon est CCR9 indépendante [155, 161, 162].

3.2.2. Ontogénie

Classiquement, les pDCs se différencient selon la voie myéloïde ou lymphoïde. En effet, les pDCs et cDCs se différencient à partir des CDP de la moelle osseuse. Les CDP se sous-divisent en CDP CD115⁺ et CD115⁻ présentant un potentiel de différenciation préférentielle en cDCs ou en pDCs respectivement [104]. L'augmentation de l'expression de E2-2 par le CDP CD115⁻ permet sa différenciation en précurseur de pDCs exprimant CD11c^{int}B220⁺Siglec-H⁺, mais n'exprimant pas CCR9. Cependant, ce pre-pDC CCR9⁻ présente toujours un potentiel de différenciation en cDCs et en pDCs en fonction de l'environnement [163, 164]. De façon intéressante, les pDCs présentent de fortes similitudes avec les cellules de la famille des lymphocytes B, tel que la présence de réarrangement des gènes chaînes lourdes des immunoglobulines, la présence de transcrit RAG et l'expression de marqueur de surface classiquement attribuer aux cellules B tel que B220 [165]. De plus, in vitro les CLP peuvent générer des pDCs aux phénotypes et fonctions similaires à celles présentes in vivo [165, 166].

Récemment, une étude réalisée par l'équipe du Dr Ginhoux a remis en question la différenciation des pDCs [153]. En utilisant une stratégie basée sur du single cells RNAseq associée à des analyses bio-informatiques de prédiction du degré de différenciation, suivie d'une validation in vitro et in vivo, ils démontrent que les pDCs se différencient principalement par la voie lymphoïde. Leur étude démontre la différenciation des pDCs à partir du LMPP en pro-préDCs Ly6D⁺, précurseur qui présente de nombreuses similitudes avec le

CLP IL-7Ra⁺Ly6D⁺CD115⁻ à la fois au niveau phénotypique et transcriptomique. Ce pro-pDCs se différenciera ensuite en pre-pDCs (Ly6D⁺IL-7R⁺Flt3L⁺Siglec-H⁺CD81⁺CD115⁻) puis en pDCs [153].

3.3. Les cellules dendritiques dérivées de monocytes

Les mo-DCs représentent une population rare de cellule à l'état de base [167], mais leurs nombres augmentent fortement dans des modèles inflammatoires [168-173]. Lors d'une infection notamment, les monocytes se différencient en mo-DCs, cellules aux phénotypes et fonctions très similaires aux cDCs. En effet, en plus de présenter la capacité d'induire une réponse T, les mo-DCs peuvent faire de la présentation-croisée d'Ag [174], fonction classiquement attribuée classiquement aux cDC1. L'origine monocyttaire des mo-DCs et leur augmentation en condition inflammatoire sont deux critères qui remettent en question leur appartenance à la famille des cDCs, mais qui leur suggère un rôle important dans des situations où une augmentation des APCs, au lieu même de l'inflammation, peut favoriser et renforcer l'initiation d'une réponse adaptative et un meilleur contrôle de l'infection par exemple.

3.3.1. Phénotype

Les mo-DCs partagent de nombreuses similitudes phénotypiques avec les cDCs comme notamment l'expression de CD11c, CD26, du CMH-II [168, 175] et expriment le facteur de transcription spécifique aux cDCs, Zbtb46 [109, 110, 176]. Elles expriment de plus les marqueurs DC-SIGN, CD206, Sirp- α ainsi des marqueurs attribués au lignage monocyte/macrophage tels que CD14, F4/80 et CD64 [175, 177]. Une difficulté dans la caractérisation in

vivo de ces cellules est notamment liée au fait qu'il est décrit dans certaines études que le phénotype des mo-DCs est très dynamique. En effet, suite à une infection au LPS par exemple, les mo-DCs perdent rapidement l'expression des marqueurs associés aux monocytes comme Ly6C et CD115 et augmentent l'expression de CD11c, CMH-II et CD14. De plus, elles acquièrent une morphologie similaire aux cDCs [177]. Les mo-DCs ont aussi été décrites chez l'humain dans différentes pathologies inflammatoires [178-180] et partagent de nombreuses similitudes avec les mo-DCs murines. Elles expriment CD11c, HLA-DR, CD14, BDCA1, FcεR1, CD206 ainsi que CD11b et CD172 [174, 181].

Les mo-DCs se retrouvent donc au lieu de l'inflammation où ont été recrutés les monocytes circulants. Les mo-DCs seront présentes, par exemple, dans la rate de souris infectées par la bactérie *Listeria monocytogenes* [169], dans les ganglions lymphatiques drainants médiastinaux suite à une infection à influenza [171], dans les tissus pulmonaires lors d'une infection fongique à *Aspergillus* [170] ainsi que dans le colon et les ganglions mésentériques dans un modèle de colite [172], mais aussi dans la zone T des ganglions lymphatiques drainant suite à l'injection de LPS [177].

3.3.2. Ontogénie

Classiquement, les monocytes se différencient à partir du précurseur CDP puis GMP puis MDP pour ensuite générer un précurseur spécifique des monocytes nommée cMoP dans la moelle osseuse [182-185]. Le cMoP exprime les marqueurs CD117, CD115, Ly6 et n'exprime pas CD135, CD3, CD19 et NK1.1 [185]. La voie de différenciation des monocytes est donc très proche de la voie de différenciation des cDCs qui passe, selon le modèle de différenciation linéaire, par le précurseur MDP bipotent (Figure 2A). Le précurseur cMoP a la

capacité de se différencier en monocytes inflammatoires ou circulants (*patrolling monocytes*) en fonction du maintien ou non de l'expression de Ly6C respectivement [185]. Cependant, cette voie de différenciation a été remise en cause dans une étude récente [186]. En effet, via la génération d'une souris reportrice de l'expression du gène *Ms4a3*, décrit comme spécifique aux monocytes et macrophages, les auteurs démontrent que les MDP ne proviennent pas des GMP. De plus, ils démontrent que les MDP génèrent des monocytes sans la génération du cMoP. Cela suggère 2 voies de différenciation des monocytes directement à partir des MDP ou via la différenciation du GMP en cMoP [186]. D'autres études seront nécessaires pour comprendre l'impact de chaque voie dans la différenciation des monocytes et des mo-DCs.

La différenciation du monocyte en mo-DCs est majoritairement reliée à un environnement inflammatoire. En effet, le GM-CSF et l'IL-4 notamment sont décrits comme importants pour la génération de ces cellules même si en absence de ces dernières une différenciation en mo-DCs est observable, mais cependant plus faible [176, 181]. De plus, l'expression de IRF-4 semble primordiale à leur différenciation dans des études *in vitro* [176]. Son expression est induite *in vitro* par la présence d'IL-4 dans le milieu [176]. De plus, IRF-4 permet l'induction de la transcription du facteur NR4A3, dont l'absence dans un modèle de souris déficiente est associé à un défaut en mo-DCs DC-SIGN⁺ [175].

3.4. La classification des pDCs et des mo-DCs

Les pDCs et les mo-DCs sont donc des cellules capables de mûrir suite à une interaction avec un ligand TLR, de phagocyter et de présenter des Ag dans le but d'induire une réponse des lymphocytes T, caractéristiques partagées avec les cDCs. Cependant, leur classification est encore aujourd'hui source de débat.

Les pDCs diffèrent des cDCs notamment par leur origine lymphoïde [153, 166] en opposition aux cDCs qui privilégie une voie myéloïde selon le modèle de différenciation linéaire. De plus, la présence caractéristique de dendrites par les cDCs n'est pas retrouvée chez les pDCs qui présentent une morphologie de cellules rondes [148]. Dans des modèles d'infections chroniques comme LCMV clone 13, les pDCs présentent un phénotype épuisé, c'est-à-dire une diminution de leur capacité à produire de hauts niveaux d'IFN de type I, mais conserve la capacité à mûrir [187, 188]. L'épuisement lors d'infection chronique est une propriété décrite plus particulièrement pour la réponse des lymphocytes T [189], mais qui à ce jour n'a pas été démontrée pour les cDCs. L'appartenance des pDCs à la famille des DCs a de plus été remise en question par l'équipe du Dr Ginhoux qui suggère que les pDCs seraient en réalité un sous-type de cellules lymphoïdes innées (*innate lymphoid cell*; ILC) de par leur origine lymphoïde et leur propriété spécifique. D'autres études sont nécessaires pour conclure sur la classification des pDCs [153].

Les mo-DCs partagent de nombreuses similitudes avec les cDCs. Notamment, les mo-DCs possèdent dans certains modèles, la capacité de faire de la présentation croisée d'Ag, propriété normalement attribuée aux cDC1. Cependant, les mo-DCs utiliseraient l'aminopeptidase IRAP pour présenter de façon croisée des antigènes solubles, facteur non essentiel pour les cDC1 [190]. La définition des mo-DCs est complexe et peut varier d'une étude. Une étude a par

exemple démontré que les mo-DC DC-SIGN⁺ exprimaient peu le facteur de transcription Zbtb46 [191], tandis les mo-DCs différenciées in vitro expriment ce facteur [176]. Une autre différence est la dépendance au Flt3L. Cette cytokine est majeure pour la différenciation et la survie des cDCs [103, 105], mais, selon les modèles, n'est pas requise pour la génération des mo-DCs [192]. Cependant, d'autres études ont démontré la présence d'un sous-type de mo-DCs dépendant au Flt3L dans un modèle d'injection au LPS dans une souris déficiente pour le Flt3L [177].

Même si l'appartenance des pDCs et les mo-DCs dans la famille des DC est remise en question et nécessite d'autres études, il est évident que ces cellules ont un rôle majeur dans l'initiation d'une réponse immune que ce soit par la forte production d'IFN de type I ou par leur différenciation au lieu même de l'inflammation/infection.

4. Les cellules dendritiques mérocytiques

4.1. Phénotype

Récemment, une nouvelle population de DCs CD11c⁺MHC-II⁺ a été décrite dans la rate et les ganglions lymphatiques drainants de la souris, les DCs mérocytiques (mcDC). Cette sous-population n'exprime pas les marqueurs de surface CD8 α et CD11b, respectivement spécifique des cDC1 et des cDC2 (Figure1) [193, 194]. De manière intéressante, les mcDCs partagent des similitudes avec les cDC1 telles que la capacité à phagocyter des corps apoptotiques et la présentation croisée. Cependant, les mcDCs ont la spécificité de stocker les Ag dérivés de corps apoptotiques dans des endosomes non acidifiés. Cette caractéristique leur permet de conserver et de présenter ces Ag aux LT pendant une longue période [194].

Les mcDCs présentent des fonctions qui leur sont propres et non retrouvées dans les autres sous types de cDCs. En effet, elles ont l'unique capacité de renverser l'anergie lorsqu'elles présentent de façon croisée des antigènes issus de corps apoptotiques. La présentation d'Ag issus de corps apoptotiques était jusqu'à la découverte des mcDCs, une propriété liée aux cDC1 et associée à l'induction d'un état de tolérance [82]. Cependant, lorsque les mcDCs sont chargées avec des peptides dérivés de corps apoptotiques issus de cellules bêta du pancréas puis transférées dans une souris non diabétique, le diabète est induit [193]. Dans un modèle de cancer, le transfert de mcDC chargées avec des peptides dérivés de corps apoptotiques exprimant l'ovalbumine (OVA) dans une souris ayant une tumeur B16 exprimant l'Ag OVA, conduit à l'élimination de la tumeur [194]. Ces deux exemples sont associés spécifiquement aux mcDCs puisque le transfert de cDC1 ou cDC2 chargées avec des corps apoptotiques n'aura aucun impact sur l'induction de l'auto-immunité ou le contrôle tumoral.

À ce jour, aucun équivalent humain n'a encore été associé aux mcDCs. Cependant, plusieurs sous-types de cDCs humaines, négatives pour les marqueurs de cDC1 et de cDC2, ont été caractérisés tels que les AxIDCs dans le sang, la rate, la peau et les amygdales [44, 47]. Le marqueur Axl n'étant pas exprimé chez la souris, la fonction de cette sous-population humaine devra être comparée aux fonctions particulières des mcDCs afin de déterminer leur relation.

Ces cellules, qui brisent la tolérance, semblent avoir un impact néfaste sur l'organisme puisqu'elles peuvent induire l'auto-immunité. Définir le rôle de ces cellules à l'état de base est donc un axe de recherche pertinent pour la santé humaine. Il est tentant de spéculer que ces cellules, lorsqu'elles sont présentes en nombre physiologique, seraient importantes pour

contrôler le développement tumoral en activant le système immunitaire suite à la détection d'une cellule en apoptose. À l'inverse, si leur proportion est augmentée, leur chance de détecter et présenter des peptides issus de corps apoptotiques aux LT est donc plus grande, augmentant le risque d'induire une réponse auto-immune dans des organismes présentant des susceptibilités à l'auto-immunité. Cependant, aucune démonstration n'a déterminé leur rôle en absence d'un contexte pathologique à ce jour.

4.2. La spécification en mcDC

4.2.1. Précurseurs

La différenciation des mcDCs n'a pas encore été élucidée. Cependant, leur absence d'expression de CD8 α et de CD11b, malgré leur haute expression de MHC-II et de CD11c, pourrait laisser suggérer que ces cellules sont une population de précurseur des cDC1 et/ou des cDC2. Cependant, le transfert de mcDC *in vivo* démontre qu'elles conservent leur phénotype double négatif après trois jours de transfert, confirmant leur statut de DCs différenciées [194]. L'utilisation de technique telle que le code-barre associée à des expériences de transferts et/ou de culture de différents précurseurs déjà caractérisés pour la voie des cDCs permettra de déterminer leur voie de différenciation.

4.2.2. Les rôle des facteurs de transcription et des cytokines

Les facteurs de transcription spécifiques requis pour la différenciation des mcDCs n'ont pas été caractérisés à ce jour. Cependant comme pour les autres cDCs, l'injection de Flt3L *in vivo* est associée à une augmentation de leur nombre [193].

De manière intéressante, des études d'analyses de liaisons, permettant d'associer un locus à un phénotype, ont mis en évidence un locus du chromosome 2, nommé *Idd13*, statistiquement corrélé avec les proportions de mcDCs. L'implication de ce locus nommé *Idd13* dans le contrôle de cette sous-population de cDCs a été validée par l'utilisation de la souris NOD (*non-obese diabetic mice*) congénique où le locus *Idd13* provient de la souris C57BL/6. Dans ce modèle, les proportions de mcDCs sont restaurées au niveau des souris non susceptibles au diabète, suggérant que dans cet intervalle, un ou plusieurs gènes sont impliqués dans la régulation des proportions de mcDCs [195]. Des études explorant le rôle des gènes codés dans ce locus permettront de comprendre la voie de régulation des mcDCs.

Les avancées en termes de sc-RNAseq ou de RNA-seq permettront de déterminer, au niveau du transcriptome, des facteurs de transcription exprimés spécifiquement dans les mcDCs en comparaison aux autres sous-types de cDCs et ouvrir des pistes sur leur voie de différenciation.

Les mcDCs sont des APCs capables de renverser l'anergie lorsqu'elles présentent des Ag dérivés de cellules en apoptose. Les mcDCs expriment CD11c et le MHC-II, mais n'expriment ni CD8 α , ni CD11b [193] (Figure 1). Malgré leur capacité à produire de hauts niveaux d'IFN de type I, propriété normalement attribuée aux pDCs, les mcDCs n'expriment pas les marqueurs retrouvés sur les pDCs, tels que B220 et mPCDA1 [148, 149, 196]. Le pouvoir d'activation des mcDCs est très élevé tandis que les pDCs sont de faibles APCs [147, 194]. Ces observations suggèrent que les mcDCs sont donc plus proches de la famille des cDCs que des pDCs. À ce jour, aucune évidence concrète n'a confirmé l'appartenance des mcDCs aux cDCs. Déterminer l'expression de facteur de transcription *Zbtb46*, spécifique aux

cDCs, mais absent dans les pDCs [109, 110], leurs propriétés homéostatiques ainsi que les mécanismes qui les régulent spécifiquement sont autant de caractéristiques qui permettront d'établir leur appartenance aux cDCs. Comprendre les mcDCs permettra de tirer avantage de leur capacité à renverser l'anergie dans diverses thérapies notamment dans les stratégies antitumorales.

5. Les cDCs dans le maintien de la tolérance immune

Cette section est inspirée d'un article de revue publié dans le *Journal of Immunology*, nommé « The importance of dendritic cells in maintaining immune tolerance » (Audiger et al., *Journal of Immunology*, 2017 Mar 15;198(6):2223-2231 (Annexe 4))

5.1. Mise en évidence du rôle des cDCs dans la tolérance immune

Le rôle important des DCs dans la tolérance immune a été caractérisé dans différents modèles permettant de moduler leur nombre *in vivo*. La déplétion des DCs CD11c⁺ dans un modèle de souris transgénique CD11c-Cre/ROSA-diphtheria toxin A (CD11c-DTA) est associée à une augmentation des LT Th1 et Th17, ainsi qu'au développement d'un sévère phénotype auto-immun (splénomégalie, lymphodénopathie et infiltration des organes non lymphoïdes) [197-199]. Ces résultats ont été confirmés dans un autre modèle murin où le récepteur à la toxine diphtérique est exprimé sous le contrôle du facteur de transcription *Zbtb46*. Suite à l'injection de la toxine diphtérique, les cDCs sont éliminées et la souris présente des bris de la tolérance immune tels que des désordres myéloprolifératifs [109, 200].

Ces expériences démontrent donc l'importance des cDCs dans le maintien de la tolérance immune.

De façon surprenante, si l'élimination des DCs conduit au développement de traits auto-immuns, l'augmentation des DCs peut être associée à une protection ou à des bris de tolérance en fonction du contexte. L'injection de Flt3L dans une souris susceptible au diabète auto-immun (la souris NOD) induit une augmentation du nombre de DCs *in vivo* et prévient l'apparition du diabète [201]. Cependant, lorsque le nombre de DCs est augmenté via une inhibition des voies de l'apoptose, comme dans le modèle de souris CD11c-p35, où l'expression de p53, impliquée dans l'inhibition des caspases, est induite sous le contrôle du promoteur CD11c, une infiltration des organes non lymphoïdes est observable ainsi qu'une forte activation des populations T et B *in vitro* et *in vivo* [202]. De façon semblable, la délétion de *Bim* dans les DCs augmente leur capacité à activer les lymphocytes T *in vitro* et induit la production d'auto-anticorps *in vivo* dans des expériences de transferts [203]. Ces études démontrent donc que, dépendamment du contexte, l'augmentation ou la diminution du nombre de DCs peut être ou non associée au développement d'auto-immunité, suggérant un mécanisme de régulation complexe.

Le système immunitaire est basé sur la reconnaissance du soi versus le non-soi. Les cDCs ont un rôle important dans l'éducation dans le thymus et le contrôle en périphérie des LT afin de s'assurer que les LT qui présentent une réactivité envers le soi ne puissent pas initier de réponse auto-immune. Pour ce faire, différents mécanismes de tolérance sont présents tels que la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

5.2. Les cDCs dans la tolérance thymique

Les LT vont lors de leur différenciation réarranger de façon aléatoire les segments de gènes codant pour leur chaîne du TCR. La tolérance centrale permet de tester le potentiel autoréactif de ces derniers afin d'éviter la migration en périphérie de ces cellules autoréactives, où elles pourraient initier une réponse immune contre le soi.

La tolérance centrale est basée sur la reconnaissance des peptides du soi présentés dans le contexte du MHC par les APCs et/ou les cellules épithéliales aux LT. Les DCs ont un rôle majeur dans ce processus (Figure 3). En effet, l'expression restreinte du MHC-II (I-E) uniquement sur les DCs montre que ces dernières sont suffisantes pour sélectionner négativement les thymocytes spécifiques dans un modèle de superantigènes endogènes en comparaison à des souris où le MHC-II est exprimé sur toutes les APCs [204]. De plus, les DCs sont les seules APC capables d'induire une sélection négative des thymocytes dans des cultures de thymus réagrégé (*reaggregate thymus organ culture*) [205]. Ces deux études suggèrent donc un rôle majeur des DCs dans la tolérance centrale. Les DCs n'ont pas seulement un rôle dans la présentation des antigènes. Elles sont aussi impliquées, lors de la sélection négative, dans le recrutement au sein de la médulla des thymocytes ayant subi la sélection positive via la production du ligand de CCR4 [206]. Comme dans l'induction d'une réponse immune, les différents sous-types de cDCs ont des rôles non redondants dans la tolérance thymique.

Les cDC1 résidentes ($CD8\alpha^+ Sirp-\alpha^-$) sont le sous-type de cDCs majoritaire dans le thymus. Elles se différencient à partir de précurseurs lymphoïdes thymiques et se localisent préférentiellement au sein de la médulla. Les cDC1 vont présenter un large panel de peptides du soi, ainsi que présenter, de façon croisée, des Ag issus de la circulation sanguine ou des Ag

tissus spécifiques issus des cellules épithéliales présentes dans la médulla du thymus [207-209]. Les cDC2 (CD8 α ⁻CD11b⁺Sirpa⁺) présentes dans le thymus proviennent de la périphérie. Des expériences de parabioses ont démontré que les cDC2 migrent au thymus via l'interaction du récepteur CCR2 et de l'intégrine α 4 [210-212]. Elles se retrouvent principalement au niveau de la jonction cortico-médullaire du thymus où elles présentent des Ag du soi captés en périphérie permettant la sélection négative des thymocytes reconnaissant ces Ag [210-212].

Les cDC1 résidentes et les cDC2 migratoires ont la capacité de sélectionner des thymocytes autoréactifs qui, au lieu de mourir par apoptose, se différencient en LT régulateur dit naturel (nTreg) [205, 213, 214]. Dans un modèle de chimères hématopoïétiques où seules les DCs peuvent présenter l'Ag de l'OVA et où les LT sont spécifiques pour cet Ag, des nTreg sont retrouvés dans le thymus confirmant que les DCs sont capables d'induire leur différenciation [215]. Les cDC1 résidentes et les cDC2 migratoires ont des mécanismes distincts permettant la sélection des nTreg. Les cDC1 résidentes, par l'expression de CD70, favorisent leur survie tandis que les cDC2 migratoires, déficientes pour CD70, permettent la différenciation de nTreg *via* un mécanisme encore inconnu [214]. Cependant, les DCs ne sont pas les seules cellules capables d'induire des nTreg. Dans certains contextes, en absence d'APCs et en présence d'une forte concentration d'Ag du soi, des nTreg peuvent être retrouvés, suggérant un rôle des cellules épithéliales thymiques [216].

Même si la tolérance centrale permet d'éliminer un grand nombre de T autoréactifs, certains réussissent à quitter le thymus nécessitant la présence d'autres mécanismes de tolérance en périphérie.

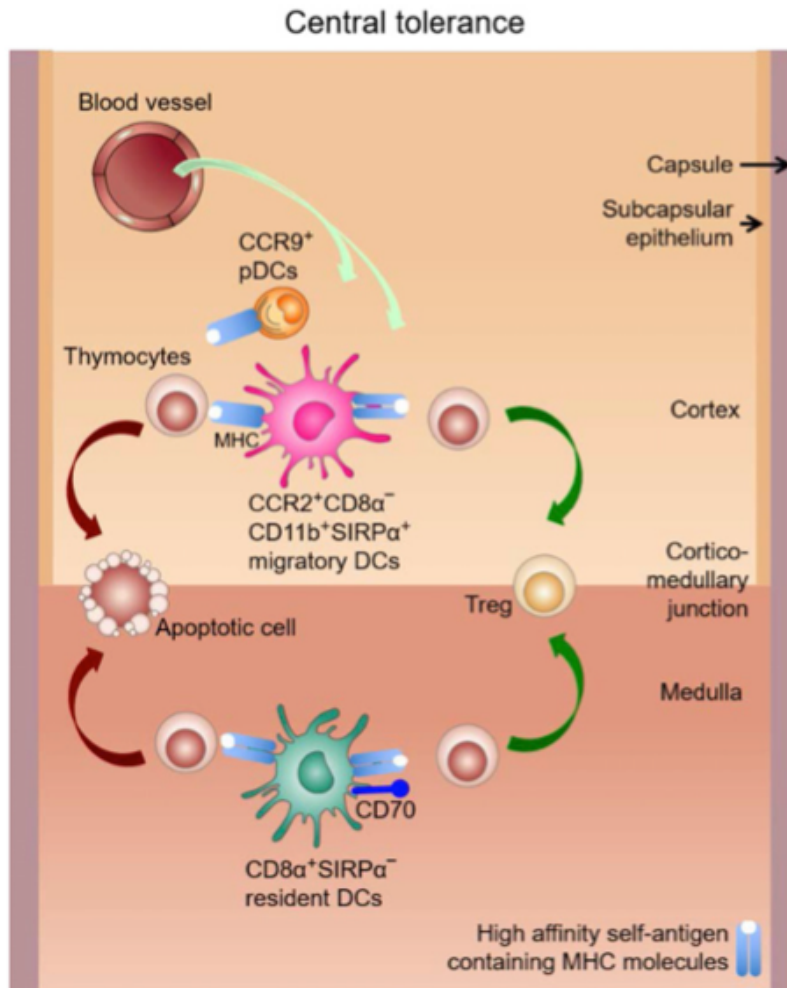


Figure 3. Les rôles des cDCs dans la tolérance centrale.

Les cDC2 migratoires ($CD11b^+CCR2^+$) migrent de la périphérie au cortex du thymus pour induire la tolérance. Elles présentent des Ag issus de la périphérie et induisent l'apoptose des thymocytes autoréactifs. Les cDC2 migratoires promeuvent aussi la différenciation de LT régulateurs. Les cDC1 résidentes ($CD8\alpha^+$) entraînent une tolérance thymique par l'induction de l'apoptose des thymocytes autoréactifs et permettent la différenciation et la survie des Treg. Issus de [22].

5.3. Les cDCs dans la tolérance périphérique

Dans un contexte non inflammatoire, les DCs présentent des Ag du soi aux LT. Les LT qui reconnaissent ces Ag du soi s'activeront de façon transitoire pour, soit devenir anergiques et donc incapables de produire des cytokines et de proliférer; soit mourir par apoptose [17]. Différents mécanismes permettent l'élimination des cellules T autoréactives ou leur anergie tels que l'inhibition de la voie de NF- κ B, l'activation des voies de l'apoptose dépendantes de FAS ou de BIM ainsi que de la production de TNF- α [217-219].

Les cDCs tolérogènes, en opposition aux cDCs immunogènes, sont définies en fonction de leur état de maturation ou des signaux donnés aux lymphocytes (Figure 4) [209]. En absence d'inflammation ou de pathogènes, les cDCs sont dans un état immature caractérisé entre autres par une faible expression des molécules de co-stimulations, du CMH de classe 2, la sécrétion de cytokines tolérogènes et vont présenter des Ag du soi [22]. L'interaction des cDCs immatures avec les LT conduit à leur anergie. Ce mécanisme de tolérance des cDCs immatures est une des cibles explorées dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contrôler les bris de tolérance. Par exemple, différentes études ciblent les récepteurs DEC205 ou DCIR2, exprimés respectivement sur les cDC1 et cDC2 [220]. L'interaction de DEC205 et DCIR2 avec leurs ligands conduit rapidement à l'internalisation du complexe dans le compartiment endosomal et/ou lysosomal et à la présentation antigénique [41, 221]. Des stratégies visant à injecter *in vivo* des Ag couplés à des anti-DEC205 ou – DCIR2 afin de forcer la présentation de ces Ag par les cDCs immatures pour établir une tolérance spécifique sont prometteuses. En effet, l'Ag se retrouve présenté de façon efficace par les cDCs conduisant à l'anergie ou l'élimination des LT spécifiques à l'Ag [41, 222].

Les cDCs expriment aussi différents signaux importants pour leur tolérogénicité. L'absence spécifique par exemple dans les cDCs de la molécule A20, protéine anti-inflammatoire impliquée dans la voie du NF- κ B, est associée avec une augmentation spontanée de leur maturation, de l'activation et de la prolifération des LT, ainsi qu'au développement de colite spontanée. L'expression de A20 dans les cDCs est donc nécessaire pour préserver un état de tolérance [223]. La production par les cDCs d'indoléamine-pyrrole-2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane va affecter la survie des LT. En effet, l'augmentation de la synthèse d'IDO par les cDCs va conduire à l'apoptose des LT effecteurs *via* une privation du tryptophane requis pour leur survie [224, 225].

En plus de leur capacité à tolérer ou à éliminer les lymphocytes autoréactifs en périphérie, les cDCs induiront la différenciation de ces LT en LT régulateurs dits induits (iTreg). Comme dans le thymus, les cDC1 et cDC2 en périphérie présentent différents mécanismes pour induire la différenciation des iTreg. Les cDC1 sécrètent de hauts niveaux de TGF- β , cytokine importante pour la différenciation de iTreg FoxP3⁺ [226, 227]. Les cDC2 peuvent d'induire la différenciation de iTreg en présence de TGF- β exogène, mais auront surtout un rôle sur la prolifération et la survie des Treg déjà existant [227].

De façon surprenante, les Treg ont aussi un rôle sur la tolérance par les DCs. En absence de Treg, le nombre de DCs augmente. De plus, leur phénotype sera beaucoup plus mature en termes d'expression de molécules de costimulation ce qui sera associé à une réponse T augmentée. Cela suggère donc un double mécanisme de tolérance, où les DCs favorisent la différenciation des Treg et où les Treg maintiennent les DCs à un stade immature [228, 229].

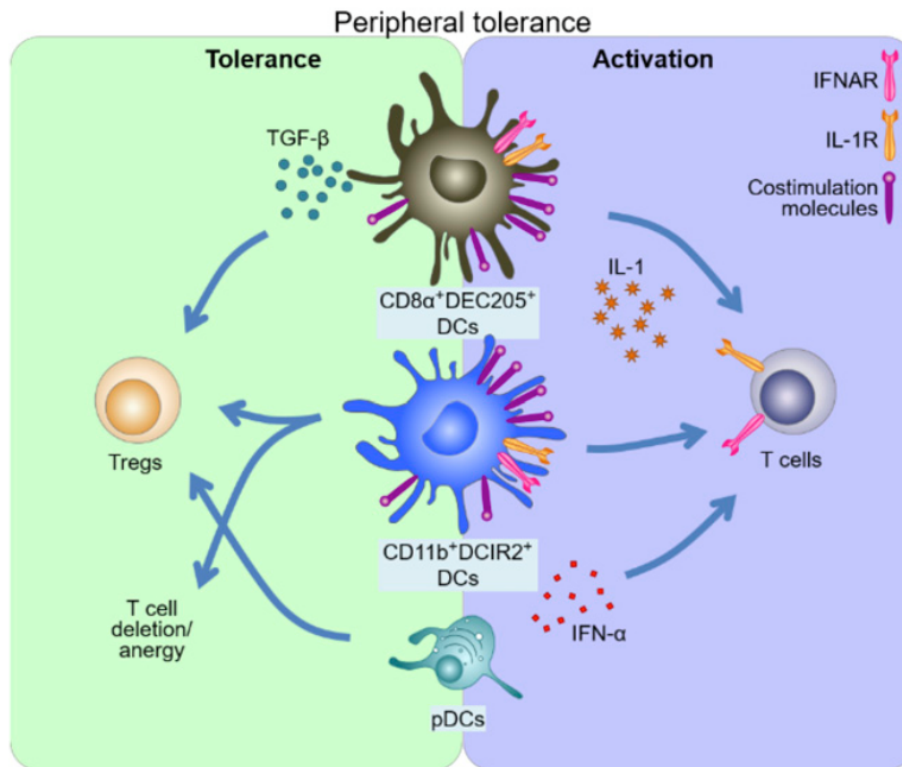


Figure 4. Le rôle des cDCs dans la tolérance périphérique.

En condition inflammatoire (fond violet), les cDCs matures permettent l'activation des LT. Cependant en absence d'inflammation (fond vert), les cDCs induisent la tolérance en périphérie en promouvant la différenciation ou la fonction des Treg. Les cDCs peuvent aussi induire l'anergie ou la mort des LT. Issus de [22].

5.4. Les cDCs dans les maladies auto-immunes

Les DCs ont un rôle majeur dans le contrôle de l'initiation d'une réponse immune. Des dérèglements dans leurs nombres ou fonctions vont altérer ce contrôle et conduire aux développements de maladies auto-immunes.

Chez l'humain et la souris, le diabète de type 1 est associé à une signature IFN dans le pancréas [230, 231]. Dans la souris NOD, cette augmentation d'IFN de type I dans le pancréas est présente bien avant l'infiltration des LT [231]. Malgré cette forte inflammation, les cDCs isolées de la rate et des ganglions lymphatiques drainants pancréatiques d'une souris NOD, modèle de diabète spontané, présentent un défaut dans l'expression des gènes dépendant de l'IFN de type I, notamment par la modulation du récepteur à l'IFN- α [232]. Cependant, à cause de l'augmentation des signaux pro-inflammatoires et à un défaut de la régulation de la voie NF- κ B, les cDCs différenciées *in vitro* à partir de moelle osseuse isolée de la souris NOD sont hyperactivées et ont des capacités de présentation antigénique augmentées [233, 234]. En effet, les cDCs isolées d'une souris NOD prédiabétique expriment de forts niveaux de la molécule de costimulation CD40, et l'inhibition de CD40 par des anticorps bloquants entraîne une protection contre le développement de la pathologie [235, 236].

Chez la souris NOD, le nombre de cDC1 de la rate est diminué en comparaison à une lignée non susceptible à l'auto-immunité [237, 238]. De plus, elles ont une capacité réduite à présenter des Ag de façon croisée [239]. La présentation croisée étant fortement impliquée dans les mécanismes de tolérance, cela suggère que les cDC1 issus de la souris NOD pourraient être associés à un défaut dans les mécanismes de tolérance [240]. De plus, l'absence de cDC1 dans une souris NOD déficientes pour le facteur de transcription *Batf3*,

spécifique aux cDC1, protège ces souris du développement du diabète de type I confirmant leur rôle pathologique dans l'initiation de la maladie [241].

La souris NOD présente une plus grande proportion de mcDCs en comparaison à des souris non susceptibles au diabète de type I [193]. Les mcDCs induisent des bris de tolérance lorsqu'elles présentent des Ag dérivés de corps apoptotiques conduisant à une accélération du diabète dans la souris NOD [193]. Étant donné qu'une vague d'apoptose importante des cellules bêta a lieu dans le diabète de type I, il est facile de spéculer sur un rôle néfaste de cette augmentation de mcDC, capable de bris de tolérance, dans l'initiation de la maladie.

Les DCs sont impliquées dans d'autres maladies auto-immunes. Par exemple, dans le lupus érythémateux systémique (SLE), un allèle du gène *Prdm1* codant pour BLIMP-1 est associé avec une augmentation du risque de développer la maladie [242, 243]. BLIMP-1 est décrit comme important pour le maintien des fonctions tolérogéniques des cDCs [244]. De façon intéressante, la déplétion spécifique de *Prdm1* dans les cDCs de la souris conduit à une augmentation de leur activation, de l'expression du MHC-II et de la production de cytokines inflammatoires. Ce phénotype est similaire aux cDCs isolées de patients présentant cet allèle de risque [245, 246]. De plus, l'absence de *Prdm1* induit une augmentation de la cathepsine S et altère le répertoire des T folliculaires (Tfh), augmentant la susceptibilité à l'auto-immunité [245].

Dans le modèle murin de sclérose en plaques (EAE; encéphalite auto-immune induite) les cDCs ont un rôle majeur dans l'initiation de la pathologie. En effet la génération de chimères hématopoïétiques, dont le système immunitaire d'une souris receveuse est reconstitué avec une moelle osseuse issue d'une souris n'exprimant le MHC-II sur aucune de ces APCs, est associée à une diminution de la sévérité de la maladie [247]. Des études

complémentaires, où l'expression du MHC-II est uniquement sur les DCs, ont déterminé que ces dernières sont suffisantes pour induire la pathologie dans des modèles Ag spécifiques [247]. De manière intéressante, les DCs s'accumulent dans le système nerveux central de façon CCR7 dépendante [248, 249]. Elles y présentent des auto-antigènes dérivés de la myéline aux LT et favorisent leur différenciation en cellules Th17, impliquées dans la pathologie [249, 250].

Les DCs ont un rôle important dans le maintien de la tolérance dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), pathologie où le système immunitaire présent dans le greffon attaque le système immunitaire de l'hôte. En effet, une greffe de moelle osseuse allogénique déficiente en cDCs (CD11c-DTR) entraîne une diminution des LT allogéniques [251]. De plus, l'utilisation de moelle osseuse déficiente pour *Irf4*, démontre que les cDC1 CD103⁺ ont un rôle majeur dans l'induction de la GVHD [251]. Tous ces exemples soulignent l'importance des DCs dans les maladies auto-immunes ainsi que dans le contrôle de l'autoréactivité.

Les cDCs sont importantes dans l'induction et la tolérisation de la réponse immune. Des altérations de leur proportion ou leur nombre (augmentation ou diminution) peuvent être associées à la fois à la présence de bris de tolérance ou à une protection de symptômes auto-immuns, en fonction des modèles, démontrant un rôle majeur des cDCs dans la tolérance immune. Les cDCs participent à la tolérance centrale, au sein du thymus. La présentation d'Ag du soi entraîne la délétion par apoptose des LT autoréactifs ou leur différenciation en nTreg. En périphérie, les cDCs qui présentent des Ag du soi induisent la délétion ou l'anergie des LT autoréactifs qui ont échappé aux mécanismes de tolérance centrale. Chaque sous-type de cDCs

à un rôle particulier dans les mécanismes de tolérance immune. Les proportions de cDCs doivent donc être finement régulées afin d'éviter des bris de tolérance comme dans le cas du diabète de type I. La compréhension de la différenciation de chaque sous-type de cDCs, leurs fonctions spécifiques dans l'induction ou la tolérisation de la réponse immune, ainsi que leurs mécanismes d'homéostasie en périphérie permettra de déterminer leurs mécanismes de régulations. Une des approches possibles pour mettre en évidence des facteurs importants dans le contrôle des proportions d'une population est l'immunogénétique.

6. L'immunogénétique

6.1. Les variants génétiques

Un gène est une séquence de nucléotides qui code pour une protéine particulière, que ce soit un facteur de transcription, un récepteur de surface, une cytokine ou toute autre protéine. Les variations inter-individus sont contrôlées principalement par des variations génétiques. En effet, différentes études sur les variations génétiques du système immunitaire humain ont déterminé que 20 à 40% des différences, aussi bien cellulaires que moléculaires, seraient expliquées par des variants génétiques [252]. Ces variants sont associés à une diversité de phénotypes chez l'humain comme la couleur des yeux. Cependant, de nombreux variants génétiques sont associés à une susceptibilité accrue de développer une maladie auto-immune [253-255]. Différentes études visent à caractériser les variants ou polymorphismes liés à un trait auto-immun dans le but, par exemple, de dépister les individus à risque de développer une pathologie donnée.

Les variants génétiques peuvent être associés à un phénotype cellulaire ou moléculaire particulier et permettre la caractérisation de nouveaux mécanismes de voies moléculaires. Par

exemple, différents variants proximal du gène codant pour NF-κB sont décrits chez les patients atteints de la sclérose en plaques. La présence de ce variant est associée à une augmentation importante de l'expression de la sous-unité p50 de NF-κB et une diminution des régulateurs négatifs de la voie de signalisation du NF-κB. Cette étude a déterminé un mécanisme génétique qui contrôle l'activation de cette voie de signalisation ainsi que son impact sur la susceptibilité de développer la sclérose en plaques [256].

La caractérisation des variants génétiques peut donc permettre de développer de nouvelles stratégies afin de déterminer une susceptibilité à des pathologies chez l'humain, d'anticiper la réponse à un traitement, mais aussi de comprendre les mécanismes régulant notamment le système immunitaire dans le but d'augmenter nos connaissances fondamentales[257].

6.2.Le modèle NOD

La souris NOD est un modèle de diabète de type I spontané. Ce modèle partage de nombreuses similitudes avec la pathologie humaine [258]. Les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, DCs et neutrophiles) infiltrent les îlots de Langerhans et entraînent la destruction des cellules bêta qui produisent de l'insuline, hormone clé dans la régulation de la glycémie [259-262].

Chez la souris et chez l'humain, plus de 20 différents locus associés à une prédisposition à la maladie ont été identifiés. Ces locus, appelés *Idd* (*insulin-dependent diabetes*) chez la souris ou IDDM (*insulin-dependent diabetes mellitus*) chez l'humain, contiennent différents gènes qui présentent plusieurs polymorphismes [263-265]. Par exemple, le locus *Idd1* contient le gène qui code pour le MHC-II, présente chez la souris NOD un

changement en acide aminé sur la chaîne bêta du MHC-II entraînant la sélection de cellules autoréactives [266, 267]. Le lien entre les gènes codés dans ces locus et leur rôle dans la pathologie n'est pas toujours bien caractérisé. Par exemple, le locus *Idd2* est lié à la pathologie, mais ni le gène ni le mécanisme associé à *Idd2* n'ont été définis.

La souris NOD présente différentes altérations cellulaires, comme un défaut en cDC1 ou en Treg. Des différences au niveau moléculaire sont aussi décrites comme dans la séquence du MHC-II où deux acides aminés sont changés par rapport à une souris C57Bl/6 ainsi que par exemple un défaut dans l'induction de CTLA-4. L'utilisation de la souris NOD est donc un modèle pertinent pour élucider l'impact de ces variants génétiques codés dans les *Idd* sur le contrôle de phénotypes moléculaires et cellulaires.

6.3. Les souris congéniques

La souris NOD est un modèle complexe où plusieurs *Idd* contribuent aux différents phénotypes et à la susceptibilité de la maladie au sein d'un même organisme. Afin de pouvoir observer l'impact d'un seul *Idd* sur la pathogenèse et sur le contrôle d'un phénotype, des souris congéniques peuvent être générées. Elles sont identiques à une lignée parentale sauf pour un locus particulier qui provient alors d'une autre lignée de souris. Ces modèles congéniques sont générés par rétrocroisement sur plusieurs générations, jusqu'à obtenir des individus homozygotes pour le locus congénique. Ces souris sont importantes pour valider le rôle d'*Idd* dans la susceptibilité au diabète et dans la compréhension du mécanisme associé.

Les souris congéniques ont permis de caractériser l'impact de différents locus sur des populations immunitaires. Notre équipe a démontré par l'utilisation de ces modèles, un rôle des locus *Idd2* et *Idd13* dans le contrôle des LT doubles négatifs [268, 269]; un rôle du

chromosome 12 dans la maturation de l'affinité des anticorps [270]; un rôle du locus *Idd13* dans le contrôle des proportions de mcDC [195], un rôle du chromosome 7 dans le contrôle des proportions de pDC [271] ainsi qu'un rôle du chromosome 7 distal dans la régulation des proportions de pré-mNK [272]. D'autres équipes ont aussi utilisé des souris congéniques pour élucider l'impact des *Idd* sur des populations immunes ou sur des voies moléculaires [263].

L'utilisation du modèle de la souris NOD, qui présente de nombreux polymorphismes par rapport à la lignée C57BL/6 et la génération de souris congéniques, qui possèdent un locus spécifique de la souris NOD sont autant d'outils qui permettent de déterminer l'impact d'un variant génétique sur un phénotype. La souris NOD possède un défaut en cDC1 et une augmentation en mcDCs dans la rate [193, 237, 238]. La souris NOD congénique pour le locus *Idd13* qui provient de la C57BL/6, a des proportions restaurées en mcDCs en comparaison à une souris C57BL/6 [195]. Ces études mettent donc en évidence que les proportions de cDCs, et plus spécifiquement leurs différents sous-types, sont fortement régulées par des facteurs génétiques.

7. Hypothèses et objectifs de mon doctorat

Les cDCs ont un rôle important dans le maintien de la tolérance [22] et leurs proportions varient dans un contexte auto-immun. Étant donné l'impact d'une dérégulation en nombre de DCs et des sous-types de cDCs sur le développement des bris de tolérance immune, comprendre leur régulation est donc primordial.

La fonction des mcDCs dans l'induction de bris de la tolérance Ag spécifiques est néfaste dans le cas du diabète de type I, mais bénéfique dans le cas d'une réponse anti-tumorale [193, 194]. Ce sous-type n'a cependant pas été à ce jour caractérisé en terme de phénotype et différenciation. De plus, notre laboratoire a précédemment établi que le locus *Idd13* serait relié à la régulation des proportions de mcDCs [195]. Déterminer la régulation et les particularités des mcDCs permettrait d'ouvrir de nouvelles voies dans la compréhension de l'hétérogénéité des cDCs.

Le but de mon projet de doctorat a donc été d'utiliser l'immunogénétique pour comprendre les mécanismes de régulation des mcDCs

Pour ce faire, deux objectifs majeurs ont été réalisés :

- 1) Définir la nature des mcDCs en les comparant aux cDCs,
- 2) Déterminer le ou les gène(s) codé(s) dans le locus *Idd13* impliqué(s) dans le contrôle des proportions de mcDCs.

Chapitre 2: Article 1

1. Merocytic dendritic cells compose a conventional dendritic cell subset with low metabolic activity

Cindy Audiger, Adrien Fois and Sylvie Lesage

Cet article est en révision dans *Journal of Immunology*

J'ai effectué et analysé les expériences présentées dans les figures 1 à 5. Les expériences requises pour la figure 6 ont été réalisées par Adrien Fois. L'analyse et l'interprétation de ces résultats ont été faites conjointement. La conception du manuscrit a été faite conjointement avec le Dre Sylvie Lesage et moi-même.

Title: Merocytic dendritic cells compose a conventional dendritic cell subset with low metabolic activity

Cindy Audiger^{*,†}, Adrien Fois^{*,†}, Sylvie Lesage^{*,†}

* Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4 Canada

† Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

Running title: Merocytic dendritic cells are conventional

Corresponding author:

Sylvie Lesage, Tel : 1-514-252-3400 x 4649; E-mail : sylvie.lesage@umontreal.ca

1.1. Abstract

Conventional dendritic cells (cDCs) are arguably the most potent antigen-presenting cells that induce the activation of naïve T cells in response to pathogens. In addition, at steady state, cDCs help maintain immune tolerance. Two subsets of cDCs have been extensively characterized, namely cDC1 and cDC2, each contributing differently to immune responses. Recently, another dendritic cell (DC) subset, termed merocytic dendritic cells (mDCs), was defined. In contrast to both cDC1 and cDC2, mDCs reverse T cell anergy, properties that could be exploited to potentiate cancer treatments. Yet, whether mDCs represent an unconventional DC or a cDC subset remains to be defined. Here, we further characterize mDCs and find that they bear true characteristics of cDC subsets. Indeed, as for cDCs, mDCs express the cDC-restricted transcription factor *Zbtb46*, and display very potent antigen-presenting cell activity. In addition, mDC population dynamics parallels that of cDC1 and cDC2, in both reconstitution kinetic studies and parabiotic mice. We next investigated their relatedness to cDC1 and cDC2 and demonstrate that mDCs are not dependent on cDC1-related *Irf8* and *Batf3* transcription factors but are dependent on *Irf4*, a cDC2-specific transcription factor. Finally, we find that cDC1, cDC2 and mDCs all present with different metabolic phenotypes, where mDCs exhibit the lowest glucose uptake activity. Altogether, these data demonstrate that mDCs compose a novel cDC subset. Defining the properties of mDCs in mice may help identify a functionally equivalent subset in humans leading to the development of innovative cancer immunotherapies.

1.2. Introduction

Conventional dendritic cells (cDCs), initially described by Steinman, are professional antigen presenting cells (APCs) involved in the initiation of an adaptive immune response [1, 2]. cDCs were initially characterized by the high expression of the integrin CD11c and, more recently, by the expression of the transcription factor *Zbtb46*, which is more strictly restricted to cDCs [3, 4]. cDCs originate from bone marrow precursors that eventually differentiate into pre-cDCs [5, 6]. Pre-cDCs are the earliest common precursor to the two major cDC subsets found in the mouse spleen, namely cDC1 and cDC2 [7]. Although they share a common differentiation pathway, both cDC1 and cDC2 have unique properties. cDC1 are defined by the expression of CD8 α and XCR1, are able to cross-present antigen-derived peptides to CD8⁺ T cells and are dependent on *Irf8*, *Batf3* and *Id2* transcription factors for their differentiation [8-10]. In contrast, cDC2 express CD11b and CD172a, primarily present exogenous antigen to CD4⁺ T cells, and are mostly dependent on *Irf4* [10, 11]. Both cDC1 and cDC2 thus exhibit different cell surface phenotypes, rely on distinct transcription factors for their differentiation, and carry out specific immunological functions.

In addition to these distinctive traits, there is increasing evidence that the metabolic activity differs for each cDC subset [12]. cDC1 show high glycolytic activity and oxidative phosphorylation, while cDC2 have a lower metabolic activity [13]. Interestingly, inhibition of metabolic processes with pharmacological inhibitors considerably affect the cross-presentation ability of cDC1, but does not appear to alter cDC2 functions [13]. This suggests that the higher metabolic activity in cDC1 relative to cDC2 is tightly linked to their biological properties.

Recently, a new subset of dendritic cells (DCs) that expresses high levels of CD11c but lacks both CD8 α and CD11b expression was identified [14]. This subset is named merocytic dendritic cells (mcDCs) and has the unique ability to reverse T cell anergy when presenting peptides derived from cellular apoptotic bodies [14, 15]. For example, transfer of mcDCs loaded with ovalbumin-expressing cellular apoptotic bodies in mice bearing a B16-OVA tumours, reversed T cell anergy and resulted in a decrease in tumour size [14]. In addition to reversing T cell anergy, mcDCs differ from cDC1 and cDC2 by their capacity to produce type-I IFN when challenged with apoptotic bodies [14]. Finally, we have also shown that the pro-apoptotic molecule BIM specifically controls mcDC proportion, as both the proportion and absolute number of mcDCs, but not that of cDC1 or cDC2, are increased in mice deficient in *Bcl2l1l*, the gene encoding for BIM [16]. mcDCs thus clearly differ from the other cDC subsets, in terms of their function as well as in the factors that modulate their homeostatic regulation.

We now demonstrate that mcDCs exhibit features that are characteristic of cDCs, such as *Zbtb46* expression. We also find that, in addition to *Bcl2l1l*, mcDCs are dependent on *Irf4*, and that the metabolic phenotype of mcDCs differs from both cDC1 and cDC2. mcDCs thus represent a cDC subset distinct from both cDC1 and cDC2. The characterization of mcDCs increases our understanding of cDC heterogeneity and may facilitate the design of new treatments, in conditions where reversing T cell anergy would provide a therapeutic benefit.

1.3. Materials and methods

Mice

The following mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA) and subsequently bred in-house at the Maisonneuve-Rosemont hospital animal house facility (Montreal, Canada); C57BL/6 (B6) carrying the CD45.2 allele (#000664), B6.SJL (B6.1) carrying the CD45.1 allele (#002014), B6.Batf3^{-/-} (#013755), CD11c-DTR (#008549), CD11c-Cre (#007567), IRF4^{fl/fl} (#009380), B6.Zbtb46-GFP (#027618) and B10.BR (#004804) mice. B6 and B6.1 mice were mated to obtain B6 mice carrying both CD45.1 and CD45.2 alleles, and the resulting strain with co-dominant expression of both CD45 alleles is referred to as B6.1.2. The CD11c-Cre^{+/-}.IRF4^{fl/fl} were obtained by breeding CD11c-Cre^{+/-} with IRF4^{fl/fl} mice for two generations. Either the Cre^{+/-}.IRF4^{fl/wt}, Cre^{-/-}.IRF4^{fl/fl} or Cre^{+/-}.IRF4^{fl/fl} were used as littermate controls, all with comparable results. The B6.IRF8^{BXH2} mice were a generous gift from Dr. Gros [17]. Six- to fourteen-week-old mice were used for all phenotypic analyses. No differences were observed between male and female mice and data for both genders were pooled in this study. Within individual experiments, mice were age- and sex- matched to littermates whenever possible. The Maisonneuve-Rosemont hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved the experimental procedures.

Flow cytometry

Spleens were minced and treated with collagenase (1 mg/ml in PBS, Type V from Clostridium histolyticum, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) for 15 min at 37°C and passed through a 70 µm cell strainer (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) to yield single-cell suspensions

prior to a red blood cells lysis with NH_4Cl solution. Cell suspensions were labelled with antibodies from Biolegend (San Diego, CA, USA) to: CD3 (clone 17A2), CD4 (clone GK1.5), CD8 α (clone 53-6.7), CD11b (clone M1/70), CD11c (clone N418), CD19 (clone 6D5;), CD44 (clone 1M7), CD45.1 (clone A20), CD45.2 (clone 104), CD135 (clone A2F10), CD172a (clone P84), B220 (clone RA3-6B2), I-A^b (clone AF6-120.1) and IA/IE (clone M5/114.15.2). Zombie aqua viability dye (#423102; Biolegend) or LIVE/DEAD fixable yellow (#L34959, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used interchangeably. Lineage staining included antibodies to CD3 and CD19. Intracellular staining for IRF-4 (clone 3E4; Thermo Fisher Scientific) and IRF-8 (clone V3GYWCH; Thermo Fisher Scientific) was performed following the manufacturer's instructions for intracellular staining (#00-5523-00, eBioscience™ FoxP3 / transcription factor staining buffer set). All samples were acquired using BD LSRII (BD Biosciences) or Fortessa (BD Biosciences) and were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR). The gating strategy for mDCs is based on our previous work and that of others [16, 18].

Mixed leucocyte reaction

DC subsets were isolated from collagenase treated spleen of B6 mice (H-2^b) and sorted based on the following markers; cDC1 were CD11c^{hi}CD8 α ⁺CD11b⁻; cDC2, CD11c^{hi}CD8 α ⁻CD11b⁺ and mDCs, CD11c^{hi}CD8 α ⁻CD11b⁻. The sorted DC subsets were > 90% pure and were subsequently irradiated (2000 rad). CD4⁺ T cells were isolated by positive selection using EasySep™ mouse PE positive selection kit (StemCell technology; #18554) from the spleen of B6 (H-2^b) or B10.BR (H-2^k) mice and labelled with a 2 μM solution of CFSE. DCs and T cells were plated at a 1:64 ratio and T cell proliferation was determined by following CFSE dilution

by flow cytometry after 72h of co-culture.

Depletion of cDCs using diphtheria toxin (DT)

B6.CD11c-DTR mice were injected intraperitoneally with 4ng/g of body weight of DT (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA, #D0564) at different time points. The proportion of splenic DC subsets was analyzed by flow cytometry as described above.

Parabiosis

Females B6 mice (CD45.2) and B6.1.2 (CD45.1.2) mice were age- and weight-matched. Their circulatory system was joined by surgery [19, 20]. The chimerism was validated two weeks after surgery by staining a blood sample for both CD45.1 and CD45.2 expression. After 45 days, spleen cells were labelled and analyzed by flow cytometry to quantify DC subsets. To determine the half-life of DCs, parabionts were surgically separated and analyzed at different points, starting from 0 to 6 days after separation. For each parabiont pair, the average cellular chimerism was calculated as follows: $(\text{percent CD45.1.2}^+ \text{ cells in CD45.2}^+ \text{ mouse} + \text{percent CD45.2}^+ \text{ cells in CD45.1.2}^+ \text{ mouse}) / 2$ [20].

Pre-cDCs transfers in vivo

Pre-cDCs were sorted from the pooled bone marrow of three B6 (CD45.2) mice and injected intravenously into non-irradiated B6.1 (CD45.1) recipient mice. Pre-cDCs were defined as $\text{live}^+ \text{Lin}^- \text{B220}^- \text{IA/IE}^- \text{CD11c}^+ \text{CD172a}^{\text{low/neg}} \text{CD135}^+$ cells. Sorted B cells ($\text{live}^+ \text{Lin}^+ \text{B220}^+$) were injected as a control in separate mice and did not yield DCs (not shown). After 6 days, splenic DC subsets derived from the CD45.2⁺ donor pre-cDCs were quantified by flow cytometry.

Mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was assessed using Mitospy™ OrangeCMTRos labelling (#424804, Biolegend, San Diego, CA, USA). Briefly, collagenase-treated spleen single cell suspensions were cultured, at a concentration of 20×10^6 cells/mL, for 30 min at 37°C, 5% CO₂ in RPMI with 20nM of Mitospy. The cells were then washed and stained for cell surface markers to distinguish DC subsets prior to flow cytometry analysis.

Glucose uptake

Glucose uptake was quantified by the incorporation of the fluorescent glucose analogue 2-NDBG (Invitrogen, #N13195). Collagenase-treated spleen single cell suspensions were cultured at 37°C, 5% CO₂ with RPMI in 96 well plates at a concentration of 3×10^6 cell/ml with 22μM of 2-NDBG. Glucose uptake was quantified after 0 (no 2-NDBG added), 15, 30, 60 and 120min, respectively. The cells were stained with cell surface markers to distinguish DC subsets prior to analysis by flow cytometry.

Statistics

Significance was tested with a one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test for differences between more than two groups. Depending on the sample variance, either the Student's t-test or the Mann-Whitney U test was applied when testing for significant differences between two groups. P values < 0.05 were considered to be significant.

1.4.Results

mcDCs exhibit key cDC characteristics, defining them as a cDC subset

cDCs were first described as very potent inducers of allogeneic responses [21]. To comparatively measure the potential of mcDCs and cDCs at inducing allogeneic T cell responses, cDC1, cDC2 and mcDCs were sorted from a B6 mouse. The DC subsets expressing the MHC H-2^b allele were cultured with CFSE-labelled CD4⁺ T cells isolated either from a B10.BR mouse (H-2^k) or from a B6 (H-2^b) mouse as control. T cell proliferation is determined by quantifying CFSE dilution in the CD44⁺ activated T cell fraction, after three days in co-culture with DC subsets. As expected, both cDC1 and cDC2 induced significant CD4⁺ T cell proliferation in the allogeneic, but not in the syngeneic setting (Figure 1a, b) [21]. The ability of mcDCs to induce allogeneic CD4⁺ T cell responses was comparable to that of both cDC1 and cDC2 (Figure 1 a, b), suggesting that mcDCs may represent a cDC subset. A second characteristic associated with cDCs is the expression of the transcription factor *Zbtb46* [3, 4]. In order to determine if mcDCs express *Zbtb46*, we took advantage of the B6.*Zbtb46*-GFP reporter mice, wherein almost all CD11c^{high} cells express GFP as a surrogate marker for *Zbtb46* expression (Figure 1c, left panel) [3, 4]. Using these B6.*Zbtb46*-GFP reporter mice, we find that more than 95% of cDC1, cDC2 and mcDCs express GFP (Figure 1c, d). Therefore, as for cDC1 and cDC2, mcDCs efficiently induce allogeneic T cell responses and express *Zbtb46*, two key characteristics defining cDC subsets.

The repopulation kinetics and turnover of mDCs are comparable to that of other cDC subsets.

cDCs have short half-lives of two to three days [7, 22]. As such, cDC homeostasis is a dynamic process consisting in a perpetual replenishment of cDCs in the lymphoid organs by circulating precursors, with limited cell divisions followed by rapid cell death [7, 22]. To examine the repopulation kinetics of mDCs, a CD11c-DTR model was used. In this mouse model, injection of DT efficiently eliminates most CD11c expressing cells, which primarily include cDCs [23]. One day after DT injection, we similarly observed a drastic decrease in the proportion of cDC1 and cDC2 subsets in the spleen with a maximal decrease in absolute number of cDCs by day 2 (Figure 2a, b). By day 5, the pool of splenic cDC1 and cDC2 was almost completely reconstituted, both in percentage and in absolute number (Figure 2a, b). Interestingly, we find that mDCs follow similar kinetics of depletion and reconstitution than both cDC1 and cDC2 in DT-treated CD11c-DTR mice (Figure 2a, b), further highlighting the similitude of mDCs with the other cDC subsets.

As a complementary approach to CD11c-DTR mice, we turned to parabiotic mice to assess DC homeostasis. We established parabiotic mouse pairs with mice expressing two distinct CD45 allotypes. Forty-five days after the circulation of the mice was joined, we determined the percentage of cellular chimerism. CD8⁺ T cell chimerism expectedly reached about 50%, confirming adequate immune cell recirculation in the parabiotic pairs (Figure 2c, d) [24]. Moreover, the percentage of chimerism for both cDC1 and cDC2 in the spleen averaged 15 to 20%, as previously described (Figure 2c, d) [20, 24]. Indeed, in contrast to T and B cells, cDCs do not reach a 50% equilibrium in parabiotic mice, likely as a result of their rapid

turnover [24]. Similar to both cDC1 and cDC2, mcDC chimerism averaged at 20%. Next, to determine the turnover or half-life of mcDCs, parabionts were analyzed at different time point after surgical separation. Four days after separation, more than half of the cDC1, cDC2 and mcDCs have been lost, whereas the CD8⁺ T cell chimerism remained stable during the same time frame (Figure 2e). This finding is in agreement with previous work demonstrating that DC subsets have a very short half-life. Altogether, these data demonstrate that mcDCs present with similar repopulation kinetics and turnover behaviour than both cDC1 and cDC2. These results further suggest that mcDC are not precursors or products of either cDC1 and cDC2 and that they instead represent an additional cDC subset.

pre-cDCs are also precursors to mcDCs

cDCs are bone marrow-derived cells that differentiate from pre-cDCs present in the bone marrow and in the spleen [24]. Because our data show that mcDCs share many characteristics with cDCs, we wondered whether they also shared the same differentiation pathway. Pre-cDCs are the most immediate precursor to cDCs [24]. To determine if pre-cDCs can also yield mcDCs, we sorted pre-cDCs from the bone marrow of B6 mice (Figure 3a). Sorted pre-cDCs were then injected intravenously in a non-irradiated B6.1 recipient. As expected, cDCs (CD11c^{high} cells) were detected in the spleen of recipient mice six days after in vivo transfer of pre-cDCs (Figure 3b). Notably, the relative proportion of cDC1, cDC2 and mcDCs among CD11c^{high} cells for the pre-cDC-derived cells, was comparable to the endogenous distribution of these subsets (Figure 3c). Thus, pre-cDCs are common precursors to cDC1, cDC2, and mcDCs.

mcDCs are not dependent on cDC1-obligatory transcription factors, *Irf8* and *Batf3*

Even if pre-cDCs are common precursors to cDC1 and cDC2, the differentiation of cDC subsets is divergent, as noted by their distinct requirements for transcription factors [25]. For instance, cDC1 require the expression of BATF3 and IRF-8 [8, 10], whereas cDC2 are dependent on IRF-4 [11]. The role of transcription factors in defining cDC subsets and function is of such importance that it has been proposed that cDC should instead be redefined based on their requirements and/or expression of specific transcription factors [2]. Hence, we aimed to determine the transcription factor(s) required for mcDC differentiation. Interestingly, both mcDCs and cDC1 have the capacity to cross-present antigens to T cells and to phagocytose apoptotic bodies, although this results in very different biological outcomes, where cDC1 induce while mcDCs break antigen-specific tolerance [14, 15, 26, 27]. Still, because of these similar properties, we first tested whether mcDCs and cDC1 were dependent on the same transcription factors for their differentiation. Deficiency in IRF-8 function in the IRF8^{BXH2} mice (referred as IRF8-deficient mice) leads to a defect both in percentage and absolute number of cDC1 in the spleen (Figure 4a, b) [28]. Correspondingly, a small increase in the percentages and the absolute numbers of both cDC2 and mcDC was observed (Figure 4a, b). Similar results were obtained in B6.*Batf3*^{-/-} mice, presenting with a significant and specific deficiency in cDC1, but not cDC2 or mcDCs, when compared to B6 mice (Figure 4c, d). Together these experiments suggest that although cDC1 and mcDC both share the capacity to cross-present antigens to T cells and to phagocytose apoptotic bodies, mcDC differentiation is not dependent on transcription factors that impede cDC1 differentiation.

mcDC and cDC2 share a requirement for the *Irf4* transcription factor

As mcDCs are not dependent on transcription factors required for cDC1 differentiation, we turned towards *Irf4*, the main transcription factor known to affect cDC2 differentiation. We took advantage of the CD11c-Cre.IRF4^{fl/fl} mouse model, where genetic deletion of *Irf4* occurs in all CD11c expressing cells. Using these mice, we confirm that *Irf4* is required for cDC2, but not for cDC1 differentiation (Figure 5 a, b) [10, 11, 25]. Interestingly, a decrease in both the proportion and absolute number of mcDCs is also observed in absence of *Irf4* (Figure 5 a, b). In line with this observation, we find that, similar to cDC2, most mcDCs express IRF-4, whereas IRF-8 expression is mostly restricted to cDC1 (Figure 5 c, d). Taken together, these data demonstrate that IRF-4 is important for both cDC2 and mcDC.

mcDCs exhibit a distinct metabolic phenotype

In addition to transcription factors, cDC subsets can be distinguished based on their metabolic signatures, where DC differentiation and function is highly coupled with changes in metabolic reprogramming [29, 30]. Indeed, cDC1 exhibit a higher mitochondrial potential, a more important mitochondrial mass as well as a higher basal glycolytic capacity than cDC2 [13]. Hence, we hypothesized that, as mcDCs have phenotypic and functional properties that are distinct from both cDC1 and cDC2, they may also have a specific metabolic signature. Using mitospys labelling to quantify the mitochondrial membrane potential, we confirm that cDC1 have a higher mitochondrial membrane potential than cDC2 (Figure 6a). mcDCs were found to have a slightly higher mitochondrial membrane potential than cDC2, and much lower than that of cDC1 (Figure 6a). In addition to the mitochondrial membrane potential, we also determined the rate of glucose uptake of the cDC subsets using the fluorescent glucose

analogue, 2-NDBG. Expectedly, cDC1 have a better capacity than cDC2 to uptake glucose (Figure 6b) [13]. Interestingly, mcDCs have a lower glucose uptake potential than both cDC1 and cDC2 (Figure 6b). Indeed, after 120min in culture with 2-NDBG, mcDCs show significant less glucose uptake than cDC2 (Figure 6c). Altogether, these data show that mcDCs have an intermediate mitochondrial membrane potential and a lower capacity to uptake glucose in comparison to both cDC1 and cDC2.

1.5. Discussion

For their involvement in the break of antigen-specific immune tolerance, mDC represent a promising as new therapeutic strategy [14, 15]. In this study, we explored the relationship of mDCs relative to cDCs. We demonstrate that mDCs exhibit features that are characteristic of cDCs [4, 21, 31], such as the effective induction of allogeneic responses, as well as the expression of the cDC-specific transcription factor *Zbtb46*. Moreover, as for cDCs [20, 24], mDCs differentiate from pre-cDCs and exhibit a short half-life. We find that mDCs are not dependent on cDC1-specific transcription factors, but that, as for cDC2, their differentiation is impeded in absence of IRF-4 expression [10, 11, 28, 32]. Finally, mDCs exhibit a distinct metabolic activity, as reflected by their intermediate mitochondrial membrane potential and lower glucose uptake relative to both cDC1 and cDC2.

APCs include macrophages, B cells, plasmacytoid DCs (pDC, a non-conventional DC subset) and cDCs. All APCs are able to present antigen-derived peptides in the context of MHC and can also induce an allogeneic response. mDCs can be defined as APCs, as they phagocytose apoptotic bodies and induce antigen-specific T cells responses [14, 15]. Among APCs, cDCs are the most potent at activating naïve T cells [33]. cDCs can also be distinguished from other APCs by their specific expression of the *Zbtb46* transcription factor [3, 4]. We found that, as for cDCs, mDCs are able to effectively induce an allogeneic response and express *Zbtb46*. mDCs thus bear key traits that define cDC subsets.

Interestingly, mDCs produce high levels of type-I IFN [14, 15], a characteristic usually associated with a pDC signature [34]. Apart from their ability to produce type-I IFN, mDCs

share little to no characteristics with pDCs. Firstly, pDCs are rounded, while mcDCs have dendrites [16, 35]. Secondly, pDCs express B220 as well as low levels of CD11c, whereas mcDCs do not express B220 and express very high levels of CD11c [18, 36]. Thirdly, in contrast to mcDCs, pDCs do not express *Zbtb46* and are not efficient at inducing the proliferation of naïve T cells [3, 4, 37]. Finally, type-I IFN production by pDCs is in response to TLR7 and TLR9 ligands, while that of mcDCs is in response to apoptotic bodies [38, 39]. Altogether, these findings suggest that mcDCs are not closely related to pDCs.

While the ability of mcDCs to produce type-I IFN and to break antigen-specific immune tolerance has been investigated in various settings [14, 15], the phenotypic characteristics of mcDCs have been understudied. mcDCs are currently phenotypically defined as CD11c^{high}CD8 α ⁻CD11b⁻ cells. The lack of CD8 α and CD11b expression could suggest that they are precursors of cDC1 or cDC2 that have yet to acquire cell surface expression of either CD8 α or CD11b, respectively. However, there is evidence to suggest that mcDCs are terminally differentiated cDCs. For one, after in vivo transfer, mcDCs maintain their CD11c^{high}CD8 α ⁻CD11b⁻ phenotype and do not differentiate into either cDC1 or cDC2 subsets [14]. In addition, using a CD11c-DTR mice model and parabiosis experiments, we determined that mcDCs have the same differentiation kinetics than cDC1 and cDC2, as well as a comparably short half-life. Moreover, mcDCs differentiate in vivo from bone marrow-derived pre-cDCs. Altogether, these observations demonstrate that mcDCs and cDCs originate from the common pre-cDC precursor and that they exhibit similar, if not identical, reconstitution kinetics and half-life. These findings strongly suggest that mcDCs are neither precursors to nor products of other cDC subsets and, rather, represent a terminally differentiated cDC subset.

Each cDC subset exhibits unique immunological properties. cDC1 effectively phagocytose and cross-present antigens to CD8⁺ T cells, while cDC2 are more effective at activating CD4⁺ T cells [40-43]. mcDCs share functional properties with cDC1, in that both subsets are able to cross-present antigens [44, 45], and both subset are able to effectively phagocytose cellular apoptotic bodies [46-49]. However, the immunological consequences of presenting peptides derived from apoptotic bodies to T cells by these DC subset could not be more contrasted; cDC1 induce T cell tolerance [46, 47], while mcDCs break antigen-specific T cell tolerance [14, 15]. Still, their common ability to perform cross-presentation and to uptake apoptotic cells could suggest that mcDCs are more closely related to the cDC1 rather than the cDC2 subset. Nevertheless, we found that mcDCs do not express IRF-8 nor do they require *Irf8* or *Batf3* cDC1-related transcription factors for their development. This is particularly surprising, especially considering that IRF-8 is seemingly important to facilitate type-I IFN production in both cDCs and pDCs [50]. Indeed, DCs deficient for IRF-8 show a defect in IFN production, which is rescued after reintroduction of IRF-8 expression [50]. As mcDCs do not express IRF-8, this suggests that type-I IFN production by mcDCs may proceed through an alternate signalling pathway than that described for both cDC1 and pDCs.

mcDCs are not dependent on *Irf8* or *Batf3*, but do express the cDC2-specific transcription factor IRF-4 and both the proportion and absolute number of mcDCs is reduced in the absence of *Irf4*. The requirement for IRF-4 in mcDC differentiation suggest that mcDCs are more closely related to cDC2 than cDC1. Recent studies have underlined the highly heterogeneous composition of the cDC2 subset in both humans and mice [51, 52]. Hence, it is tempting to

suggest that mcDCs may contribute to the heterogeneous composition of cDC2. In fact, if one segregates cDC1 and cDC2 based on IRF-8 and IRF-4 expression, respectively, then mcDCs do contribute to the heterogeneous phenotype of cDC2. However, it must be noted that mcDCs do bear unique properties that are highly distinct from cDC2. For instance, mcDCs are the only cDC subset able to break of antigen-specific tolerance [14, 15] and have a distinctive requirement for *Bim* [16]. Nevertheless, additional studies comparing the transcriptomic profiles of mcDCs and cDC2 may unravel new signatures that allow to better segregate the two subsets, in terms of both phenotype and function.

Development, function and homeostasis of immune cells are tightly coupled to their metabolic state [12, 53]. DCs are no exception, in that cDC differentiation and maturation is linked to increases in their metabolic activity [54]. Moreover, cDC1 and cDC2 have a distinct metabolic signature at steady state [13]. Specifically, cDC1 are very metabolically active and present with a high mitochondrial membrane potential as well as an elevated glucose uptake capacity [13]. In contrast, cDC2 have a low metabolic requirement as exemplified by their very low mitochondrial membrane potential and a low glucose uptake capacity [13]. Interestingly, mcDCs are distinct from both cDC1 and cDC2 in terms of metabolic activity. While the mitochondrial membrane potential of mcDCs is higher than that of cDC2, their capacity to uptake glucose is lower. This suggests that mcDCs exhibit low metabolic activity, at least at steady state. It would be interesting to evaluate the impact of the different metabolic pathways on mcDC differentiation, turnover and activation. Altogether, our results further support the view that each cDC subset bears a unique metabolic signature.

By demonstrating that mcDCs exhibit all of the characteristic properties of cDCs, our work contributes to further understanding cDC heterogeneity. As each cDC subset bears unique functions, it is imperative to find a means to exploit them in relevant clinical contexts. Defining the unique properties of mcDCs should facilitate the identification of a homologous cell type in humans. We believe that manipulation of mcDCs is of therapeutic interest. For instance, in the context of cancer, mcDCs could break T cell tolerance in an antigen-specific manner and thereby contribute to reducing the tumour burden. Still, lots of work lays ahead before mcDCs are to be used in a clinical setting.

1.6.Acknowledgments

We wish to thank Dr. Philippe Gros for providing IRF8^{BXH2} mice, Dr. Maziar Divangahi for expert advice on preparing parabiotic mouse pairs, Dr. Edith Janssen for helpful discussions, Dr. Lise Coderre for advice on cellular metabolism and Martine Dupuis for her support at the flow cytometry facility. The authors also wish to thank both Ianula Mihaela Banu and Catherine Mauger-Labelle for help in monitoring the health status of parabiotic pairs, as well all of the animal house staff at the Maisonneuve-Rosemont research center for curating the mouse colonies.

1.7. References

- [1] R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *J Exp Med* 137(5) (1973) 1142-62.
- [2] C. Macri, E.S. Pang, T. Patton, M. O'Keeffe, Dendritic cell subsets, *Semin Cell Dev Biol* 84 (2018) 11-21.
- [3] M.M. Meredith, K. Liu, G. Darrasse-Jeze, A.O. Kamphorst, H.A. Schreiber, P. Guermonprez, J. Idoyaga, C. Cheong, K.H. Yao, R.E. Niec, M.C. Nussenzweig, Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btd4) defines the classical dendritic cell lineage, *J Exp Med* 209(6) (2012) 1153-65.
- [4] A.T. Satpathy, W. Kc, J.C. Albring, B.T. Edelson, N.M. Kretzer, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages, *J Exp Med* 209(6) (2012) 1135-52.
- [5] S.H. Naik, P. Sathe, H.Y. Park, D. Metcalf, A.I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J.Y. Kwak, L. Wu, K. Shortman, Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo, *Nat Immunol* 8(11) (2007) 1217-26.
- [6] A. Schlitzer, V. Sivakamasundari, J. Chen, H.R. Sumatoh, J. Schreuder, J. Lum, B. Malleret, S. Zhang, A. Larbi, F. Zolezzi, L. Renia, M. Poidinger, S. Naik, E.W. Newell, P. Robson, F. Ginhoux, Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow, *Nat Immunol* 16(7) (2015) 718-28.
- [7] K. Liu, M.C. Nussenzweig, Origin and development of dendritic cells, *Immunol Rev* 234(1) (2010) 45-54.
- [8] K. Hildner, B.T. Edelson, W.E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B.U. Schraml, E.R. Unanue, M.S. Diamond, R.D. Schreiber, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity, *Science* 322(5904) (2008) 1097-100.

- [9] C. Hacker, R.D. Kirsch, X.S. Ju, T. Hieronymus, T.C. Gust, C. Kuhl, T. Jorgas, S.M. Kurz, S. Rose-John, Y. Yokota, M. Zenke, Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development, *Nat Immunol* 4(4) (2003) 380-6.
- [10] T. Tamura, P. Tailor, K. Yamaoka, H.J. Kong, H. Tsujimura, J.J. O'Shea, H. Singh, K. Ozato, IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity, *J Immunol* 174(5) (2005) 2573-81.
- [11] S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, I. Akitoyo, K. Yamamoto, T. Suematsu, M. Nakamura, K. Yui, A. Kumatori, Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8 α ⁻ dendritic cell development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(24) (2004) 8981-6.
- [12] S.K. Wculek, S.C. Khouili, E. Priego, I. Heras-Murillo, D. Sancho, Metabolic Control of Dendritic Cell Functions: Digesting Information, *Front Immunol* 10 (2019) 775.
- [13] X. Du, J. Wen, Y. Wang, P.W.F. Karmaus, A. Khatamian, H. Tan, Y. Li, C. Guy, T.M. Nguyen, Y. Dhungana, G. Neale, J. Peng, J. Yu, H. Chi, Hippo/Mst signalling couples metabolic state and immune function of CD8 α ⁽⁺⁾ dendritic cells, *Nature* 558(7708) (2018) 141-145.
- [14] R.A. Reboulet, C.M. Hennies, Z. Garcia, S. Nierkens, E.M. Janssen, Prolonged antigen storage endows merocytic dendritic cells with enhanced capacity to prime anti-tumor responses in tumor-bearing mice, *J Immunol* 185(6) (2010) 3337-47.
- [15] J.D. Katz, J.K. Ondr, R.J. Opoka, Z. Garcia, E.M. Janssen, Cutting edge: merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes, *J Immunol* 185(4) (2010) 1999-2003.
- [16] C. Audiger, S. Lesage, BIM determines the number of merocytic dendritic cells, a cell type that breaks immune tolerance, *Immunol Cell Biol* 96(9) (2018) 1008-1017.
- [17] J. Berghout, D. Langlais, I. Radovanovic, M. Tam, J.D. MacMicking, M.M. Stevenson, P. Gros, Irf8-regulated genomic responses drive pathological inflammation during cerebral malaria, *PLoS Pathog* 9(7) (2013) e1003491.
- [18] J.D. Katz, E.M. Janssen, Breaking T cell tolerance to beta cell antigens by merocytic dendritic cells, *Cell Mol Life Sci* 68(17) (2011) 2873-83.
- [19] P. Kamran, K.I. Sereti, P. Zhao, S.R. Ali, I.L. Weissman, R. Ardehali, Parabiosis in mice: a detailed protocol, *J Vis Exp* (80) (2013).

- [20] K. Liu, C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh, M. Nussenzweig, Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice, *Nat Immunol* 8(6) (2007) 578-83.
- [21] R.M. Steinman, M.D. Witmer, Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(10) (1978) 5132-6.
- [22] A.T. Kamath, J. Pooley, M.A. O'Keeffe, D. Vremec, Y. Zhan, A.M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D.F. Tough, K. Shortman, The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations, *The Journal of Immunology* 165(12) (2000) 6762-6770.
- [23] S. Jung, D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, R.A. Lang, In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens, *Immunity* 17(2) (2002) 211-20.
- [24] K. Liu, G.D. Victora, T.A. Schwickert, P. Guermonprez, M.M. Meredith, K. Yao, F.F. Chu, G.J. Randolph, A.Y. Rudensky, M. Nussenzweig, In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis, *Science* 324(5925) (2009) 392-7.
- [25] T.L. Murphy, G.E. Grajales-Reyes, X. Wu, R. Tussiwand, C.G. Briseno, A. Iwata, N.M. Kretzer, V. Durai, K.M. Murphy, Transcriptional Control of Dendritic Cell Development, *Annu Rev Immunol* 34 (2016) 93-119.
- [26] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo, *J Exp Med* 194(6) (2001) 769-79.
- [27] B. Sauter, M.L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, N. Bhardwaj, Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells, *J Exp Med* 191(3) (2000) 423-34.
- [28] P. Taylor, T. Tamura, H.C. Morse, 3rd, K. Ozato, The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse, *Blood* 111(4) (2008) 1942-5.
- [29] E.J. Pearce, B. Everts, Dendritic cell metabolism, *Nat Rev Immunol* 15(1) (2015) 18-29.
- [30] L.A. O'Neill, E.J. Pearce, Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function, *J Exp Med* 213(1) (2016) 15-23.

- [31] E. Segura, Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets, *Methods Mol Biol* 1423 (2016) 3-15.
- [32] H. Jaiswal, M. Kaushik, R. Sougrat, M. Gupta, A. Dey, R. Verma, K. Ozato, P. Taylor, *Batf3* and *Id2* have a synergistic effect on *Irf8*-directed classical CD8 α ⁺ dendritic cell development, *J Immunol* 191(12) (2013) 5993-6001.
- [33] T. Kambayashi, T.M. Laufer, Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?, *Nat Rev Immunol* 14(11) (2014) 719-30.
- [34] M. Swiecki, M. Colonna, The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells, *Nat Rev Immunol* 15(8) (2015) 471-85.
- [35] V. Soumelis, Y.J. Liu, From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation, *Eur J Immunol* 36(9) (2006) 2286-92.
- [36] A. Musumeci, K. Lutz, E. Winheim, A.B. Krug, What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity, *Front Immunol* 10 (2019) 1222.
- [37] M. Colonna, G. Trinchieri, Y.J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nat Immunol* 5(12) (2004) 1219-26.
- [38] N. Zucchini, G. Bessou, S. Traub, S.H. Robbins, S. Uematsu, S. Akira, L. Alexopoulou, M. Dalod, Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection, *J Immunol* 180(9) (2008) 5799-803.
- [39] A.L. Blasius, B. Beutler, Intracellular toll-like receptors, *Immunity* 32(3) (2010) 305-15.
- [40] D. Dudziak, A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.W. Lee, C.G. Park, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo, *Science* 315(5808) (2007) 107-11.
- [41] M.J. Bevan, Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay, *J Exp Med* 143(5) (1976) 1283-8.
- [42] J.M. den Haan, S.M. Lehar, M.J. Bevan, CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo, *J Exp Med* 192(12) (2000) 1685-96.

- [43] P. Schnorrer, G.M. Behrens, N.S. Wilson, J.L. Pooley, C.M. Smith, D. El-Sukkari, G. Davey, F. Kupresanin, M. Li, E. Maraskovsky, G.T. Belz, F.R. Carbone, K. Shortman, W.R. Heath, J.A. Villadangos, The dominant role of CD8⁺ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(28) (2006) 10729-34.
- [44] D. Theisen, K. Murphy, The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation, *F1000Res* 6 (2017) 98.
- [45] R.I. Thacker, E.M. Janssen, Cross-presentation of cell-associated antigens by mouse splenic dendritic cell populations, *Front Immunol* 3 (2012) 41.
- [46] T. Iyoda, S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R.M. Steinman, K. Inaba, The CD8⁺Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo, *The Journal of Experimental Medicine* 195(10) (2002) 1289-1302.
- [47] O. Schulz, C. Reis e Sousa, Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells, *Immunology* 107(2) (2002) 183-9.
- [48] I. Verbovetski, H. Bychkov, U. Trahtenberg, I. Shapira, M. Hareuveni, O. Ben-Tal, I. Kutikov, O. Gill, D. Mevorach, Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7, *J Exp Med* 196(12) (2002) 1553-61.
- [49] L.M. Stuart, M. Lucas, C. Simpson, J. Lamb, J. Savill, A. Lacy-Hulbert, Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation, *J Immunol* 168(4) (2002) 1627-35.
- [50] P. Tailor, T. Tamura, H.J. Kong, T. Kubota, M. Kubota, P. Borghi, L. Gabriele, K. Ozato, The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8, *Immunity* 27(2) (2007) 228-39.
- [51] M. Alcantara-Hernandez, R. Leylek, L.E. Wagar, E.G. Engleman, T. Keler, M.P. Marinkovich, M.M. Davis, G.P. Nolan, J. Idoyaga, High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization, *Immunity* 47(6) (2017) 1037-1050 e6.
- [52] M. Guilliams, C.A. Dutertre, C.L. Scott, N. McGovern, D. Sichien, S. Chakarov, S. Van Gassen, J. Chen, M. Poidinger, S. De Prijck, S.J. Tavernier, I. Low, S.E. Irac, C.N. Mattar, H.R. Sumatoh, G.H.L. Low, T.J.K. Chung, D.K.H. Chan, K.K. Tan, T.L.K. Hon, E. Fossun,

B. Bogen, M. Choolani, J.K.Y. Chan, A. Larbi, H. Luche, S. Henri, Y. Saeys, E.W. Newell, B.N. Lambrecht, B. Malissen, F. Ginhoux, Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species, *Immunity* 45(3) (2016) 669-684.

[53] Z. He, X. Zhu, Z. Shi, T. Wu, L. Wu, Metabolic Regulation of Dendritic Cell Differentiation, *Front Immunol* 10 (2019) 410.

[54] P.M. Thwe, L.R. Pelgrom, R. Cooper, S. Beauchamp, J.A. Reisz, A. D'Alessandro, B. Everts, E. Amiel, Cell-Intrinsic Glycogen Metabolism Supports Early Glycolytic Reprogramming Required for Dendritic Cell Immune Responses, *Cell Metab* 26(3) (2017) 558-567 e5.

Grant support: This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to S.L. (2019-05047). C.A. held scholarships from the Lucie Besner Foundation, the Montreal Diabetes Research Center and le Département de microbiologie, infectiologie et immunologie at the University of Montréal. S.L. is a Research Scholars Emeritus awardee from the Fonds de recherche Québec – Santé.

Abbreviations

cDC, conventional dendritic cell; DC, dendritic cell; DT, diphtheria toxin; mcDC, merocytic dendritic cell; pDC, plasmacytoid dendritic cell; 2-NDBG, 2-(*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose

Correspondence address:

Sylvie Lesage

Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Centre de recherche,
5415 boul. de l'Assomption,
Montréal, Québec,
H1T 2M4, CANADA

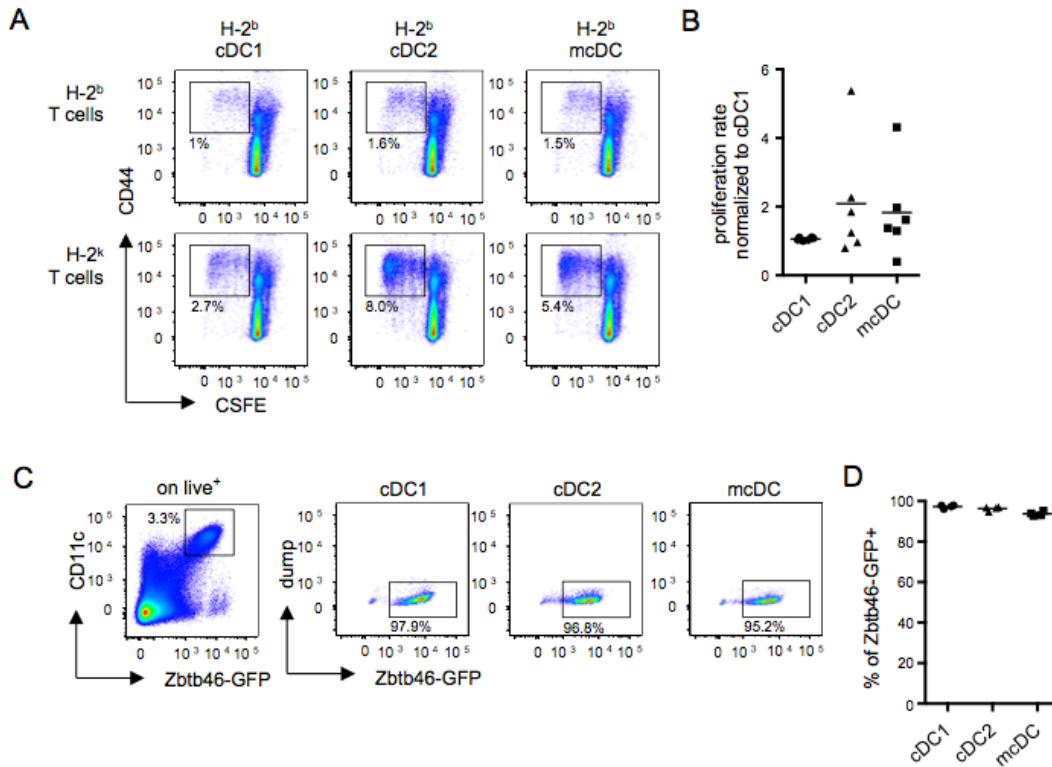
Tel : 1-514-252-3400 x 4649

E-mail : sylvie.lesage@umontreal.ca

The authors declare that they have no competing financial interest in relation to the work described.

1.8. Figures

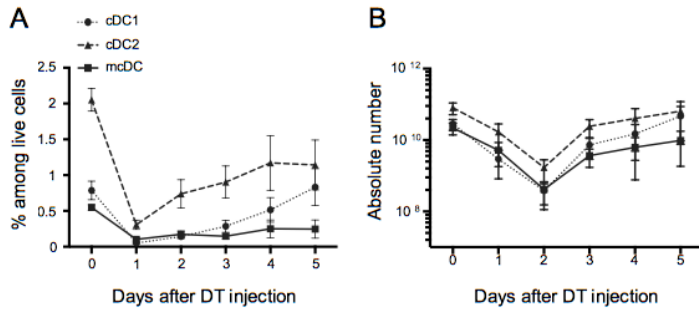
Figure 1. mcDCs exhibit key characteristics of cDCs.



(a) A mixed lymphocyte reaction on sorted H-2^{b+} cDC subsets from a B6 mouse mixed with CFSE-labelled H-2^{b+} or H-2^{k+} CD4⁺ T cells, respectively obtained from the spleen of a B6 or a B10.BR mouse. T cell proliferation (CD44⁺CFSE⁻) is quantified by flow cytometry after 72h co-culture. Numbers near the gates indicate the corresponding percentage of cells that proliferated. (b) Compilation of the proliferation rate, normalized on cDC1 induced proliferation. n= 6 independent experiments. (c) GFP expression was quantified using B6.Zbtb46-GFP reporter mice for CD11c^{high} cells (left panel), as well as in cDC1, cDC2 and mcDCs, as indicated. Numbers near the gates indicate the corresponding percentage of GFP⁺ cells. (d) Compilation of percentage of GFP⁺ cells for each DCs subset from B6.Zbtb46-GFP reporter mice. n=4 mice; 2 independents experiments. The different cDC subsets are gated as follows: cDC1, CD8 α ⁺CD11b⁻; cDC2, CD8 α ⁻CD11b⁺; mcDC, CD8 α ⁻CD11b⁻. Each symbol represents one mouse. Dash represents the mean.

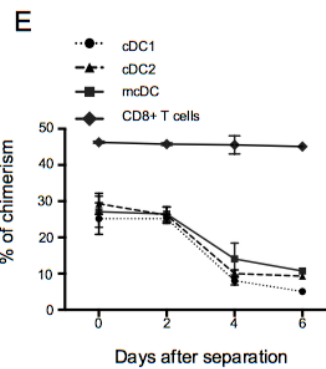
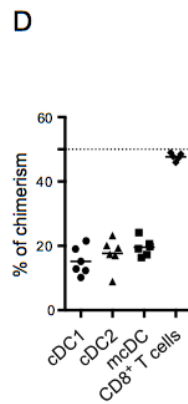
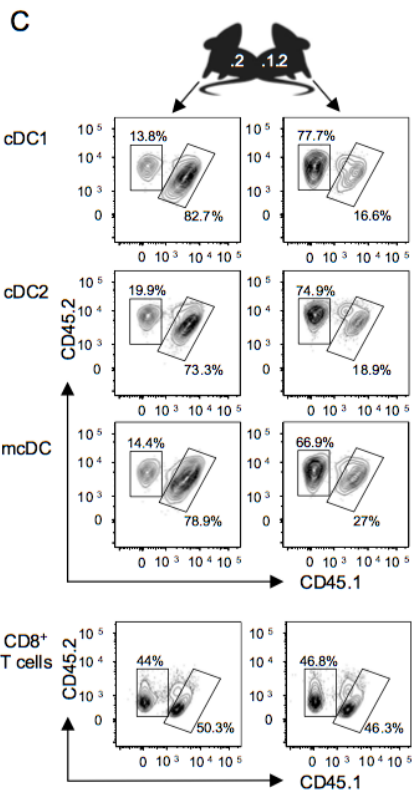
Figure 2. mcDC turnover

(a-b) Kinetics of DC subset differentiation was evaluated in CD11c-DTR mice after injection



with DT. DT was injected 5, 4, 3, 2, 1 day before sacrifice or uninjected mice (day 0). The percentage of splenic DC subsets among live cells is shown in (a) and the absolute number of each DC subset in (b) (cDC1, dotted line; cDC2, dashed line; mcDC, full line). At least 3 mice per time point, one representative of 2 independent experiments.

(c-d) mcDC homeostasis was determined using parabiotic mice. B6 (CD45.2) mice and B6.1.2 (CD45.1.2) mice were joined for 45 days. (c) Representative flow cytometry plots of the proportion of each DC subset as well as CD8⁺ T cells of either B6.1.2 or B6.2 origin, in the spleen. Numbers near the gates indicate the corresponding percentage of cells. (d) Percent of chimerism for each cell subsets in the spleen. Each symbol represents one mouse. Dash represents the mean. n= 6 paired mice; 3 independent experiments.



cells of either B6.1.2 or B6.2 origin, in the spleen. Numbers near the gates indicate the corresponding percentage of cells. (d) Percent of chimerism for each cell subsets in the spleen. Each symbol represents one mouse. Dash represents the mean. n= 6 paired mice; 3 independent experiments. (e) Compilation of the percentage of chimerism for each DC subset and CD8⁺ T cells at different time points after the separation of the parabionts. (cDC1, black circle; cDC2, black triangle; mcDC, black square; CD8⁺ T cells, black diamond).

Figure 3. mcDCs differentiate from pre-cDCs in vivo

Pre-cDCs ($\text{live}^+ \text{Lin}^- \text{B220}^- \text{I-A}^b \text{CD11c}^+ \text{CD172a}^{\text{low}} \text{CD135}^+$) from B6 mice were injected

intravenously in a non-irradiated B6.1 recipient.

After 6 days, splenic DC subsets were assessed by flow cytometry. (a) Sorting profiles of pre-sorted (top) and post-sorted (bottom) pre-cDCs.

(b) Flow cytometry profiles of pre-cDC-derived DCs (CD45.2, left) and their expression of CD11c (right) in comparison to endogenous cells (middle).

(c) Pie charts representing the distribution of each DC subsets, among the total cDCs, differentiated in the spleen from endogenous (left) or from transferred pre-cDCs (right).

Black, cDC1; white, cDC2 and grey, mcDC.

(b, c) The different DC subsets are gated as follows: cDC1, $\text{CD8}\alpha^+ \text{CD11b}^-$; cDC2, $\text{CD8}\alpha^- \text{CD11b}^+$; mcDC, $\text{CD8}\alpha^- \text{CD11b}^-$. n = 3 independent experiments.

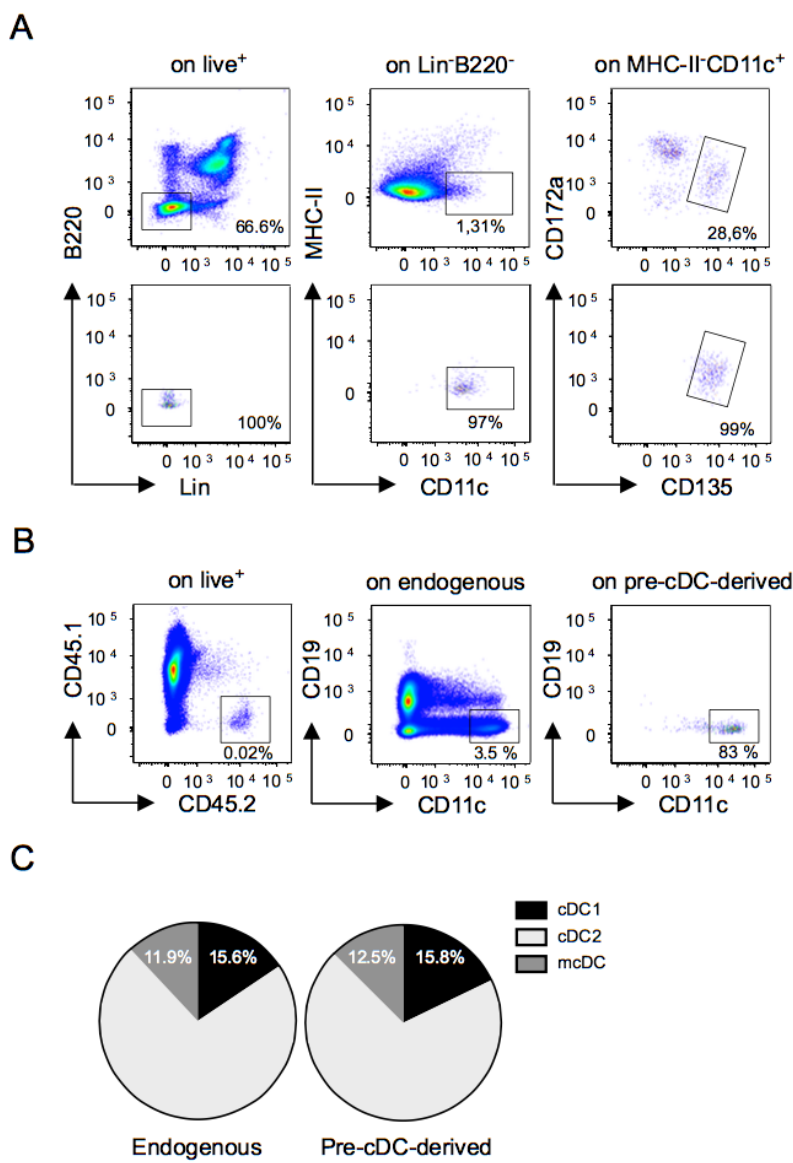
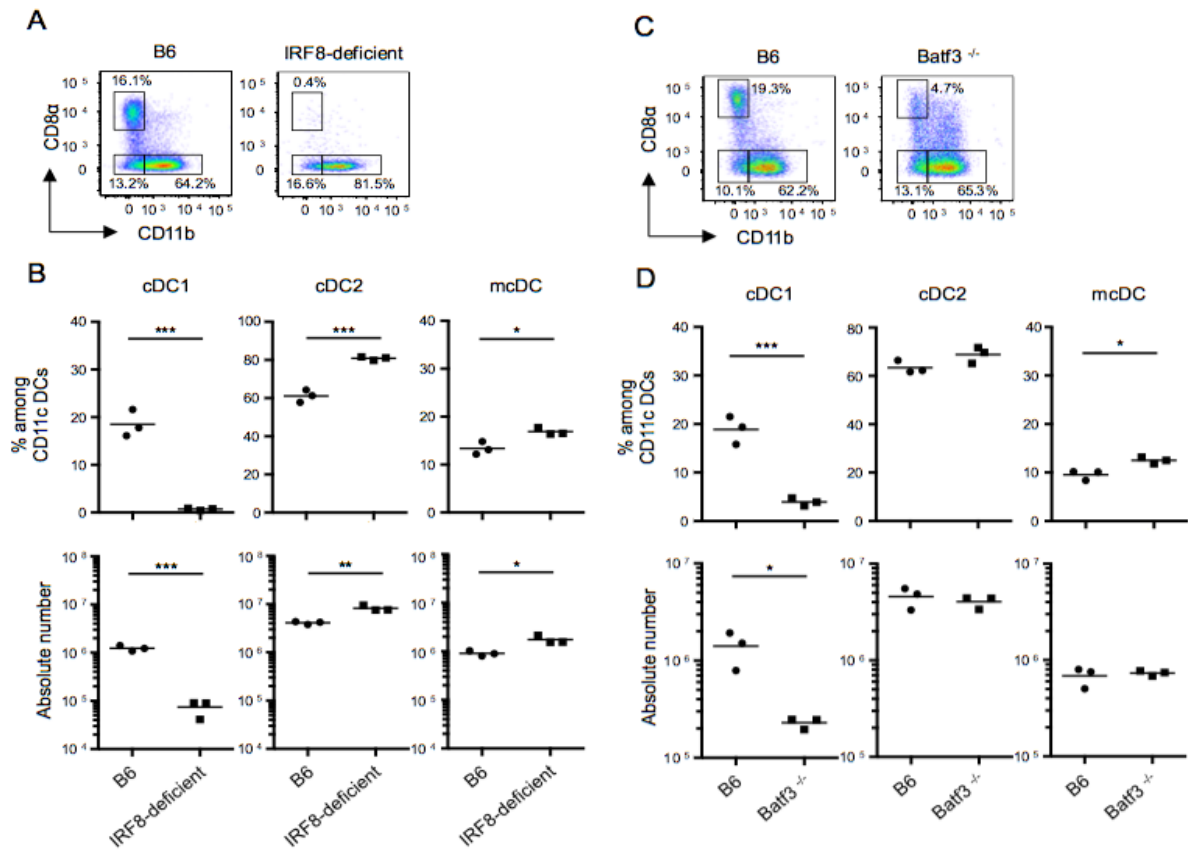
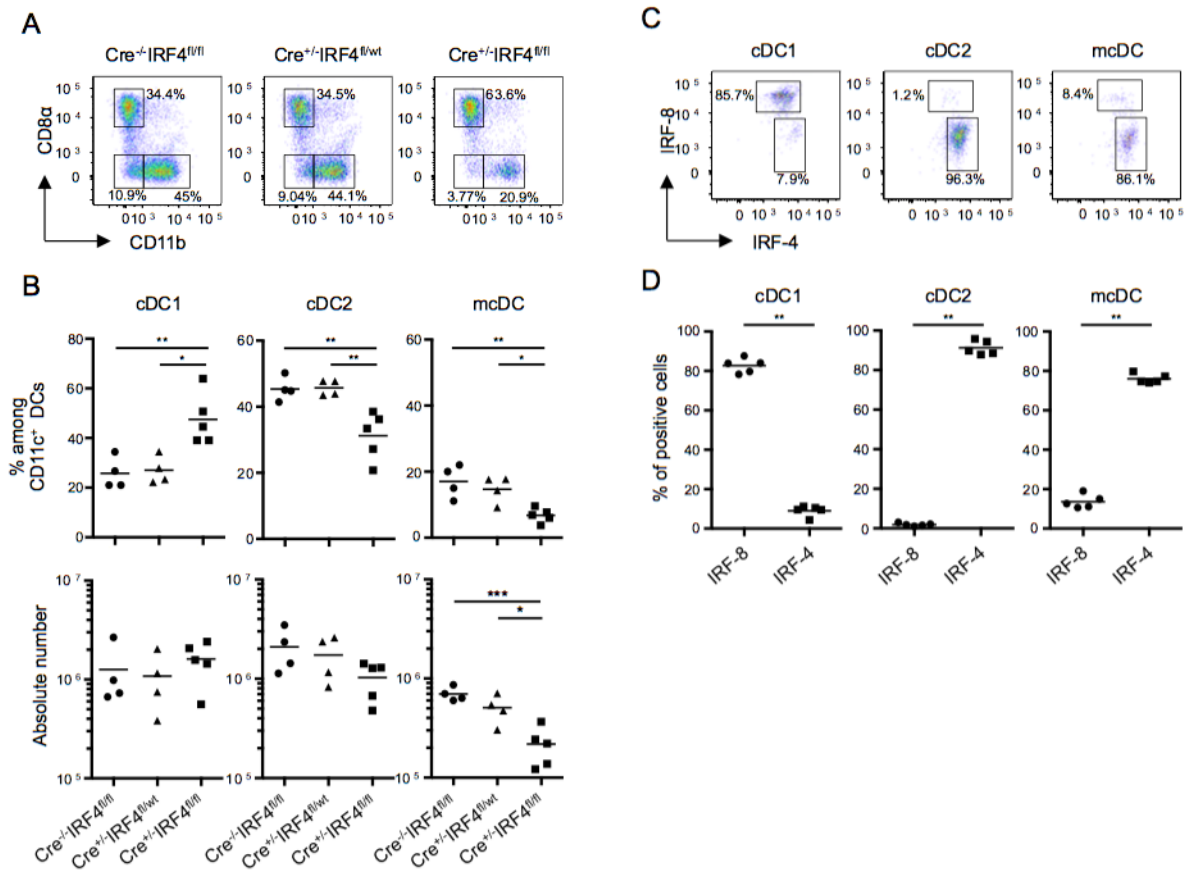


Figure 4. *Irf8* and *Batf3* are not required for mDC differentiation.



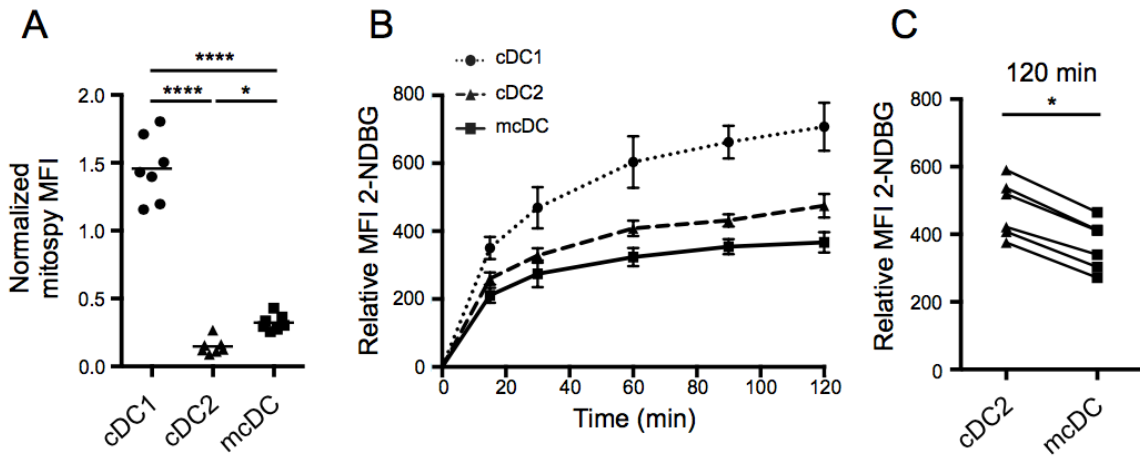
(a) Representative flow cytometry plots of CD8 α and CD11b expression on CD11c^{hi} cells from B6 and B6.IRF8^{BXH2} (IRF8-deficient mice). (b) Compilation of the percentage of splenic DC subsets among CD11c^{hi} cells (top) and the absolute number (bottom) for each mouse strain, as indicated. (c) Representative flow cytometry plots of CD8 α and CD11b expression on CD11c^{hi} cells from B6 and B6.Batf3^{-/-} mice. (d) Compilation of the percentage of splenic DC subsets among CD11c^{hi} cells (top) and the absolute number (bottom) for each mouse strain, as indicated. (a, c) Numbers near the gates indicate the corresponding percentage of cells. (b, d) Each symbol represents data for one mouse. Dash represents the mean. n= 3 mice. P-values, *< 0.05; **< 0.01; ***< 0.001.

Figure 5. mcDC number is decreased in the absence of *Irf4*.



(a) Representative flow cytometry plots of CD8 α and CD11b expression on splenic CD11c^{hi} cells from CD11c.Cre-IRF4^{fl/fl} mice and corresponding littermate controls, as indicated. Numbers near the gates indicate the percentage of cells. (b) Compilation of the percentage of splenic cDC1, cDC2 and mcDCs among CD11c^{hi} cells (top) or the absolute number (bottom) for each mouse strain. n= at least 4 mice per group; 4 independent experiments. *P*-values, * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001. (c) Representative flow cytometry plot of IRF-4 and IRF-8 expression on splenic cDC1, cDC2 and mcDCs from B6 mice. Numbers near the gates indicate the percentage of cells. (d) Compilation of the percentage of IRF-4⁺ and IRF-8⁺ cells among each DC subset. Each symbol represents one mouse. Dash represents the mean. n=5. Data were acquired in at least 3 independent experiments. *P*-values, ** < 0.01.

Figure 6. mcDCs have a distinct metabolic phenotype



a) Mitochondrial membrane potential was evaluated with Mitospy. Compilation of Mitospy MFI expression on DC subsets is normalized to the expression B cells for each sample. **b, c)** Kinetics of glucose uptake was determined by evaluating the incorporation of the 2-NDBG. **b)** Relative MFI, based on the MFI of 2-NDBG at t_0 , is determined at 15, 30, 60 and 120 minutes for each DC subset (cDC1, dotted line; cDC2, dashed line; mcDC, full line). **c)** Compilation of the relative MFI of 2-NDBG between cDC2 and mcDC at 120min. Each line represents the decrease in MFI between cDC2 and mcDC from same mouse. **a,c)** Each symbol represents data from one mouse. $n=6$. Data were acquired in at least 3 independent experiments. P -values, $* < 0.05$; $**** < 0.0001$.

Chapitre 3 : Article 2

1. BIM determines the number of merocytic dendritic cells, a cell type that breaks immune tolerance

Cindy Audiger and Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans *Immunology & cells biology*, Vol 96 :1008-1017 (2018)

J'ai effectué toutes les expériences et généré les figures associées. J'ai effectué l'ensemble des analyses. La conception du manuscrit, la réponse aux demandes de révision et leur intégration dans le manuscrit ont été faites conjointement avec Dre Sylvie Lesage.

TITLE : BIM determines the number of merocytic dendritic cells, a cell type that breaks immune tolerance

Cindy Audiger^a and Sylvie Lesage^a

^a Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada and Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

emails: cindy.audiger@umontreal.ca, sylvie.lesage@umontreal.ca

Running title: BIM regulates merocytic dendritic cells

Correspondence address:

Sylvie Lesage

Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Centre de recherche,

5415 boul. de l'Assomption,

Montréal, Québec,

H1T 2M4, CANADA

Tel : 1-514-252-3400 x 4649

Fax : 1-514-252-3569

E-mail : sylvie.lesage@umontreal.ca

The authors declare that they have no competing financial interest in relation to the work described.

Keywords: dendritic cells, merocytic dendritic cells, BIM, homeostasis, Idd13, autoimmunity, NOD mice.

1.1. Abstract

In contrast to conventional dendritic cells (cDC), when merocytic dendritic cells (mcDC) present antigens derived from apoptotic bodies, T cell anergy is reversed rather than induced, a process that promotes autoimmunity. Interestingly, mcDC are present in higher proportion in type 1 diabetes-prone NOD mice than in autoimmune-resistant B6 and BALB/c mice, and the *Insulin-dependent diabetes 13* locus is linked to mcDC proportion. Therefore, mcDC are notably associated with susceptibility to autoimmune diabetes. To identify which gene determines the proportion and absolute number of mcDC, we undertook a candidate gene approach by selecting relevant candidates within the *Idd13* locus. We find that neither *B2m* nor *Sirpa* appear to influence the proportion of mcDC. Instead, we show that *Bim* effectively modulates mcDC number in a hematopoietic-intrinsic manner. We also demonstrate that *Bim*-deficiency does not impact other cDC subsets and appears to play a specific role in determining the proportion and absolute number of mcDC by promoting their survival. Together, these data demonstrate that *Bim* specifically modulates the number of mcDC. Identifying factors that facilitate apoptosis of mcDC by increasing BIM activity in a cell type-specific manner may help prevent autoimmunity.

1.2. Introduction

Type 1 diabetes is a complex genetic trait where susceptibility to disease is also influenced by environmental factors [1]. Over forty genetic type 1 diabetes susceptibility loci have been identified in humans and mice [2, 3]. The NOD mice, which spontaneously develop autoimmune diabetes, have been an instrumental tool in dissecting susceptibility to disease as this model shares many genetic and pathophysiological characteristics to human type 1 diabetes [4-6]. Additionally, NOD congenic mice helped confirm that specific loci contribute to different cellular processes associated with disease susceptibility and, as such, have facilitated the identification of relevant candidate genes [4, 7-10].

Cellular homeostasis of dendritic cells (DC) composes one of the cellular phenotypes associated with diabetes susceptibility in NOD mice [11]. DC play a central role in the immune response, as they are pivotal in the T cells' decision to induce tolerance or to yield an effector immune response. Different DC subsets have been described, where each subset mediates specialized functions. Specifically, in the spleen of inbred mice, two conventional DC (cDC) subsets have been defined, namely $CD8\alpha^+$ cDC and $CD11b^+$ cDC. At steady state, immature $CD8\alpha^+$ cDC and $CD11b^+$ cDC help maintain immune tolerance [12-14]. Immature splenic $CD8\alpha^+$ cDC are able to cross-present antigens to $CD8^+$ T cells via MHC class I and effectively induce $CD8^+$ T cell tolerance, whereas immature $CD11b^+$ cDC preferentially induce $CD4^+$ T cell tolerance [15]. These two cDC subsets also induce the differentiation and help maintain the pool of regulatory T cells [16, 17], a T cell subset that plays a critical role in the maintenance of peripheral immune tolerance [18].

In striking contrast to CD8 α ⁺ cDC and CD11b⁺ cDC which induce T cell tolerance at steady state, merocytic DC (mcDC) were recently described for their ability to reverse antigen-specific immune tolerance, both in the context of tumours and autoimmunity [19, 20]. Specifically, in a B16-ovalbumin (OVA) melanoma tumour model, injection of mcDC loaded with OVA-expressing apoptotic cells reversed OVA-specific CD8⁺ T cell anergy and led to the complete elimination of the tumour [19]. In addition to this tumour model, mcDC also reversed antigen-specific T cell anergy in an autoimmune setting, where injection of mcDC loaded with apoptotic pancreatic beta cells effectively induced autoimmune diabetes [20]. Interestingly, in comparison to B6 and BALB/c diabetes-resistant strains, the diabetes-prone NOD mice exhibit a higher proportion of mcDC [20, 21]. Together with the specific capacity of mcDC to break self-tolerance, the heightened mcDC proportion in NOD mice led us to argue that mcDC contribute to diabetes susceptibility.

In agreement with a potential contribution of mcDC in conferring diabetes susceptibility, we have previously shown that the *Insulin-dependent diabetes (Idd)13* locus is linked to mcDC in NOD mice [21]. We validated that the *Idd13* locus is sufficient to modulate mcDC, as both the proportion and absolute number of mcDC were comparable between B6 and NOD.*Idd13* congenic mice [21], wherein the *Idd13* locus bears alleles of B6 origin [22]. NOD.*Idd13* mice are resistant to diabetes [23] and present with a low number of mcDC relative to NOD mice, providing an additional association between the number of mcDC and diabetes susceptibility [21].

In this study, we assess the implication of candidate genes encoded within the *Idd13* locus on the control of mcDC proportion. We find that neither *Sirpa* nor *B2m* are likely candidate genes in defining the proportion of mcDC. Rather, we validate that *Bcl2l11*, which encodes for BIM and thus hereafter referred to as *Bim*, impacts mcDC proportion in a hematopoietic-intrinsic manner. The effect of *Bim* on DC subsets appears limited to mcDC, as *Bim*-deficiency does not affect the proportion of other cDC. Together, these results demonstrate a specific role for *Bim* in defining the proportion and number of mcDC in the spleen, providing a potential molecular target or pathway to modulate mcDC in vivo, a cell type that effectively reverses anergy and contributes to autoimmunity.

1.3.Results

B2m and Sirpa, relevant candidate genes in the Idd13 locus, do not regulate mcDC proportion

We have previously shown that the *Idd13* locus is linked to mcDC proportion [195]. With more than four hundred genes encoded in this particular locus, we opted to undertake a candidate gene approach to identify a gene and/or a molecular pathway that may specifically regulate mcDC proportion. We turned our attention to genes within the *Idd13* locus for which the genetic variants between B6 and NOD mice are known to influence biological functions, arguing that one of these genes may also define the proportion of mcDC. Historically, the first candidate gene linked to diabetes susceptibility was beta-2-microglobulin (*B2m*) [273]. B2M is important for the proper folding of MHC-I, influencing peptide presentation to T cells. NOD mice express a different *B2m* structural variant than B6 mice and this variant is linked to diabetes susceptibility [274]. To determine if *B2m* could be implicated in DC and, more specifically, mcDC homeostasis, we compared the proportion and absolute numbers of cDC subsets and mcDC in B6. $\beta 2M^{-/-}$ mice relative to B6, NOD and NOD.*Idd13* mice (Fig 1). For the CD8 α^+ cDC subset, our data confirm that B6 mice exhibit a higher proportion and number of CD8 α^+ cDC in the spleen relative to NOD mice (Fig 1)[193, 275, 276]. This phenotype is not influenced by the *Idd13* locus, as the proportion and number of CD8 α^+ cDC is comparable in both NOD and NOD.*Idd13* mice (Fig 1). B2m-deficiency also does not significantly impact the proportion or the absolute number of CD8 α^+ cDC in the spleen (compare B6 to B6. $\beta 2m^{-/-}$ in Fig 1). In contrast to CD8 α^+ cDC, both the proportion and absolute number of CD11b $^+$ cDC are comparable for B6, NOD and B6. $\beta 2m^{-/-}$ mice (Fig 1). This is in agreement with previous

studies showing that the number of CD11b⁺ cDC is not significantly different in B6 and NOD mice [193, 201]. Intriguingly, the proportion of CD11b⁺ cDC is increased in NOD.*Idd13* mice (Fig 1b). As the absolute number of CD11b⁺ cDC in NOD.*Idd13* mice is not significantly different to that of B6 or NOD mice, this increase in percentage of CD11b⁺ cDC in NOD.*Idd13* mice may simply reflect the corresponding decrease in mcDC in this strain (Fig1a,b). Finally, we confirm our previous findings that mcDC proportion and absolute number are elevated in NOD mice relative to both B6 and NOD.*Idd13* mice [195]. Moreover, as for both CD8 α ⁺ and CD11b⁺ cDC, we find that both B6 and B6. β 2M^{-/-} mice exhibit similar percentages and absolute numbers of mcDC in the spleen. These results suggest that the absence of *B2m* does not significantly influence the proportion of DC subsets in the spleen.

As a second candidate gene, we opted to explore the potential role of *Sirpa*. SIRP- α , also known as CD172a, is primarily expressed in myeloid cells, namely monocyte, neutrophils and macrophages [277]. Among DC subsets, the highest level of SIRP- α expression is observed on CD11b⁺ cDC, where SIRP- α -CD47 interactions regulates DC migration to the spleen, therein influencing DC subset distribution [278, 279]. Notably, *Sirpa* is highly polymorphic and the NOD variant exhibits a high affinity for the CD47 ligand [280, 281], further stressing *Sirpa* as a likely gene defining mcDC proportion in the spleen. As such, we quantified the expression of SIRP- α and its ligand, CD47, on cDC subsets and mcDC in the spleen of B6, NOD and NOD.*Idd13* mice. CD47 is ubiquitously expressed and its expression levels are relatively invariable [282]. Indeed, we find no differences in CD47 expression across the different DC subsets, or among the different strains of mice (Fig 2a,b). In contrast, SIRP- α expression is more variable, where CD8 α ⁺ and CD11b⁺ cDC respectively express the lowest and highest

levels of SIRP- α in all mouse strains examined, namely B6, NOD and NOD.*Idd13* mice (Fig 2a,b). Accordingly, mcDC exhibited intermediate levels of SIRP- α expression relative to the two cDC subsets (Fig 2a,b). Still, as for CD47, we observed no differences in SIRP- α expression across the different strains of mice (Fig 2a,b). As the level of protein expression is not necessarily synonymous with SIRP- α affinity and function [280], we opted to define the contribution of SIRP- α -CD47 interactions by analyzing the proportion and absolute numbers of DC subsets in the spleen of B6.CD47^{-/-} mice. We predictably observed a decrease in the proportion of CD11b⁺ cDC and a corresponding increase of CD8 α ⁺ cDC in the spleen of B6.CD47^{-/-} mice relative to B6 mice (Fig 2c,d) [278, 279]. Interestingly, the percentage of mcDC was not affected by the absence of CD47 (Fig 2c,d). Taken together, these results demonstrate that SIRP- α -CD47 interactions do not influence mcDC migration to the spleen.

Bim modulates the proportion and absolute number of mcDC in vivo

For candidate genes within the *Idd13* locus, we next turned our attention to *Bim*. BIM is a pro-apoptotic molecule and, as such, lower levels of BIM expression or activity may explain a higher proportion of mcDC. Notably, induction of BIM is impaired in NOD thymocytes relative to control mice [283, 284]. In order to determine if a defect of BIM expression could be observed in NOD mcDC in comparison to B6 or NOD.*Idd13* control mice, we analyzed the expression of BIM by flow cytometry. We find that BIM expression is highest in CD8 α ⁺ cDC and lowest in both CD11b⁺ cDC and mcDC, irrespective of the mouse genetic background (Supplementary figure 1a, b). These results suggest that the levels of BIM expression in DC subsets do not correlate with mcDC proportion.

The level of BIM expression is not necessarily synonymous with function, as the pro-apoptotic activity of BIM is regulated by its interaction with different proteins [285, 286]. Notably, *Bim*-deficiency allows for increased DC survival, which promotes the development of an autoimmune response [203]. Specifically, Chen et al. demonstrate that *Bim*^{-/-} cDC exhibit an enhanced survival upon in vitro culture [203, 287]. We decided to perform similar experiments to determine the impact of BIM on the in vitro survival of mcDC relative to CD8 α ⁺ and CD11b⁺ cDC. We pooled the spleen of a B6.SJL (B6.1 for denoting the CD45.1 allelic expression) and a B6.*Bim*^{-/-} mouse prior to cell staining and cell sorting. This ensures that the DC from both B6.1 and B6.*Bim*^{-/-} mice were processed simultaneously, minimizing the experimental variation associated with cell sorting. The sorted DC subset were cultured in vitro for 24h and cell survival was subsequently quantified by flow cytometry. CD8 α ⁺ cDC, which express the highest level of BIM (Supplementary figure 1), show the lowest level of cell survival in vitro, relative to both CD11b⁺ cDC and mcDC (Fig 3a, b). We find that *Bim*-deficiency confers an in vitro survival advantage to CD8 α ⁺ cDC and mcDC, with a positive trend for CD11b⁺ cDC (Fig 3a, b). To determine how the in vitro survival advantage of *Bim*-deficiency impacted DC homeostasis in vivo, we next compared the percentage and absolute number of cDC subsets and mcDC in the spleen of B6 and B6.*Bim*^{-/-} mice. As previously shown by others [288], the percentage and absolute number of both CD8 α ⁺ and CD11b⁺ cDC were not affected by the absence of *Bim* (Fig 4a,b) and neither was their morphology (Supplementary figure 2). In contrast, mcDC proportion and absolute number were both increased in B6.*Bim*^{-/-} relative to B6 control mice (Fig 4a,b), where mcDC from both strain also displayed similar morphological characteristics (Fig 4c). This result suggests that *Bim*-deficiency regulates mcDC numbers in the spleen. Still, as the *Bim*-deficiency was originally

introduced on 129 mice and subsequently backcrossed to B6, the increase in mcDC number in B6.*Bim*^{-/-} relative to B6 control mice could be due to genetic variants of 129 origin that are in linkage disequilibrium with *Bim*. However, we found that B6 and 129 mice presented with a similar proportion of mcDC in the spleen (data not shown), suggesting that the increased number of mcDC in B6.*Bim*^{-/-} mice is a consequence of *Bim*-deficiency. Together, these results suggest that among spleen cDC subsets, *Bim* specifically influences mcDC proportion and number by increasing their survival.

BIM controls mcDC proportion in a bone marrow-intrinsic manner

As we have determined that *Bim* specifically modulates mcDC number, we then wished to investigate if the impact of *Bim*-deficiency on mcDC was due to hematopoietic-intrinsic or -extrinsic factors. Indeed, B6.*Bim*^{-/-} mice present with various systemic phenotypes, such as susceptibility to autoimmunity, splenomegalomany and inflammation [285]. We thus generated competitive bone marrow chimeras where B6 and B6.*Bim*^{-/-} bone marrow are mixed at a 1:1 ratio and compete in a lethally irradiated B6 host for reconstituting the hematopoietic system (Fig 5a). We exploit CD45 allelic markers to track the origin of each cell. Specifically, bone marrow from a B6.1.2 mouse (bearing both CD45.1 and CD45.2 alleles, see methods) was mixed with bone marrow from a B6.*Bim*^{-/-} (B6.1.2 : B6.*Bim*^{-/-}), or from a B6 (B6.1.2 : B6) mouse as control, and injected in a lethally irradiated B6.1 recipient (Fig 5a). Eight weeks after reconstitution, we assessed the contribution of either B6 or B6.*Bim*^{-/-} bone marrow to the proportion of cDC and of mcDC in the spleen. In the control bone marrow chimera (B6.1.2 : B6), both B6.1.2 and B6 bone marrow equally contribute to CD8 α ⁺, CD11b⁺ cDC and mcDC, where the B6.1.2 to B6 1:1 ratio is maintained for each DC subset (Fig 5b,c). However, in the

B6.1.2 : B6.*Bim*^{-/-} competitive bone marrow chimera, the B6.*Bim*^{-/-} bone marrow shows a competitive advantage over B6.1.2 bone marrow for generating mcDC, with a 1.5:1 bias in favor of B6.*Bim*^{-/-} (Fig 5b,c). Taken together these results validate *Bim* as a hematopoietic cell-intrinsic factor that defines mcDC proportion.

BIM expression is ineffectively induced in cDC from NOD mice

A deficiency in *Bim* determines the proportion and absolute number of mcDC in the spleen. Yet, BIM expression is similar in DC from B6 and NOD mice, where the proportion of mcDC is highest in NOD mice. Together, these results prompted us to revisit the regulation of BIM expression in DC. Notably, it is the induction of BIM, and not the steady state levels of expression, that is impaired in NOD thymocytes relative to control mice [283, 284, 289]. BIM expression can be induced in DC following TLR stimulation[203]. Indeed, BIM expression was efficiently induced in DC from B6 mice injected with a single dose of poly I:C one day prior to the analysis (Fig 6a). In contrast the induction of BIM expression was slightly impaired in DC from NOD mice relative to B6 mice (Fig 6a,b). Taken together, these data show that the impaired induction in BIM expression in NOD mice is not limited to thymocytes, as it also extends to DC. These results also suggest that the defect in BIM induction in NOD mice might contribute to the accumulation of mcDC in the spleen.

1.4. Discussion

Type 1 diabetes is a complex autoimmune trait where disease susceptibility is related to the presence of different genetic polymorphisms, which, in mice, are encompassed within many *Idd* loci. These loci are linked to various immunoregulatory phenotypes, such as defects in thymic selection and antigen presentation, or in the regulation of different immune cells including DC, NK cells and regulatory T cell subsets, to name a few [290, 291]. We previously showed that the *Idd13* locus is linked to the regulation of mcDC proportion [195], a cell type that induces diabetes in healthy recipient mice when loaded with apoptotic islet cells [193]. We validated the linkage analysis by exploiting NOD.*Idd13* congenic mice, in which the proportion of mcDC is restored to the same level as the B6 mouse [195]. In this study, we explore the role of three candidate genes, namely *B2m*, *Sirpa* and *Bim*, in the regulation of mcDC number. We find that neither *B2m* nor *Sirpa* influence the proportion or absolute number of mcDC. In contrast, B6.*Bim*^{-/-} mice exhibited an increase in the proportion and absolute mcDC number. The defect in *Bim* did not affect other cDC subsets, and was thus specific to mcDC. Regulation of mcDC proportion by *Bim*-deficiency occurred in a bone marrow-intrinsic manner. Together, these findings highlight *Bim*, a gene encoded within the *Idd13* locus, as a key regulator of mcDC.

B2m and *Sirpa* were both relevant *Idd13* candidate genes to consider in our study of mcDC, as they each present with polymorphisms in the NOD mouse [273, 274, 280]. Yet, no differences in mcDC proportion were found in absence of *B2m* or *Cd47*, the cellular ligand for SIRP- α . Moreover, the expression of CD47 and SIRP- α was similar for both cDC and mcDC subsets between B6 and NOD mice. Nevertheless, relative to CD8 α ⁺ and CD11b⁺ cDC respectively

expressing low and high levels of SIRP- α , mcDC express an intermediate level of SIRP- α . Because SIRP- α is implicated in cellular migration [292], it is tempting to suggest that mcDC may be affected by *Sirpa* polymorphisms in conditions other than at steady state. Additional experiments evaluating mcDC migration in the context of various immune responses are needed to further explore this issue.

Although neither *B2m* nor *Sirpa* influenced mcDC proportion, we observed a striking phenotype in B6.*Bim*^{-/-} mice, where the proportion and absolute number of mcDC was comparable to that of NOD mice. In line with this observation, a defect in *Bim* induction in NOD mice has previously been reported [283, 284]. Specifically, induction of *Bim* mRNA or BIM protein is impaired in NOD thymocytes, resulting in a defect in thymic selection associated with an enhanced survival of autoreactive T cells [283, 284, 293]. Relative to mcDC and CD11b⁺ cDC, CD8 α ⁺ cDC expressed higher levels of BIM. This correlated with a lower survival capacity for CD8 α ⁺ cDC when cultured in vitro. Although, we did not detect a variation in BIM expression between DC from B6 and NOD mice at steady state, we did find that NOD DC ineffectively induced BIM expression upon poly I:C treatment. Therefore, we find that the defect in BIM induction in NOD mice is not limited to thymocytes, as it is also observed in DC. This may account for the increased proportion of mcDC in the spleen of NOD mice.

In B6.*Bim*^{-/-} mice, BIM expression is evidently absent in all cells. Yet, among DC subsets, the absence of BIM appears to specifically affect the proportion and absolute number of mcDC, and does so in a hematopoietic-intrinsic manner. Indeed, as previously reported by others

[288], we find that B6.*Bim*^{-/-} mice exhibit a similar proportion and absolute number of CD8 α ⁺ and CD11b⁺ cDC relative to B6 mice. The specific impact of *Bim*-deficiency in the regulation of mcDC number suggest that this cell type is regulated independently of the other cDC subsets. Intriguingly, each cDC subset expresses different members of the BCL-2 family [288], each of which exhibit pro- and anti-apoptotic activity through slightly different molecular pathways [294, 295], such that it may explain the enhanced sensitivity of mcDC to *Bim*-deficiency relative to other DC subsets.

Bim-deficiency leads to an increase in mcDC and autoreactive T cells, where both traits are associated with an increase in susceptibility to autoimmunity. Hence, one would expect that a decrease in BIM activity in type 1 diabetes-prone NOD mice would result in an increase in diabetes incidence. However, in addition to influencing mcDC proportion and impeding negative selection of potentially autoreactive thymocytes, the number of regulatory T cells are increased in NOD.*Bim*^{-/-} mice where they play a dominant role in maintaining immune tolerance [296]. Moreover, BIM contributes to insulin-producing beta cell death in type 1 diabetes [297]. Consequently, for both the dominant immune-tolerance conferred by regulatory T cells and the insulin-producing beta cell resistance to cell death, NOD.*Bim*^{-/-} mice are protected from autoimmune diabetes [296]. Similarly, B6.*Bim*^{-/-} mice treated with streptozotocin, which induces beta-cell death, are relatively resistant to diabetes, again due to resistance conferred by T cells and insulin producing beta-cells [298]. These observations highlight the genetic, molecular and cellular complexity driving the susceptibility to autoimmune diseases and suggest that systemically increasing *Bim* expression or applying drugs that would systemically enhance the *Bim* pathway might decrease the proportion of

mcDC and of autoreactive T cells, but would not necessarily prevent autoimmunity. Instead, cell-type specific therapeutic designs would be favoured.

The objective of the study was to identify a gene or a molecular pathway that regulates mcDC number. As the *Idd13* locus is linked to mcDC number and that both the *Idd13* locus and mcDC number are linked to diabetes susceptibility, we opted to exploit a candidate gene-based approach. We tested how deficiencies in specific candidate genes within the *Idd13* locus affected mcDC proportion and number. While deficiencies in either *B2m* or *Sirpa* did not modulate the number of mcDC, *Bim* was identified as a key player in defining mcDC proportion and number in the spleen. Importantly, we cannot exclude that other candidate genes within the *Idd13* locus, such as *Cd93* and *Mertk* [299, 300], nor that specific polymorphisms in/near *B2m* or *Sirpa* do not contribute to determining mcDC number, as these were not specifically tested. Notably, the *Idd13* locus only explained part of the variance between B6 and NOD mice, such genetic variants outside of the *Idd13* locus also contribute to this trait. Notwithstanding, our data clearly demonstrate that *Bim*-deficiency impacts the proportion and the number of mcDC in the spleen.

Altogether, this study describes for the first time a role of BIM in the control of a specific DC subset, namely mcDC. This effect of *Bim* deficiency is bone marrow-intrinsic and seems to be linked to a better survival capacity of mcDC in the NOD mice, leading to an increase in their proportion. The result of a linkage analysis, validated by a congenic mouse model, has facilitated the identification of a molecular pathway defining a specific phenotype, namely BIM in modulating mcDC proportion and number. Future studies aimed at identifying

how BIM regulates mcDC number may facilitate the design of cell-type specific approaches for the prevention of autoimmune diseases.

1.5. Methods

Mice.

C57BL/6 (B6 which bear CD45.2 allelic expression), NOD, B6.*Bim*^{-/-}, B6.SJL (B6.1 for denoting the CD45.1 allelic expression), B6.CD47^{-/-} and B6.Beta-2-microglobulin^{-/-} (B6.*β2M*^{-/-}) mice were all purchased from The Jackson Laboratory. The NOD.NOR-*Idd13* mice (referred to as NOD.*Idd13* throughout), for which the *Idd13* locus is of B6 origin [301], were generously provided by David Serreze (Jackson Laboratory). B6.1 and B6 mice were mated to obtain B6 mice bearing both CD45.1 and CD45.2 markers, respectively, and the resulting strain with co-dominant expression of both CD45 alleles is referred to as B6.1.2. All of these strains were subsequently maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). Six to 12 week-old mice were used for all phenotypic analyses. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved the experimental procedures.

Flow cytometry.

Spleens were minced and treated with collagenase (1 mg mL⁻¹ in PBS, Type V from *Clostridium histolyticum*, Sigma Aldrich) for 15 min at 37°C and passed through a 70 μM cell strainer (BD Biosciences) to yield single-cell suspensions prior to a red blood cells lysis with NH₄Cl solution. Cell suspensions were labelled with antibodies to; CD11c (clone N418, Biolegend), CD11b (clone M1/70, Biolegend), CD8α (clone 53-6.7, Biolegend), Zombie Aqua

viability dye (Biolegend), CD45.1 (clone A20, Biolegend), CD45.2 (clone 104, Biolegend), CD47 (clone miap301, BD), SIRP- α (clone P84, Biolegend) and CD24 (clone M1/69, Biolegend). For BIM intracellular staining, cell surface labeling is followed by an intracellular staining with antibodies to BIM (clone C34C5, Cell signaling) diluted in 1X PBS supplemented with 2% fetal calf serum, 10nM sodium azide and 0.03% saponin for 45 min at room temperature [302]. All samples were acquired using BD LSRII (BD Biosciences) or Fortessa (BD Biosciences) and were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR). The gating strategy to select mcDC is based on our previous work and that of others [193, 195]. Additionally, we verified that CD8 α^+ cDC precursors did not influence variations in mcDC proportion (Supplementary figure 3).

In vitro survival assay.

Spleen single cell suspensions of B6.1 and B6.*Bim*^{-/-} (CD45.2⁺) mice were pooled to and labelled with antibodies to; CD45.1, CD45.2, CD11c, CD11b and CD8 α . The mcDC were sorted on a FACS Aria and 0.25x10⁶ cells mL⁻¹ were placed in culture in complete RPMI media. Pooling the B6.1 and B6.*Bim*^{-/-} spleen cells prior to sorting allowed us to minimize experimental variability, as both B6 and B6.*Bim*^{-/-} cell suspensions are processed simultaneously. Specifically, this approach decreased the impact of sample processing and sorting times, both of which significantly influence cell viability. After 24h in culture, the cells were labeled for a combination of extracellular markers and Zombie Aqua viability dye (Biolegend), followed by Annexin-V-labeling (Biolegend) in its corresponding buffer (10mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1,8mM CaCl₂) prior to flow cytometry data acquisition and analysis.

Competitive bone marrow chimera.

Bone marrow cells from B6.1.2 and B6.*Bim*^{-/-} (CD45.2⁺) or B6.1.2 and B6 mice were mixed at a 1:1 ratio and 2x10⁶ total cells were injected intravenously into lethally irradiated (11Gy) B6.1 recipients. Eight weeks post-reconstitution, the spleens were analyzed for the contribution of the B6 and B6.*Bim*^{-/-} bone marrow to each cDC subset by flow cytometry.

Induction of BIM in vivo.

B6 and NOD mice were injected intraperitoneally with poly I:C (Sigma; 150µg per mice). After 18h, spleens were treated with collagenase and single cell suspensions were labeled with Zombie aqua viability dye (Biolegend), CD11c, CD8α, CD11b, CD69, and BIM.

Imaging.

DC subsets were sorted on a FACS Aria to isolate CD8α⁺ cDC (CD11c^{high}CD8α⁺CD11b⁻), CD11b⁺ cDC (CD11c^{high}CD8α⁻CD11b⁺), and mDC (CD11c^{high}CD8α⁻CD11b⁻CD24⁻). The purity for each subset was above 95%. Cells were immobilized on a slide (Fisher Scientific) by cytopsin at 1000 RPM, air dried, fixed in methanol and subjected to a Wright-Giemsa stain. Images were acquired on a Zeiss Imager Z2 at a 63x magnification in oil.

Statistics.

Significance was tested with a one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test for differences between more than 2 groups and a Student *t*-test was used when testing for significant

difference between 2 groups. A paired test was used for differences between two groups in the same condition.

1.6. Acknowledgments

The authors would like to thank Fany De Wilde and the animal house staff for curating the mouse colonies, Geneviève Chabot-Roy for technical support, Roxanne Collin for sharing her data on 129S mice, Dr. David Hildeman for helpful discussions and for sharing a detailed protocol for effective intracellular staining of BIM and Dr. Erin E. Hillhouse for editing the text and for providing a critical review of the manuscript. This project was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to SL (grant # 2014-06531). CA holds excellence scholarships from the University of Montreal, La Fondation Lucie Besner and from the Montreal Diabetes Research Center. SL holds a Senior Salary Award from les Fonds de recherche du Québec – Santé.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing financial interest in relation to the work described.

1.7. References

- [1] Y. Mullen, Development of the Nonobese Diabetic Mouse and Contribution of Animal Models for Understanding Type 1 Diabetes, *Pancreas* 46(4) (2017) 455-466.
- [2] J.C. Barrett, D.G. Clayton, P. Concannon, B. Akolkar, J.D. Cooper, H.A. Erlich, C. Julier, G. Morahan, J. Nerup, C. Nierras, V. Plagnol, F. Pociot, H. Schuilenburg, D.J. Smyth, H. Stevens, J.A. Todd, N.M. Walker, S.S. Rich, C. Type 1 Diabetes Genetics, Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes, *Nat Genet* 41(6) (2009) 703-7.
- [3] L.J. Smink, E.M. Helton, B.C. Healy, C.C. Cavnor, A.C. Lam, D. Flamez, O.S. Burren, Y. Wang, G.E. Dolman, D.B. Burdick, V.H. Everett, G. Glusman, D. Laneri, L. Rowen, H. Schuilenburg, N.M. Walker, J. Mychaleckyj, L.S. Wicker, D.L. Eizirik, J.A. Todd, N. Goodman, T1DBase, a community web-based resource for type 1 diabetes research, *Nucleic Acids Res* 33(Database issue) (2005) D544-9.
- [4] L.S. Wicker, J. Clark, H.I. Fraser, V.E. Garner, A. Gonzalez-Munoz, B. Healy, S. Howlett, K. Hunter, D. Rainbow, R.L. Rosa, L.J. Smink, J.A. Todd, L.B. Peterson, Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice, *J Autoimmun* 25 Suppl (2005) 29-33.
- [5] J.A. Pearson, F.S. Wong, L. Wen, The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes, *J Autoimmun* 66 (2016) 76-88.
- [6] J.P. Driver, D.V. Serreze, Y.G. Chen, Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease, *Semin Immunopathol* 33(1) (2011) 67-87.
- [7] D.B. Rainbow, C. Moule, H.I. Fraser, J. Clark, S.K. Howlett, O. Burren, M. Christensen, V. Moody, C.A. Steward, J.P. Mohammed, M.E. Fusakio, E.L. Masteller, E.B. Finger, J.P. Houchins, D. Naf, F. Koentgen, W.M. Ridgway, J.A. Todd, J.A. Bluestone, L.B. Peterson, J. Mattner, L.S. Wicker, Evidence that Cd101 Is an Autoimmune Diabetes Gene in Nonobese Diabetic Mice, *J Immunol* 187(1) (2011) 325-36.
- [8] G. Zekavat, R. Mozaffari, V.J. Arias, S.Y. Rostami, A. Badkerhanian, A.J. Tenner, K.E. Nichols, A. Najj, H. Noorchashm, A novel CD93 polymorphism in non-obese diabetic (NOD) and NZB/W F1 mice is linked to a CD4+ iNKT cell deficient state, *Immunogenetics* 62(6) (2010) 397-407.

- [9] E.E. Hamilton-Williams, D.V. Serreze, B. Charlton, E.A. Johnson, M.P. Marron, A. Mullbacher, R.M. Slattery, Transgenic rescue implicates beta2-microglobulin as a diabetes susceptibility gene in nonobese diabetic (NOD) mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20) (2001) 11533-8.
- [10] W.M. Ridgway, L.B. Peterson, J.A. Todd, D.B. Rainbow, B. Healy, O.S. Burren, L.S. Wicker, Gene-gene interactions in the NOD mouse model of type 1 diabetes, *Adv Immunol* 100 (2008) 151-75.
- [11] A. Lehuen, J. Diana, P. Zaccane, A. Cooke, Immune cell crosstalk in type 1 diabetes, *Nat Rev Immunol* 10(7) (2010) 501-13.
- [12] C. Audiger, M.J. Rahman, T.J. Yun, K.V. Tarbell, S. Lesage, The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance, *J Immunol* 198(6) (2017) 2223-2231.
- [13] R.M. Steinman, D. Hawiger, M.C. Nussenzweig, Tolerogenic dendritic cells, *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 685-711.
- [14] K. Shortman, S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development, *Nat Rev Immunol* 7(1) (2007) 19-30.
- [15] D. Dudziak, A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumpheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.W. Lee, C.G. Park, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo, *Science* 315(5808) (2007) 107-11.
- [16] S. Yamazaki, D. Dudziak, G.F. Heidkamp, C. Fiorese, A.J. Bonito, K. Inaba, M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, CD8⁺ CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells, *J Immunol* 181(10) (2008) 6923-33.
- [17] A. Jones, J. Bourque, L. Kuehm, A. Opejin, R.M. Teague, C. Gross, D. Hawiger, Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells, *Immunity* 45(5) (2016) 1066-1077.
- [18] D.A. Vignali, L.W. Collison, C.J. Workman, How regulatory T cells work, *Nat Rev Immunol* 8(7) (2008) 523-32.
- [19] R.A. Reboulet, C.M. Hennies, Z. Garcia, S. Nierkens, E.M. Janssen, Prolonged antigen storage endows myeloid dendritic cells with enhanced capacity to prime anti-tumor responses in tumor-bearing mice, *J Immunol* 185(6) (2010) 3337-47.

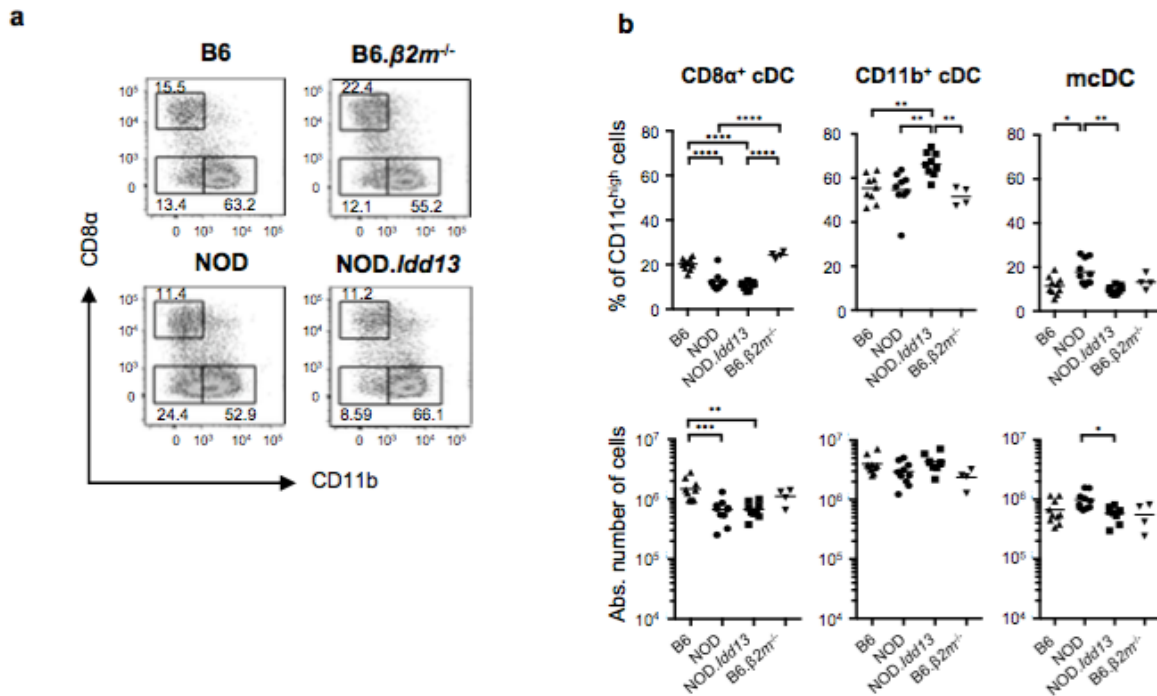
- [20] J.D. Katz, J.K. Ondr, R.J. Opoka, Z. Garcia, E.M. Janssen, Cutting edge: merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes, *J Immunol* 185(4) (2010) 1999-2003.
- [21] A.N. Pelletier, S. Lesage, The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility, *J Autoimmun* 43 (2013) 70-7.
- [22] D.V. Serreze, M. Prochazka, P.C. Reifsnyder, M.M. Bridgett, E.H. Leiter, Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene, *J Exp Med* 180(4) (1994) 1553-8.
- [23] D.V. Serreze, M. Bridgett, H.D. Chapman, E. Chen, S.D. Richard, E.H. Leiter, Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin, *J Immunol* 160(3) (1998) 1472-8.
- [24] A.M. Marleau, K.L. Summers, B. Singh, Differential Contributions of APC Subsets to T Cell Activation in Nonobese Diabetic Mice, *J Immunol* 180(8) (2008) 5235-49.
- [25] S.J. Prasad, C.C. Goodnow, Cell-intrinsic effects of non-MHC NOD genes on dendritic cell generation in vivo, *Int Immunol* 14(6) (2002) 677-84.
- [26] M. O'Keeffe, T.C. Brodnicki, B. Fancke, D. Vremec, G. Morahan, E. Maraskovsky, R. Steptoe, L.C. Harrison, K. Shortman, Fms-like tyrosine kinase 3 ligand administration overcomes a genetically determined dendritic cell deficiency in NOD mice and protects against diabetes development, *Int Immunol* 17(3) (2005) 307-14.
- [27] E.M. van Beek, F. Cochrane, A.N. Barclay, T.K. van den Berg, Signal regulatory proteins in the immune system, *J Immunol* 175(12) (2005) 7781-7.
- [28] V.Q. Van, S. Lesage, S. Bouguermouh, P. Gautier, M. Rubio, M. Levesque, S. Nguyen, L. Galibert, M. Sarfati, Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs, *EMBO J* 25(23) (2006) 5560-8.
- [29] Y. Saito, H. Iwamura, T. Kaneko, H. Ohnishi, Y. Murata, H. Okazawa, Y. Kanazawa, M. Sato-Hashimoto, H. Kobayashi, P.A. Oldenborg, M. Naito, Y. Kaneko, Y. Nojima, T. Matozaki, Regulation by SIRPalpha of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues, *Blood* 116(18) (2010) 3517-25.

- [30] A.S. Wong, S. Mortin-Toth, M. Sung, A.J. Canty, O. Gulban, D.R. Greaves, J.S. Danska, Polymorphism in the innate immune receptor SIRPalpha controls CD47 binding and autoimmunity in the nonobese diabetic mouse, *J Immunol* 193(10) (2014) 4833-44.
- [31] K. Takenaka, T.K. Prasolava, J.C. Wang, S.M. Mortin-Toth, S. Khalouei, O.I. Gan, J.E. Dick, J.S. Danska, Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells, *Nat Immunol* 8(12) (2007) 1313-23.
- [32] E.J. Brown, W.A. Frazier, Integrin-associated protein (CD47) and its ligands, *Trends Cell Biol* 11(3) (2001) 130-5.
- [33] A. Liston, S. Lesage, D.H. Gray, L.A. O'Reilly, A. Strasser, A.M. Fahrner, R.L. Boyd, J. Wilson, A.G. Baxter, E.M. Gallo, G.R. Crabtree, K. Peng, S.R. Wilson, C.C. Goodnow, Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim, *Immunity* 21(6) (2004) 817-30.
- [34] S. Zucchelli, P. Holler, T. Yamagata, M. Roy, C. Benoist, D. Mathis, Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics, *Immunity* 22(3) (2005) 385-96.
- [35] R.V. Sionov, S.A. Vlahopoulos, Z. Granot, Regulation of Bim in Health and Disease, *Oncotarget* 6(27) (2015) 23058-134.
- [36] A. Strasser, The role of BH3-only proteins in the immune system, *Nat Rev Immunol* 5(3) (2005) 189-200.
- [37] M. Chen, L. Huang, J. Wang, Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity, *Blood* 109(10) (2007) 4360-7.
- [38] E.M. Carrington, J.G. Zhang, R.M. Sutherland, I.B. Vikstrom, J.L. Brady, P. Soo, D. Vremec, C. Allison, E.F. Lee, W.D. Fairlie, P. Bouillet, S. Grabow, E. Ottina, M.J. Herold, M. Pellegrini, D.C. Huang, D.M. Tarlinton, A. Strasser, A.M. Lew, Y. Zhan, Prosurvival Bcl-2 family members reveal a distinct apoptotic identity between conventional and plasmacytoid dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(13) (2015) 4044-9.
- [39] P. Bouillet, J.F. Purton, D.I. Godfrey, L.C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J.M. Adams, A. Strasser, BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes, *Nature* 415(6874) (2002) 922-6.
- [40] T. Matozaki, Y. Murata, H. Okazawa, H. Ohnishi, Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway, *Trends Cell Biol* 19(2) (2009) 72-80.

- [41] S. Lesage, S.B. Hartley, S. Akkaraju, J. Wilson, M. Townsend, C.C. Goodnow, Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes, *J Exp Med* 196(9) (2002) 1175-88.
- [42] V.S. Marsden, A. Strasser, Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more, *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 71-105.
- [43] A. Shamas-Din, J. Kale, B. Leber, D.W. Andrews, Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4) (2013) a008714.
- [44] B. Krishnamurthy, J. Chee, G. Jhala, P. Trivedi, T. Catterall, C. Selck, E.N. Gurzov, T.C. Brodnicki, K.L. Graham, J.A. Wali, Y. Zhan, D. Gray, A. Strasser, J. Allison, H.E. Thomas, T.W. Kay, BIM Deficiency Protects NOD Mice From Diabetes by Diverting Thymocytes to Regulatory T Cells, *Diabetes* 64(9) (2015) 3229-38.
- [45] T.C. Nogueira, F.M. Paula, O. Villate, M.L. Colli, R.F. Moura, D.A. Cunha, L. Marselli, P. Marchetti, M. Cnop, C. Julier, D.L. Eizirik, GLIS3, a susceptibility gene for type 1 and type 2 diabetes, modulates pancreatic beta cell apoptosis via regulation of a splice variant of the BH3-only protein Bim, *PLoS Genet* 9(5) (2013) e1003532.
- [46] M.W. Ludwinski, J. Sun, B. Hilliard, S. Gong, F. Xue, R.J. Carmody, J. DeVirgiliis, Y.H. Chen, Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice, *J Clin Invest* 119(6) (2009) 1706-13.
- [47] A.T. Satpathy, X. Wu, J.C. Albring, K.M. Murphy, Re(de)fining the dendritic cell lineage, *Nat Immunol* 13(12) (2012) 1145-54.
- [48] K.P. Li, A. Fahrnich, E. Roy, C.M. Cuda, H.L. Grimes, H.R. Perlman, K. Kalies, D.A. Hildeman, Temporal Expression of Bim Limits the Development of Agonist-Selected Thymocytes and Skews Their TCRbeta Repertoire, *J Immunol* 198(1) (2017) 257-269.

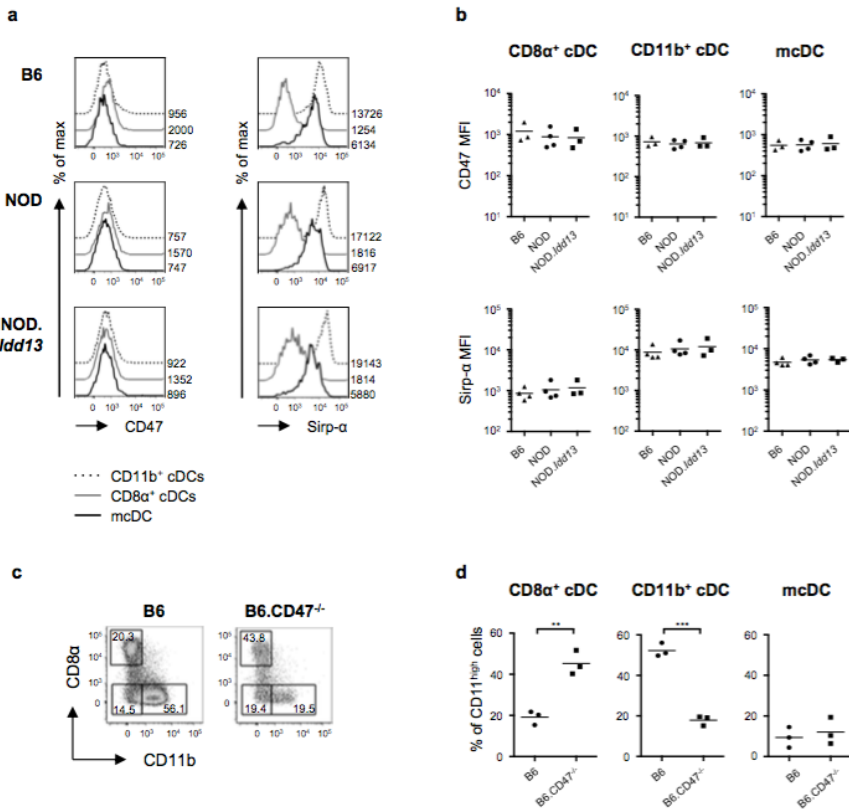
1.8. Figures

Figure 1. B2m does not determine mcDC proportion.



(a) Representative flow cytometry plots of CD8 α and CD11b expression on CD11c high cells from B6, NOD, NOD.*Idd13* and B6. $\beta 2m^{-/-}$ mice. The different DC subsets are gated as follows: CD8 α^+ cDC, CD8 α^+ CD11b $^-$; CD11b $^+$ cDC, CD8 α^- CD11b $^+$; mcDC, CD8 α^- CD11b $^-$. Numbers near the gates indicate the corresponding percentage of cells. **(b)** Compilation of percentages (top) and absolute numbers (bottom) of cDC subsets and mcDC in B6 (n=9), NOD (n=9), NOD.*Idd13* (n=9) and B6. $\beta 2m^{-/-}$ (n=4) mice. Each symbol represents one mouse. Dash represents the mean. The data was acquired in at least three independent experiments. *P* values, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001.

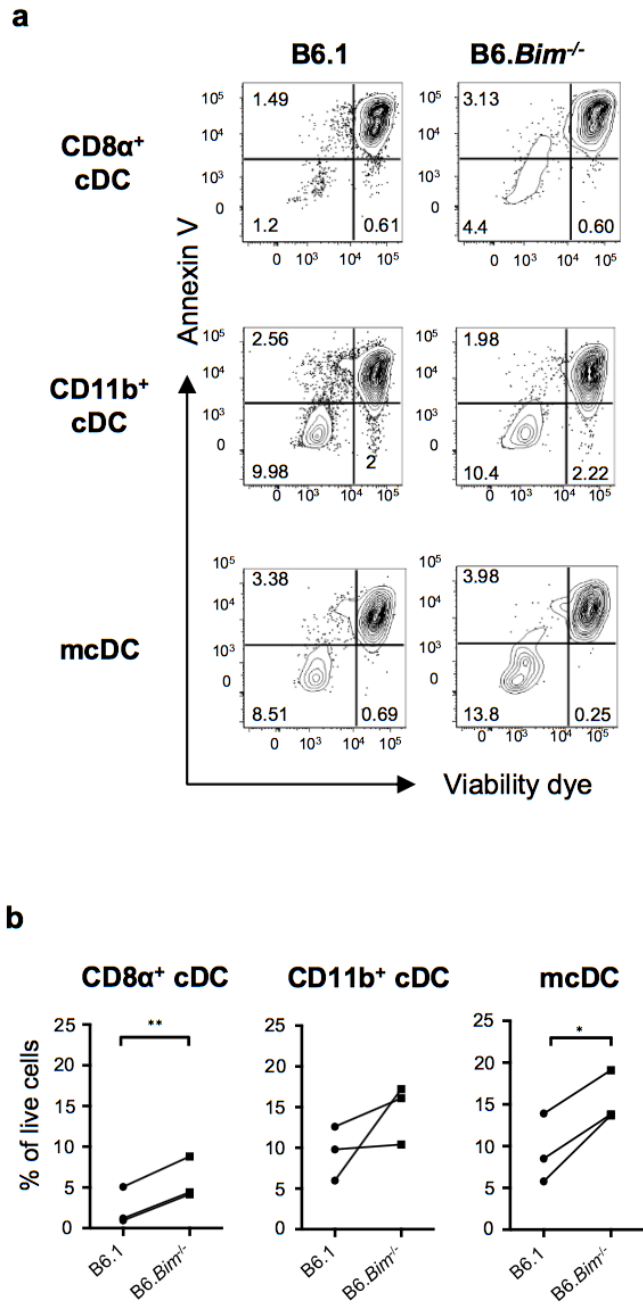
Figure 2. Sirpa unlikely defines mcDC proportion.



(a) Representative histograms of CD47 (left) or SIRP- α (right) expression for each DC subset (CD8 α^+ cDC, grey line; CD11b $^+$ cDC, dotted line; mcDC, black line), among CD11c^{high} spleen cells from B6, NOD and NOD.*Idd13* mice. Numbers near the histogram indicate the respective mean of fluorescence intensity

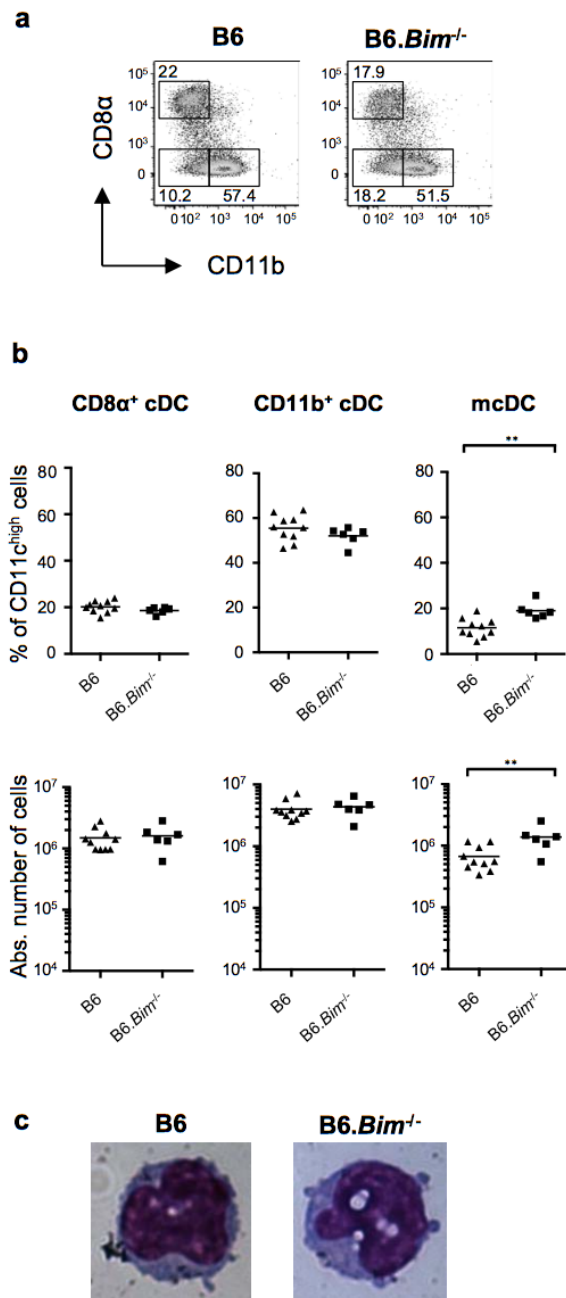
(MFI) for CD47 (left) or SIRP- α (right). **(b)** Compilation of CD47 (top) or SIRP- α (bottom) MFI on DC subsets is shown. Dash represents the mean of at least 3 mice per group. **(c)** Representative flow cytometry plots of CD8 α and CD11b expression on CD11c^{high} cells from B6 and B6.*CD47*^{-/-} mice. Numbers in the gates indicate the corresponding percentage of cells. **(d)** Compilation of percentages of cDC subsets and mcDC in B6 (n=3) and B6.*CD47*^{-/-} (n=3) mice. Each symbol represents data for one mouse. Dash represents the mean. The data was acquired in three independent experiments. *P* values, ** < 0.01, *** < 0.001.

Figure 3. Bim-deficiency confers a survival advantage to mcDC.



cDC subsets and mcDC were sorted from pooled spleen cell suspension of B6.1 (CD45.1) and B6.Bim^{-/-} (CD45.2) mice and cultured in vitro for 24h. **(a)** Representative flow cytometry plots of Annexin-V and viability dye expression for each DC subset (CD8α⁺CD11b⁻, CD8α⁺cDC; CD8α⁻CD11b⁺, CD11b⁺cDC and CD8α⁻CD11b⁻, mcDC) from B6.1 and B6.Bim^{-/-} mice after 24h of culture. Numbers in the quadrants indicate the percentage of cells. **(b)** Paired comparison of B6.1 and B6.Bim^{-/-} DC viability after 24h of co-culture. The percentage of live cells (negative for both Annexin V and viability dye) is quantified for CD8α⁺cDC, CD11b⁺cDC and mcDC. Each symbol represents one mouse. Data was acquired in three independent experiments. *P* value, * < 0.05, ** < 0.01.

Figure 4. B6.Bim^{-/-} mice exhibit an increase in the proportion and number of mcDC.

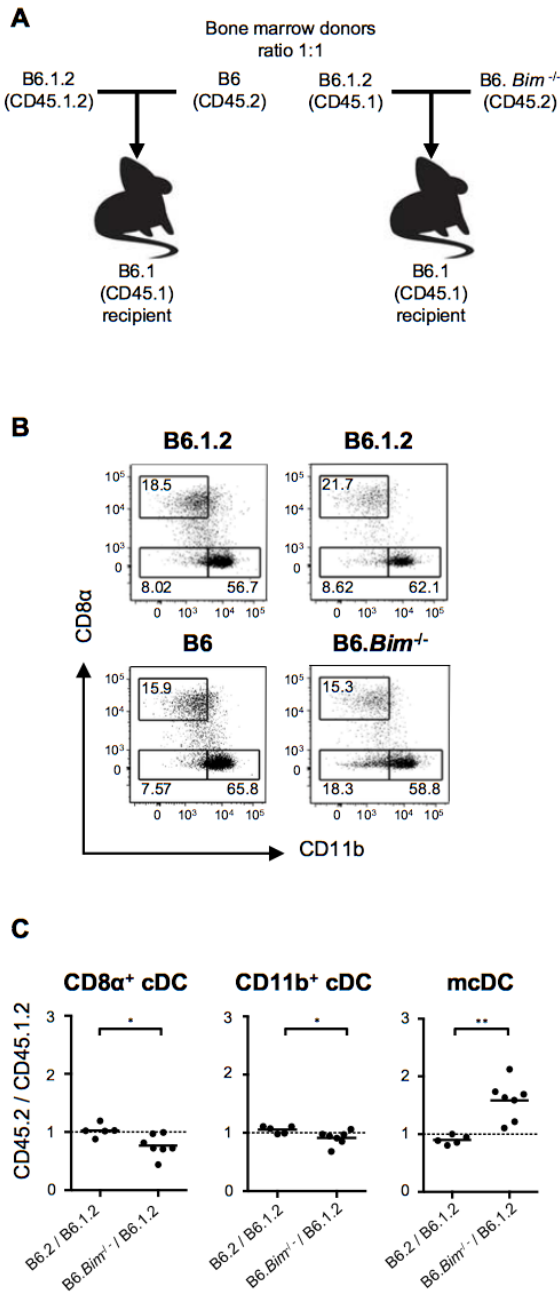


(a) Representative flow cytometry plots of CD8α and CD11b expression on CD11c^{high} cells from B6 and B6.Bim^{-/-} mice. Numbers near the gates indicate the corresponding percentage of cells.

(b) Compilation of percentages (top) and absolute numbers (bottom) of cDC and mcDC in B6 (n=10) and B6.Bim^{-/-} (n=6) mice. Each symbol represents data for one mouse. Dash represents the mean. The data was acquired in at least three independent experiments. *P* value, ** < 0.01.

(c) Giemsa-Wright staining of sorted mcDC (CD11c^{high}CD8α⁻CD11b⁻CD24⁻) observed at 63x in oil immersion.

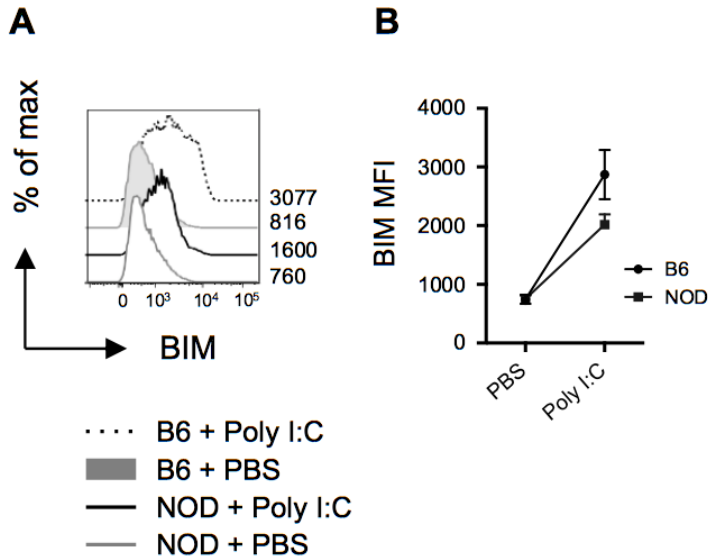
Figure 5. Bim regulates mcDC proportion in a bone marrow-intrinsic manner.



(a) Schematic representation of competitive bone marrow chimeras. Bone marrow isolated from B6.1.2 (CD45.1 and CD45.2) and B6 (CD45.2) mice or B6.1.2 (CD45.1 and CD45.2) and B6. *Bim*^{-/-} (CD45.2) mice were injected at a 1:1 ratio into a lethally irradiated B6.1 (CD45.1) mouse. DC reconstitution was analyzed in the spleen, 8 weeks post-injection.

(b) Representative flow cytometry plots of cDC and mcDC among CD11c^{high} spleen cells derived from B6.1.2, B6 or B6. *Bim*^{-/-} bone marrow. Numbers indicate the percentage of cells in each gate. (c) The ratio of cDC or mcDC differentiated from each donor bone marrow from at least 5 chimeric mice per group is shown. Each symbol represents one mouse. The dotted line represents a ratio of 1. *P* values, * < 0.05, ** < 0.01.

Figure 6. NOD cDC show a defect in BIM induction upon poly I:C activation.



(a) Representative histograms of BIM expression on spleen cDC from B6 and NOD mice, 18h after in vivo PBS (B6, filled grey histogram; NOD, grey line) or poly I:C injections (B6, dotted black line; NOD, thick black line). **(b)** Compilation of BIM expression on spleen cDC 18h after in vivo PBS (n=4 for both B6 and NOD mice) and poly I:C injections (n=9 for B6 mice and n=12 for NOD mice). Dots (B6) and square (NOD) represents the mean of BIM

Chapitre 4 : Discussion

1. Les mcDCs : un sous-type de cDCs qui brise la tolérance

Les cDCs sont des APCs ayant un fort potentiel dans l'induction ou la tolérisation d'une réponse immune [22]. Les cDCs sont séparées en deux groupes, les cDC1 et les cDC2. Cette famille regroupe différents sous-types ayant des phénotypes, localisations et fonctions différentes [34]. Jusqu'à la découverte des mcDCs, la présentation de peptides issus de cellules en apoptose était associée aux cDC1 et à l'induction de tolérance [16, 18, 193, 194]. Ces capacités particulières des mcDCs ont remis en questions les concepts liés à la présentation de peptides dérivés de corps apoptotiques et leurs effets sur la réponse immune. Pour caractériser ces nouveaux aspects dans les bris de tolérance, comprendre le lien des mcDCs avec les cDCs était donc important. Nous avons déterminé que les mcDCs étaient des cDCs en confirmant leur capacité à induire une réponse allogénique ainsi que par la mise en évidence du facteur de transcription spécifique aux cDCs, *Zbtb46*. Les mcDCs ont une courte demi-vie et se différencient à partir des précurseurs communs aux cDCs, les pré-cDCs. De plus, malgré leur similitude en termes de fonction, nous avons démontré que les mcDCs ne dépendaient pas des facteurs de transcriptions *Irf8* et *Batf3*, requis par les cDC1. Par contre, tout comme les cDC2, les mcDCs expriment IRF-4 et l'absence de *Irf4* affecte leur homéostasie. La proximité des mcDCs avec les cDC2 est cependant distincte en termes de métabolisme où les mcDCs et cDC2 ont des signatures différentes.

1.1.L'origine des mDCs

Les cDCs se différencient à partir de précurseurs issus de la moelle osseuse. Différents modèles sont proposés pour comprendre leur origine. Historiquement, les cDCs sont issues d'une voie myéloïde suite à la différenciation du CMP dans le lignage des cDCs [32]. Cependant, différentes études montrent que les cDCs peuvent aussi provenir de la voie lymphoïde via notamment la différenciation du CLP [106]. Récemment, ce modèle de différenciation linéaire a été remis en question par la mise en évidence d'un biais cDCs dès le stade HSPC [108]. Même si différents modèles sont proposés pour expliquer l'origine des cDCs, tous concordent avec la présence des pré-cDCs dans la moelle osseuse et la rate qui se différenciera en cDCs [303]. Les mDCs sont aussi capables d'être générées suite au transfert de pré-cDCs *in vivo* (Audiger et al., Figure 3, Chapitre 1, soumis à *J. Immunol.*). La différenciation des cDCs requiert aussi la cytokine FLT3L, importante pour la prolifération et la survie des précurseurs. Un traitement avec cette cytokine augmente notamment le nombre de pré-cDCs ainsi que le nombre de DCs *in vivo* [117-119]. Comme pour les cDC1 et les cDC2, les proportions et nombres absolus de mDCs sont aussi augmentés suite à un traitement au Flt3L [304]. Les mDCs sont donc sensibles au Flt3L et sont capables de se différencier à partir des pré-cDCs comme les cDC1 et cDC2.

Les pré-cDCs sont en réalité une population hétérogène de précurseurs. En effet, l'utilisation de sc-RNAseq a déterminé que les pré-cDCs de la moelle osseuse regroupent en réalité quatre sous-types de précurseurs [125]. Les pre-cDC1 et les pre-cDC2 ont un potentiel de différenciation préférentiel pour les cDC1 et les cDC2 respectivement tandis que les deux autres populations de pré-cDCs permettent une différenciation vers les cDC1 et les cDC2

[125]. Il serait donc intéressant de déterminer si un de ces quatre sous-types de pré-cDCs se différencie préférentiellement en mcDC suite à des transferts *in vivo* dans une souris receveuse. Comprendre le devenir d'une cellule souche à une cellule différenciée nécessite le développement d'outils pour favoriser l'exploration de ces voies de différenciation complexes. Pour déterminer l'ontogénie des mcDCs, l'utilisation d'une technologie de code-barre pourrait s'avérer pertinente. Cette technique consiste à marquer chaque cellule avec une étiquette spécifique via l'utilisation d'un lentivirus [107]. Dans le cas des mcDCs, il serait intéressant de marquer les pré-cDCs totales avec ces étiquettes puis de les mettre en culture pour générer des clones. Une fois amplifiée, la moitié des clones sera injectée *in vivo* et l'autre moitié sera utilisée pour déterminer la nature des précurseurs par RNA-seq ou CyToF par exemple. Les cDCs générées en périphérie seront caractérisées et reliées à leurs précurseurs grâce aux étiquettes spécifiques.

Les cDCs proviennent donc d'un précurseur de la moelle osseuse. Différents protocoles permettent de différencier des cDCs *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse. Étant donné le rôle majeur des cDCs dans l'initiation d'une réponse immune, de nombreuses stratégies de vaccination basées sur les DCs utilisent ces protocoles [305]. Ces techniques permettent de générer *in vitro*, rapidement et en grand nombre, des DCs que l'on peut ensuite maturer, ou non, et charger avec différents Ag, afin d'induire ou de tolérer respectivement, une réponse immune de façon Ag spécifique. Différents protocoles existent, que ce soit une culture de cellules de moelle avec du GM-CSF et de l'IL-4 ou avec du Flt3L [306-308]. Dans ces systèmes de culture, les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) présentent des phénotypes et des fonctions assez similaires aux équivalents identifiés *in vivo* [306, 308, 309]. Les fonctions particulières des mcDCs dans l'induction de bris de tolérance

Ag spécifique et leur capacité à reverser l'anergie des cellules T permettent d'envisager différentes approches en clinique, notamment dans des stratégies de vaccination anti-cancer. En différencier *in vitro*, selon ces protocoles établis, permettrait de tester leur potentiel thérapeutique. La culture de BMDC conduit à l'obtention d'une population de DCs hétérogènes [306-308]. Il serait intéressant de tester la fonction des différents sous-types de BMDC. Déterminer si, suite à leur culture avec des corps apoptotiques, une de ces populations est capable de produire de l'IFN de type I et de briser la tolérance suggéra que ce sous-type est un équivalent fonctionnel aux mcDCs spléniques. Si un équivalent *in vitro* est mis en évidence, cela ouvrira des perspectives quant à leurs applications sur des protocoles humains si ce type de cDCs était caractérisé chez l'Homme et notamment dans des cultures de différenciation de DCs à partir des précurseurs sanguins [310].

1.2. Exploration du phénotype des mcDCs

Les mcDCs sont un sous-type de cDCs n'exprimant le marqueur CD8a associées aux cDC1, ni CD11b associé aux cDC2 [193, 194]. L'absence de marqueurs exprimés spécifiquement par les mcDCs rend l'étude de ce sous-type compliquée. Pour déterminer un marqueur spécifique des mcDCs, différentes approches sont possibles. Il serait intéressant de cibler des voies propres aux mcDCs telles que la production d'IFN de type I suite à la détection de corps apoptotiques. Une autre solution serait d'explorer le transcriptome des mcDCs afin de mettre en évidence des gènes surexprimés spécifiquement dans cette population. Cependant, les mcDCs étant très hétérogènes en termes de phénotype (Annexe 1), il pourrait être préférable d'utiliser une technique de sc-RNAseq [42]. Dans ce cas, les cDCs spléniques pourraient être triées, et chaque cellule séquencée. Par analyses informatiques non

biaisées, les cellules ayant des similitudes en termes de transcriptome seront regroupées. Les clusters ayant peu de transcrits pour CD8 α et pour CD11b représenteraient possiblement les mcDCs et leurs signatures géniques seront comparées aux autres groupes de cDCs. Les gènes mis en évidence pourraient ensuite être validés au niveau protéique sur les mcDCs, par cytométrie en flux.

Une autre façon de caractériser une sous-population de cDCs est d'étudier les facteurs de transcription nécessaire à leur différenciation. Les cDC1 sont dépendantes des facteurs de transcription *Irf8* et *Batf3* [62, 69, 70]. Les cDC2 quant à elles expriment toutes le facteur de transcription IRF-4 [62, 134]. Cependant, en fonction du sous-type, elles seront dépendantes de facteurs de transcriptions spécifiques tels que *Notch* par exemple [62, 88]. Nous avons démontré que les mcDCs expriment le facteur de transcription IRF-4 (Audiger et al, Figure 5, Chapitre 1, soumis à *JImmunol*). De plus, nous avons déterminé qu'en absence de *Irf4*, les proportions de mcDCs sont diminuées, confirmant l'importance de IRF-4 dans leur régulation. IRF-4 est décrit comme étant important pour la différenciation des cDC2 CD4⁺ ainsi que dans la migration des cDC2 de la peau aux ganglions lymphatiques drainants [135]. L'absence d'*Irf4* dans les DCs CD11c⁺ conduit à une diminution, mais pas une absence totale des mcDCs (Audiger et al., Figure 5, Chapitre 1, soumis à *JImmunol*). Analyser les mcDCs présentes dans les ganglions lymphatiques drainants, en absence ou présence de l'expression de *Irf4*, devrait permettre de déterminer si *Irf4* est important pour leur migration ou leur différenciation. Pour finir, le sc-RNAseq permettrait de mettre en évidence d'autres facteurs de transcription, exprimés spécifiquement par les mcDCs, qui seront ensuite validés dans des modèles déficients pour cette protéine.

La mise en évidence des mcDCs n'a été faite à ce jour que dans la rate et les ganglions lymphatiques drainants périphériques et pancréatiques murins [193]. Les cDCs sont retrouvées dans tout l'organisme tel que dans la peau, l'épithélium intestinal ou le thymus par exemple, mais leur phénotype pourra être différent [34]. L'environnement influence le phénotype des cDCs. Par exemple, la signalisation via le récepteur au TGF- β (TGF β R1) est nécessaire pour la différenciation des cDC2 CD103⁺CD11b⁺ dans les intestins à partir des cellules CD103⁻CD11b⁺ [311]. De plus, le GM-CSF est important pour l'homéostasie des CD103⁺ et CD11b⁺ dans les tissus non lymphoïdes, tels que les reins, le foie ou les poumons [181]. La caractérisation d'un équivalent aux mcDCs dans les organes non lymphoïdes pourrait donc s'avérer difficile, voire impossible, sans signature distincte pour les caractériser. Cependant, la réalisation d'un sc-RNAseq comparant les cDCs de la rate versus les autres tissus permettrait d'observer un regroupement des mcDCs spléniques avec un sous-type présent dans les tissus non lymphoïdes et suggérer une origine similaire, qui devra ensuite être confirmée au niveau fonctionnel.

1.3.La phagocytose des corps apoptotiques par les mcDCs

Les mcDCs sont des APCs conventionnelles capables de présenter des peptides issus de corps apoptotiques [193, 194, 304]. La phagocytose de ces corps apoptotiques conduit à leur dégradation et à la génération de peptides antigéniques qui seront stockés dans des endosomes non acidifiés [194]. À l'inverse des cDC1, la présentation de peptide d'Ag dérivés de corps apoptotiques conduit à un bris de tolérance [193, 194]. L'efférocytose nécessite deux partenaires, le corps apoptotique et dans notre étude, la cDC.

Les corps apoptotiques peuvent agir directement sur les cDCs *via* la sécrétion de différentes molécules. Par exemple, la synthèse de PtdSer par les corps apoptotiques favorise leur phagocytose [312, 313]. De plus, les cellules apoptotiques produisent des signaux qui contribuent à favoriser une réponse anti-inflammatoire suite à la phagocytose, tels que la thrombospondine-1 (TSP-1) ou l'AMP. Ces molécules inhibent la production de cytokines inflammatoires par les cDCs [314, 315]. Les corps apoptotiques diffèrent donc les uns des autres en fonction des molécules qu'ils secrètent. Ils agiront différemment sur la maturation des cDCs et/ou les cytokines qu'elles produiront. Le mécanisme particulier des mcDCs tel que la production d'IFN de type I suite à la phagocytose de ces cellules en apoptose, en opposition aux profils tolérogéniques des cDC1 par exemple, pourrait être lié à leur reconnaissance de corps apoptotiques. Il serait possible que les cDC1 phagocytent des corps apoptotiques capables d'inhiber la production de cytokines inflammatoires tandis que les mcDCs reconnaîtraient des cellules apoptotiques présentant un autre profil en cytokines. Cependant, dans le cas des mcDCs, il semble peu probable que la source des corps apoptotiques soit la raison des fonctions différentes entre les mcDCs et les cDCs. En effet, dans les différentes études qui ont montré leur spécificité dans les bris de tolérance, les corps apoptotiques provenaient de la même source de cellules, par exemple une lignée tumorale irradiée [194]. Cela suggère donc que ce serait des mécanismes de reconnaissance, d'interaction avec les cellules apoptotiques et/ou de processing des Ag qui diffèrent entre les mcDCs et les cDCs, entraînant des finalités sur la réponse immune différente.

Une des raisons expliquant la tolérance induite suite à la présentation d'Ag dérivés de corps apoptotiques et la non-maturation des DCs [16, 316]. Les DCs immatures vont donc pouvoir présenter des peptides dérivés de cellules en apoptose en absence de signal de

costimulation aux LT. A l'état de base, les mcDC, cDC1 et cDC2 expriment des niveaux similaires de CD80, CD86, CD40 ainsi que le MHC-I et II [194]. Cependant, il serait intéressant de déterminer le profil de maturation des mcDCs suite à la mise en culture avec les corps apoptotiques et de vérifier si cette absence de maturation est retrouvée. En effet, si la non-maturation est associée à une tolérance immune, la maturation spécifique des mcDCs suite à une culture avec des cellules en apoptose pourrait expliquer l'induction de bris de tolérance et la sécrétion d'IFN de type I. Un autre mécanisme de contrôle de la maturation des APCs lors de la phagocytose de cellules en apoptose est l'inhibition de la réponse des TLRs par les corps apoptotiques [317, 318]. L'activation des TLRs est importante pour l'activation des voies de signalisation conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires [319]. Plus particulièrement, la signalisation via le TLR3 et le TLR4 initie la synthèse d'IFN de type I par, entre autres, l'expression d'IRF-3. L'IFN de type I est capable par rétroaction positive suite à son interaction sur son récepteur, d'augmenter la synthèse d'IFN par la cellule [319]. Cette rétroaction positive dans les pDCs, fortes productrices d'IFN de type I, est liée à leur expression plus élevée d'IRF-7 [320] tandis que la production par les cDC1 requiert IRF-8 [321]. Les mcDCs n'expriment pas IRF8, cela suggère qu'elles utiliseraient un autre mécanisme de rétroaction positif (Audiger et al., Figure 5, Chapitre 1, soumis à *J. Immunol*). La caractérisation de l'expression des TLRs en surface des mcDCs, avant et après cultures avec des corps apoptotiques, pourrait déterminer si la voie d'initiation de la production d'IFN de type I est différente de celles décrites pour les autres APCs. De plus, caractériser l'expression du récepteur à l'IFN de type I (IFNAR) ainsi que des facteurs de transcriptions IRF-3 et IRF-7, avant et après mises en cultures avec corps apoptotiques, déterminera si des

différences intrinsèques aux mcDCs peuvent expliquer leur capacité à produire de hauts niveaux d'IFN de type I, suite à la phagocytose des cellules apoptotiques.

Les mcDCs et les cDC1 sont capables de présenter de façon croisée des antigènes dérivés de corps apoptotiques [82, 193, 194]. Néanmoins, elles présentent des différences dans leurs mécanismes de stockages des peptides et dans l'induction ou non d'une réponse immune [194]. Comprendre comment les peptides présentés par les mcDCs sont générés en comparaison aux cDC1 pourrait mettre en évidence le mécanisme relié aux fonctions spécifiques des mcDCs. Le pH des endosomes a un rôle majeur dans la présentation croisée [240]. Il est décrit que le pH des cDC1 est spécifiquement contrôlé par la GTPase Rac2 qui permet la formation du complexe NOX2 au phagosome. Ce complexe permet la production de ROS au sein des phagosomes et prévient leur acidification, condition nécessaire pour la présentation-croisée [322]. De manière intéressante, les cellules apoptotiques sont capables de réduire la production de ROS ce qui à terme inhibera la réponse inflammatoire. Il est donc envisageable que les mcDCs suite à la détection d'un corps apoptotique continuent à produire de hauts niveaux de ROS conduisant notamment à l'activation des voies NF-kB impliquées dans la production d'IFN de type I. Cela expliquerait pourquoi les cDC1 et les mcDCs, mises en présence de la même source de corps apoptotiques, induisent une tolérance ou un bri de la tolérance de la réponse immune respectivement.

2. La famille Bcl-2 dans le contexte des DCs

Les cDCs ont un rôle majeur dans la tolérance immune. Le contrôle des proportions de cDCs est extrêmement important et régulé. Une augmentation ou une diminution de leur nombre pourra affecter de façon positive ou négative les mécanismes de tolérance immune [22]. Les mcDCs sont retrouvées en plus grand nombre chez la souris NOD, modèle de diabète auto-immun spontané, que chez les lignées de souris résistantes au diabète (C57BL/6) [193]. Une étude de notre laboratoire a validé que le locus *Idd13* du chromosome 2 était lié au contrôle du nombre de mcDC, suggérant donc que parmi les 400 gènes de ce locus, un ou plusieurs gènes pourraient avoir un rôle dans la régulation du nombre de mcDC [195]. Suite à cette étude immunogénétique, nous avons déterminé l'implication de différents gènes candidats, codés dans le locus *Idd13*, sur le contrôle de la proportion des mcDCs. En ciblant des gènes connus pour être polymorphiques entre la souris NOD et la souris C57BL/6, nous avons déterminé que le gène *Bim* régule les proportions de mcDCs. BIM est une molécule proapoptotique de la famille des BH3 (*Bcl-2 homology 3-only protein*) codée par le gène *Bcl2l11* (renommé *Bim* pour faciliter la lecture) [323]. En absence de *Bim*, les mcDCs ont un avantage de survie. De plus, leur nombre est augmenté dans la rate par rapport à une souris C57BL/6 et ceux de manière moelle osseuse intrinsèque. Cette étude démontre donc que *Bim* régule spécifiquement les mcDCs, mais pas les autres sous-types de cDCs [324]. Cela insiste donc sur le point que chaque sous-type de cDCs est différent en termes de phénotype, différenciation, fonction, mais aussi en terme d'homéostasie.

2.1. Les cDCs ont des mécanismes différents de survie

Différentes équipes, ainsi que notre laboratoire, ont démontré le rôle important des membres de la famille BCL-2 dans la survie des cDCs [203, 288, 325, 326]. La famille des bcl-2 molécules se divise en trois groupes, les molécules proapoptotiques ayant un domaine BH-3, les membres de la famille BAX/BAK, ainsi que les molécules anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Les BH-3 protéines regroupent au moins 8 membres, dont BIM, PUMA, BAD et NOXA. Ces protéines induisent, de façon directe ou indirecte, le complexe BAX/BAK entraînant l'apoptose suite à l'activation des caspases. En absence d'une situation de stress, les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (BCL-2, BCL-X, A1, MCL-1) sont associées aux molécules BAX/BAK afin d'empêcher leur interaction avec les BH-3 molécules [295, 327]. Nous avons démontré que *Bim* contrôle spécifiquement les proportions de mcDCs, mais pas les cDC1 ni cDC2 à l'état de base, suggérant que les différents sous-types de cDCs utilisent des mécanismes distincts pour réguler leur survie [324].

Les cDCs expriment de façon constitutive la protéine A1 ainsi que de hauts niveaux de Bcl-2, MCL-1 et Bcl-X [288, 328]. De façon surprenante, augmenter la voie de Bcl-2 n'impacte que peu la survie des cDCs, tandis que l'inhibition de l'expression de A1 ou Mcl-1 diminue de façon importante leur survie, suggérant que Bcl-2 n'est pas une voie importante pour l'homéostasie des cDCs [288]. Il est connu que les cDC1 sont plus apoptotiques que les cDC2 [329]. De manière attendue, nous avons observé que les cDC1 expriment de plus hauts niveaux de BIM ainsi qu'une plus grande proportion de cellules caspase-3 positives, en comparaison aux cDC2 et mcDCs [324]. Les mcDCs, quant à elles, se distinguent des cDC2 par un pourcentage de cellules caspase-3 plus élevé (Annexe 2). Cependant, la majorité des études portant sur la survie des cDCs n'ont pas prise en considération la spécificité de chaque

sous-type de cDCs. Étant donné les différences de fonctions des sous-types de cDCs, comprendre leurs mécanismes de survies spécifiques est important.

Afin de déterminer la régulation spécifique de chaque sous-population de cDCs, une quantification par qPCR des transcrits ou protéique par cytométrie en flux, pourrait être réalisée. Une étude a montré, par immunobuvardage de type Western, aucune différence au niveau protéique de BCL-2, BCL -X, A1 et MCL-1 entre les cDC1 et cDC2 [288]. Cependant, les différents isoformes existant pour ces molécules n'ont pas été étudiés. Prendre en considération les isoformes des ces molécules anti-apoptotiques ainsi que des molécules pro-apoptotiques comme BIM, PUMA ou BAX et BAK pourraient permettre de mettre en évidence des différences dans les interactions des membres de la famille BCL-2, en fonction des sous-types de cDCs.

Les mécanismes de régulation de ces molécules sont complexes [327]. L'expression plus ou moins forte de ces molécules n'est pas le seul moyen de les réguler. En effet, la séquestration ou l'affinité d'interaction des partenaires, les modifications post-traductionnelles et post-transcriptionnelles sont autant de mécanismes décrits dans le contrôle de l'apoptose [295, 327]. Une solution pour explorer les voies d'apoptose requises spécifiquement pourrait être d'utiliser des modèles de souris déficientes. Des chimères hématopoïétiques reconstituées avec des moelles osseuses issues d'une souris déficiente pour tout les isoformes de A1 ou d'une souris haplo-insuffisante pour Mcl-1, présentent un défaut en cDCs [288, 330]. Il serait pertinent d'évaluer le nombre ainsi que le potentiel de survie *ex vivo* de chaque sous-type de cDCs dans ces modèles. De plus, l'inhibition de plusieurs voies de survie conduit à un effet cumulatif sur la survie des cDCs [328]. Il pourrait donc être intéressant de déterminer comment sont modulées les autres molécules pro et anti-apoptotiques dans ces souris en

fonction des sous-types de cDCs. De plus, élargir cette étude aux sous-types de cDCs dans différents tissus permettrait de comprendre la régulation des sous-populations de cDCs en fonction de leur environnement.

Les voies moléculaires contrôlant la survie des cDCs sont peu décrites dans la littérature. Cependant, le rôle des cytokines dans leur survie est bien connu même si les mécanismes reliés sont encore imprécis. Le GM-CSF associé au FLT3L par exemple sont important pour maintenir le nombre de cDCs *in vivo* notamment pour les cDCs du derme et dans les ganglions drainants de la peau [331]. De plus, la présence de GM-CSF réduit l'expression de BIM dans des cultures de BMDC *in vitro* [203]. À l'inverse, l'IL-10 est décrite comme cytokine favorisant la mort des cDCs *in vitro* via l'inhibition des molécules BCL-2 et BCL-xL [332]. Un autre exemple est le TGF- β , requis pour le développement des cellules de Langerhans, mais qui induit l'apoptose *in vivo* des DCs différenciées de monocytes dans des modèles de tumeurs [333, 334]. Le besoin en cytokines en fonction des tissus est donc important pour la génération de sous-types particuliers, notamment dans les intestins et dans la peau. Il est suggéré que ces cytokines sont nécessaires pour leur différenciation, mais on ne peut pas exclure leur implication dans les mécanismes de survie de ces dernières. L'impact des cytokines sur la survie des sous-types de cDCs, en fonction des tissus, est donc un aspect important à prendre en considération.

2.2. *Bim* régule spécifiquement les mcDCs

Nous avons démontré que *Bim* contrôle, de façon moelle osseuse intrinsèque, spécifiquement les proportions de mcDCs, mais pas les cDC1 ni cDC2 [324]. En absence de *Bim*, une accumulation en pourcentage ainsi qu'en nombre absolu de mcDCs est observable à

l'état de base. Cependant, le mécanisme par lequel *Bim* contrôle les mcDCs est encore inconnu.

Bim est hautement régulé [285]. La transcription de *Bim* peut être modulée par différents facteurs de transcription qui induiront ou réprimeront son expression. L'épigénétique, notamment des méthylations de certains de ces nucléotides, module son activité. De plus, différents épissages alternatifs génèrent différents isoformes de BIM, ayant des potentiels apoptotiques distincts. L'épissage alternatif conduit à la génération d'au moins 8 isoformes de BIM dont les 3 principaux sont la forme EL (extra-long), L (long) et S (short). La forme EL est la plus abondante, tandis que la forme S a un pouvoir apoptotique plus élevée [323, 335-337]. Nous avons exploré l'expression des 3 isoformes majeurs de BIM par immunobuvardage de type Western à l'état de base. Étant donné le faible nombre de mcDCs, les protéines issues de DCs CD11c⁺ totales ont été extraites. Nous n'avons pas observé de différences au niveau protéique des 3 isoformes entre les DCs isolées d'une souris C57BL/6 et NOD. Cependant, l'isoforme EL est l'isoforme majeur présent dans les DCs totales (résultats non présentés). Nous ne pouvons pas exclure que les autres isoformes de BIM ne sont pas absents dans les mcDCs. En effet, les isoformes de BIM sont très peu exprimées à l'état de base dans les DCs, particulièrement l'isoforme S. Leur expression augmente suite à une activation des TLRs ou de CD40 [203]. Cependant, nous avons démontré que les DCs isolées de la souris NOD ont un défaut dans l'induction de BIM suite à une stimulation au poly I:C en comparaison aux DCs isolées d'une C57BL/6 [324]. Néanmoins, déterminer si après stimulation un isoforme préférentiel de BIM augmente son expression dans les mcDCs pourrait mettre en évidence leur implication dans le contrôle de ce sous-type de cDCs. Des techniques de détection des ARNm

par cytométrie en flux, donc au niveau d'une cellule, pourraient être une bonne alternative au qPCR ou au RNA-seq [338].

BIM induit l'apoptose en interagissant, sous sa forme activée, avec les molécules anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (BCL-2, MCL-1, BCL-X, ect.) afin d'inhiber leur fonction et permettre l'activation de la voie Bax/Bak conduisant à l'apoptose [323, 339, 340]. En absence de *Bim*, nous n'avons pas observé de différences en pourcentage de mcDC exprimant la molécule apoptotique active caspase-3, ni en expression de la molécule anti-apoptotique BCL-2, en comparaison à une souris C57BL/6 (Annexe 3). La régulation de *Bim* peut se faire au niveau protéique, notamment par sa séquestration dans une forme inactive aux microtubules du cytosquelette [341], cependant cette voie ne semble pas agir dans les cellules hématopoïétiques où BIM sera plutôt séquestré au sein des mitochondries par les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 [342, 343]. Cela peut donc expliquer pourquoi aucune différence en Bcl-2 n'est observée en absence de *Bim* dans les mcDCs. BCL-2 est possiblement exprimée de la même façon, mais en présence de *Bim*, ils formeront un complexe, le rendant alors inactif. À l'inverse en absence de *Bim*, BCL-2 est libre et pourra alors empêcher l'activation de l'apoptose en interagissant avec d'autres molécules proapoptotiques. Déterminer comment BIM et BCL-2 interagissent dans les mcDCs d'une souris C57Bl/6 en comparaison à une souris NOD permettra de tester cette hypothèse. Étant donné le peu de mcDCs présentes dans une souris, il serait intéressant de réaliser des marquages de microscopie sur des mcDCs triées d'une rate de souris NOD et de souris C57BL/6. L'utilisation d'un marqueur du cytosquelette, comme la tubuline, et d'un marqueur de mitochondrie, tel que HIF-1, permettra de déterminer la localisation des molécules BIM et BCL-2. Si une colocalisation est observée entre BIM et BCL-2, cela suggèrera une

séquestration de BIM. Une confirmation par co-immunoprécipitation pourra alors être pertinente, même si cette technique est semi-quantitative. De plus, il serait intéressant de déterminer l'expression et la localisation d'autres molécules de la famille Bcl-2 telle que Mcl-1 et A1 connues pour être fortement exprimées dans les cDCs [328].

L'apoptose induite par BIM aboutit à l'activation en cascade des caspases dont la caspase-3 [336, 342, 344, 345]. Cependant, en absence de *Bim*, nous avons déterminé que le pourcentage de mcDC positives pour la forme active de la caspase-3 est similaire à celui des mcDCs isolées d'une souris C57BL/6 (Annexe 3). Cela suggère que *Bim* régule les mcDCs de façon caspase indépendante à l'état de base. L'apoptose induite, sans activation des caspases, est reliée à la libération de cytochrome c de la mitochondrie au cytosol. Cela entraîne une dépolarisation de la membrane et, à terme, la mort de la cellule. Différentes études ont démontré que BIM pouvait induire l'apoptose de façon caspase indépendante [340, 346, 347]. Il serait donc intéressant de déterminer les quantités de cytochrome c présent dans le cytosol des mcDCs en présence ou absence de *Bim*. Étant donné que le relargage du cytochrome c conduit à une dépolarisation de la membrane mitochondriale, l'utilisation de marqueur pour le potentiel de membrane tel que le mitsopy par cytométrie en flux ou de TMRM en microscopie permettrait de déterminer si en absence de *Bim*, les mitochondries sont plus fonctionnelles expliquant l'accumulation des mcDCs dans ces souris en comparaison à une souris C57BL/6.

Conclusion

Les mcDCs ont un rôle dans l'induction de bris de tolérance lors de la présentation d'Ag dérivés de corps apoptotiques, dépendant de leur capacité à produire de hauts niveaux d'IFN de type I. Ces propriétés sont spécifiques aux mcDC et ne sont pas retrouvées dans les cDC1 et cDC2.

En combinant différentes approches telles que la cytométrie multiparamétrique, l'utilisation de modèles de souris déficientes pour l'expression de gène d'intérêt, des techniques de déplétion des DCs, des parabioses et des approches d'immunogénétique, nous avons considérablement exploré les propriétés des mcDCs. Nous avons déterminé que les mcDCs sont un sous-type spécifique de cDCs. Elles présentent les mêmes propriétés en termes d'induction d'une réponse allogénique et sont générées à partir du pré-cDCs. De plus, elles expriment le facteur de transcription spécifique aux cDCs, *Zbtb46*. Nous avons démontré que les mcDCs sont un sous-type de cDCs qui exprime et dépend du facteur de transcription IRF-4, important pour les cDC2. Cependant, les mcDCs ont une signature métabolique distincte des cDC2, confirmant qu'elles représentent un sous-type à part des cDCs. L'utilisation d'une approche immunogénétique a permis de déterminer que la plus grande proportion de mcDCs retrouvée dans une souris NOD, modèle de T1D spontanée, était liée au locus *Idd13*. En prenant avantage de cette découverte, nous avons établi que les mcDCs étaient spécifiquement régulées par le gène pro-apoptotique *Bim* et ceux de façon moelle intrinsèque. En effet, en absence de *Bim*, les proportions et nombres absolus de mcDCs augmentent.

Une des grandes questions encore en suspens aujourd'hui est le rôle à l'état de base des mcDCs. En effet, les mcDCs sont capables de reverser l'anergie des cellules T induites dans un contexte tumoral. Dans ces conditions, leur rôle est bénéfique pour l'organisme, puisqu'elles permettent l'élimination des tumeurs et sont donc un avantage de survie. Cependant, en absence de cancer, les mcDCs ont aussi la capacité d'induire des bris de tolérance immune, mécanisme notamment impliqué dans le développement de maladies auto-immunes. Il est possible qu'en faible nombre, les mcDCs contrôlent la réponse antitumorale, mais présentes en plus grands nombres, cela augmenterait les chances d'induire une réponse autoréactive, chez un patient présentant une susceptibilité à l'auto-immunité. La régulation du nombre de cDCs est primordiale et une dérégulation est, dans différents modèles, associée au développement de pathologie auto-immune.

Définir les mcDCs en termes de cDCs et comprendre leur régulation sont des paramètres clés dans l'étude de cette population. Leur capacité à briser la tolérance, bénéfique dans des modèles de cancers et néfaste dans les maladies auto-immunes, en fait un sous-type de cDCs important dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques. À ce jour, les essais cliniques utilisant les cDCs ne sont que moyennement efficace. Cependant leur capacité à induire ou tolérer une réponse immune laisse envisager leur potentiel incroyable en thérapie cellulaire. Chaque sous-type de cDCs a des fonctions et des propriétés qui leur sont propres. Il est donc primordial de prendre en considération les spécificités de chaque sous-type afin d'induire spécifiquement le type de réponse immune requise.

Bibliographie

- [1] L. Du Pasquier, Origin and evolution of the vertebrate immune system, *APMIS* 100(5) (1992) 383-92.
- [2] M.F. Flajnik, A cold-blooded view of adaptive immunity, *Nat Rev Immunol* 18(7) (2018) 438-453.
- [3] M. Riera Romo, D. Perez-Martinez, C. Castillo Ferrer, Innate immunity in vertebrates: an overview, *Immunology* 148(2) (2016) 125-39.
- [4] A.H. Courtney, W.L. Lo, A. Weiss, TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation, *Trends Biochem Sci* 43(2) (2018) 108-123.
- [5] K. Kwak, M. Akkaya, S.K. Pierce, B cell signaling in context, *Nat Immunol* 20(8) (2019) 963-969.
- [6] J.C. Sun, S. Ugolini, E. Vivier, Immunological memory within the innate immune system, *EMBO J* 33(12) (2014) 1295-303.
- [7] K.D. Omilusik, A.W. Goldrath, Remembering to remember: T cell memory maintenance and plasticity, *Curr Opin Immunol* 58 (2019) 89-97.
- [8] T. Kurosaki, K. Kometani, W. Ise, Memory B cells, *Nat Rev Immunol* 15(3) (2015) 149-59.
- [9] A. Iwasaki, R. Medzhitov, Control of adaptive immunity by the innate immune system, *Nat Immunol* 16(4) (2015) 343-53.
- [10] T. Kambayashi, T.M. Laufer, Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?, *Nat Rev Immunol* 14(11) (2014) 719-30.
- [11] W.R. Heath, F.R. Carbone, Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance, *Nat Rev Immunol* 1(2) (2001) 126-34.
- [12] M.L. Kapsenberg, Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization, *Nat Rev Immunol* 3(12) (2003) 984-93.
- [13] M.P. Domogalla, P.V. Rostan, V.K. Raker, K. Steinbrink, Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity, *Front Immunol* 8 (2017) 1764.
- [14] S. Morioka, C. Maueroder, K.S. Ravichandran, Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology, *Immunity* 50(5) (2019) 1149-1162.

- [15] D.R. Green, T.H. Oguin, J. Martinez, The clearance of dying cells: table for two, *Cell Death Differ* 23(6) (2016) 915-26.
- [16] U. Trahtemberg, D. Mevorach, Apoptotic Cells Induced Signaling for Immune Homeostasis in Macrophages and Dendritic Cells, *Front Immunol* 8 (2017) 1356.
- [17] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo, *J Exp Med* 194(6) (2001) 769-79.
- [18] B. Sauter, M.L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, N. Bhardwaj, Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells, *J Exp Med* 191(3) (2000) 423-34.
- [19] F. Abdolmaleki, N. Farahani, S.M. Gheibi Hayat, M. Pirro, V. Bianconi, G.E. Barreto, A. Sahebkar, The Role of Efferocytosis in Autoimmune Diseases, *Front Immunol* 9 (2018) 1645.
- [20] T.A. Werfel, R.S. Cook, Efferocytosis in the tumor microenvironment, *Semin Immunopathol* 40(6) (2018) 545-554.
- [21] M. Suzanne, H. Steller, Shaping organisms with apoptosis, *Cell Death Differ* 20(5) (2013) 669-75.
- [22] R.M.J. Audiger C, Yun T.J, Tarbell V.K and Lesage S, The importance of dendritic cells in maintaining immune tolerance, *J Immunol* (198) (2017) 2223-2231.
- [23] B. Mastelic-Gavillet, K. Balint, C. Boudousquie, P.O. Gannon, L.E. Kandalaft, Personalized Dendritic Cell Vaccines-Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results, *Front Immunol* 10 (2019) 766.
- [24] S.C. Funes, A. Manrique de Lara, M.J. Altamirano-Lagos, J.P. Mackern-Oberti, J. Escobar-Vera, A.M. Kalergis, Immune checkpoints and the regulation of tolerogenicity in dendritic cells: Implications for autoimmunity and immunotherapy, *Autoimmun Rev* 18(4) (2019) 359-368.
- [25] R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution, *J Exp Med* 137(5) (1973) 1142-62.
- [26] R.M. Steinman, M.D. Witmer, Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(10) (1978) 5132-6.

- [27] M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, B. Gutchinov, Z.A. Cohn, Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes, *J Exp Med* 152(4) (1980) 1070-84.
- [28] R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro, *J Exp Med* 139(2) (1974) 380-97.
- [29] M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, J.C. Unkeless, M.D. Witmer, B. Gutchinov, Z.A. Cohn, Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes, *J Exp Med* 154(1) (1981) 168-87.
- [30] M. Crowley, K. Inaba, M. Witmer-Pack, R.M. Steinman, The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus, *Cell Immunol* 118(1) (1989) 108-25.
- [31] M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, M.D. Witmer, B. Gutchinov, A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(1) (1982) 161-5.
- [32] K. Liu, M.C. Nussenzweig, Origin and development of dendritic cells, *Immunol Rev* 234(1) (2010) 45-54.
- [33] K. Shortman, W.R. Heath, The CD8⁺ dendritic cell subset, *Immunol Rev* 234(1) (2010) 18-31.
- [34] C. Macri, E.S. Pang, T. Patton, M. O'Keeffe, Dendritic cell subsets, *Semin Cell Dev Biol* 84 (2018) 11-21.
- [35] K. Kabashima, T.A. Banks, K.M. Ansel, T.T. Lu, C.F. Ware, J.G. Cyster, Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells, *Immunity* 22(4) (2005) 439-50.
- [36] A.T. Kamath, J. Pooley, M.A. O'Keeffe, D. Vremec, Y. Zhan, A.M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D.F. Tough, K. Shortman, The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations, *The Journal of Immunology* 165(12) (2000) 6762-6770.
- [37] A.T. Kamath, S. Henri, F. Battye, D.F. Tough, K. Shortman, Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs, *Blood* 100(5) (2002) 1734-41.
- [38] K. Liu, C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh, M. Nussenzweig, Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice, *Nat Immunol* 8(6) (2007) 578-83.
- [39] P. Kamran, K.I. Sereti, P. Zhao, S.R. Ali, I.L. Weissman, R. Ardehali, Parabiosis in mice: a detailed protocol, *J Vis Exp* (80) (2013).

- [40] L.C. Bonifaz, D.P. Bonnyay, A. Charalambous, D.I. Darguste, S. Fujii, H. Soares, M.K. Brimnes, B. Moltedo, T.M. Moran, R.M. Steinman, In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination, *J Exp Med* 199(6) (2004) 815-24.
- [41] D. Dudziak, A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumpheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.W. Lee, C.G. Park, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig, Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo, *Science* 315(5808) (2007) 107-11.
- [42] P. See, J. Lum, J. Chen, F. Ginhoux, A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists, *Front Immunol* 9 (2018) 2425.
- [43] D.A. Jaitin, E. Kenigsberg, H. Keren-Shaul, N. Elefant, F. Paul, I. Zaretsky, A. Mildner, N. Cohen, S. Jung, A. Tanay, I. Amit, Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types, *Science* 343(6172) (2014) 776-9.
- [44] A.C. Villani, R. Satija, G. Reynolds, S. Sarkizova, K. Shekhar, J. Fletcher, M. Griesbeck, A. Butler, S. Zheng, S. Lazo, L. Jardine, D. Dixon, E. Stephenson, E. Nilsson, I. Grundberg, D. McDonald, A. Filby, W. Li, P.L. De Jager, O. Rozenblatt-Rosen, A.A. Lane, M. Haniffa, A. Regev, N. Hacohen, Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors, *Science* 356(6335) (2017).
- [45] R. Zilionis, C. Engblom, C. Pfirschke, V. Savova, D. Zemmour, H.D. Saatcioglu, I. Krishnan, G. Maroni, C.V. Meyerovitz, C.M. Kerwin, S. Choi, W.G. Richards, A. De Rienzo, D.G. Tenen, R. Bueno, E. Levantini, M.J. Pittet, A.M. Klein, Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species, *Immunity* 50(5) (2019) 1317-1334 e10.
- [46] M. Guilliams, C.A. Dutertre, C.L. Scott, N. McGovern, D. Sichien, S. Chakarov, S. Van Gassen, J. Chen, M. Poidinger, S. De Pijck, S.J. Tavernier, I. Low, S.E. Irac, C.N. Mattar, H.R. Sumatoh, G.H.L. Low, T.J.K. Chung, D.K.H. Chan, K.K. Tan, T.L.K. Hon, E. Fossum, B. Bogen, M. Choolani, J.K.Y. Chan, A. Larbi, H. Luche, S. Henri, Y. Saeys, E.W. Newell, B.N. Lambrecht, B. Malissen, F. Ginhoux, Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species, *Immunity* 45(3) (2016) 669-684.
- [47] M. Alcantara-Hernandez, R. Leylek, L.E. Wagar, E.G. Engleman, T. Keler, M.P. Marinkovich, M.M. Davis, G.P. Nolan, J. Idoyaga, High-Dimensional Phenotypic Mapping of

Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization, *Immunity* 47(6) (2017) 1037-1050 e6.

[48] D. Vremec, K. Shortman, Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes, *J Immunol* 159(2) (1997) 565-73.

[49] B.G. Dorner, M.B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Guttler, A. Hutloff, H.W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, R.S. Jack, V. Henn, R.A. Kroczeck, Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells, *Immunity* 31(5) (2009) 823-33.

[50] D. Sancho, D. Mourao-Sa, O.P. Joffre, O. Schulz, N.C. Rogers, D.J. Pennington, J.R. Carlyle, C. Reis e Sousa, Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin, *J Clin Invest* 118(6) (2008) 2098-110.

[51] C. Huysamen, J.A. Willment, K.M. Dennehy, G.D. Brown, CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes, *J Biol Chem* 283(24) (2008) 16693-701.

[52] L.S. Bursch, L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D.H. Kaplan, K.A. Hogquist, Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells, *J Exp Med* 204(13) (2007) 3147-56.

[53] F. Ginhoux, M.P. Collin, M. Bogunovic, M. Abel, M. Leboeuf, J. Helft, J. Ochando, A. Kissenpfennig, B. Malissen, M. Grisotto, H. Snoeck, G. Randolph, M. Merad, Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state, *J Exp Med* 204(13) (2007) 3133-46.

[54] L.F. Poulin, S. Henri, B. de Bovis, E. Devilard, A. Kissenpfennig, B. Malissen, The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells, *J Exp Med* 204(13) (2007) 3119-31.

[55] S. Vandenberghe, H. Hochrein, N. Mavaddat, K. Winkel, K. Shortman, Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations, *Blood* 97(6) (2001) 1733-41.

[56] M. Lindstedt, K. Lundberg, C.A. Borrebaeck, Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells, *J Immunol* 175(8) (2005) 4839-46.

- [57] A. Bachem, S. Guttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H.W. Mages, V. Henn, P.M. Kloetzel, S. Gurka, R.A. Kroczeck, Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells, *J Exp Med* 207(6) (2010) 1273-81.
- [58] K. Crozat, R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C.A. Dutertre, E. Ventre, T.P. Vu Manh, T. Baranek, A.K. Storset, J. Marvel, P. Boudinot, A. Hosmalin, I. Schwartz-Cornil, M. Dalod, The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells, *J Exp Med* 207(6) (2010) 1283-92.
- [59] I. Caminschi, A.I. Proietto, F. Ahmet, S. Kitsoulis, J. Shin Teh, J.C. Lo, A. Rizzitelli, L. Wu, D. Vremec, S.L. van Dommelen, I.K. Campbell, E. Maraskovsky, H. Braley, G.M. Davey, P. Mottram, N. van de Velde, K. Jensen, A.M. Lew, M.D. Wright, W.R. Heath, K. Shortman, M.H. Lahoud, The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement, *Blood* 112(8) (2008) 3264-73.
- [60] A. Dzionek, A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D.W. Buck, J. Schmitz, BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood, *J Immunol* 165(11) (2000) 6037-46.
- [61] M. Haniffa, A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, F. Ginhoux, Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells, *Immunity* 37(1) (2012) 60-73.
- [62] T. Tamura, P. Taylor, K. Yamaoka, H.J. Kong, H. Tsujimura, J.J. O'Shea, H. Singh, K. Ozato, IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity, *J Immunol* 174(5) (2005) 2573-81.
- [63] M. Mashayekhi, M.M. Sandau, I.R. Dunay, E.M. Frickel, A. Khan, R.S. Goldszmid, A. Sher, H.L. Ploegh, T.L. Murphy, L.D. Sibley, K.M. Murphy, CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites, *Immunity* 35(2) (2011) 249-59.
- [64] D.A. Vignali, V.K. Kuchroo, IL-12 family cytokines: immunological playmakers, *Nat Immunol* 13(8) (2012) 722-8.

- [65] M.J. Bevan, Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay, *J Exp Med* 143(5) (1976) 1283-8.
- [66] J.M. den Haan, S.M. Lehar, M.J. Bevan, CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo, *J Exp Med* 192(12) (2000) 1685-96.
- [67] P. Schnorrer, G.M. Behrens, N.S. Wilson, J.L. Pooley, C.M. Smith, D. El-Sukkari, G. Davey, F. Kupresanin, M. Li, E. Maraskovsky, G.T. Belz, F.R. Carbone, K. Shortman, W.R. Heath, J.A. Villadangos, The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(28) (2006) 10729-34.
- [68] A. Rizzitelli, E. Hawkins, H. Todd, P.D. Hodgkin, K. Shortman, The proliferative response of CD4 T cells to steady-state CD8+ dendritic cells is restricted by post-activation death, *Int Immunol* 18(3) (2006) 415-23.
- [69] K. Hildner, B.T. Edelson, W.E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B.U. Schraml, E.R. Unanue, M.S. Diamond, R.D. Schreiber, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity, *Science* 322(5904) (2008) 1097-100.
- [70] N. Torti, S.M. Walton, K.M. Murphy, A. Oxenius, Batf3 transcription factor-dependent DC subsets in murine CMV infection: differential impact on T-cell priming and memory inflation, *Eur J Immunol* 41(9) (2011) 2612-8.
- [71] D. Theisen, K. Murphy, The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation, *F1000Res* 6 (2017) 98.
- [72] Y.O. Alexandre, S. Ghilas, C. Sanchez, A. Le Bon, K. Crozat, M. Dalod, XCR1+ dendritic cells promote memory CD8+ T cell recall upon secondary infections with *Listeria monocytogenes* or certain viruses, *J Exp Med* 213(1) (2016) 75-92.
- [73] S. Iborra, M. Martinez-Lopez, S.C. Khouili, M. Enamorado, F.J. Cueto, R. Conde-Garrosa, C. Del Fresno, D. Sancho, Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1(+) Dendritic Cells, *Immunity* 45(4) (2016) 847-860.
- [74] R.A. Backer, N. Diener, B.E. Clausen, Langerin(+)CD8(+) Dendritic Cells in the Splenic Marginal Zone: Not So Marginal After All, *Front Immunol* 10 (2019) 741.

- [75] J. Idoyaga, N. Suda, K. Suda, C.G. Park, R.M. Steinman, Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8 α + dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(5) (2009) 1524-9.
- [76] C.H. Qiu, Y. Miyake, H. Kaise, H. Kitamura, O. Ohara, M. Tanaka, Novel subset of CD8 α + dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens, *J Immunol* 182(7) (2009) 4127-36.
- [77] S. Calabro, D. Liu, A. Gallman, M.S. Nascimento, Z. Yu, T.T. Zhang, P. Chen, B. Zhang, L. Xu, U. Gowthaman, J.K. Krishnaswamy, A.M. Haberman, A. Williams, S.C. Eisenbarth, Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity, *Cell Rep* 16(9) (2016) 2472-85.
- [78] M.Y. Gerner, W. Kastenmuller, I. Ifrim, J. Kabat, R.N. Germain, Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes, *Immunity* 37(2) (2012) 364-76.
- [79] R. Noubade, S. Majri-Morrison, K.V. Tarbell, Beyond cDC1: Emerging Roles of DC Crosstalk in Cancer Immunity, *Front Immunol* 10 (2019) 1014.
- [80] J.C. Cancel, K. Crozat, M. Dalod, R. Mattiuz, Are Conventional Type 1 Dendritic Cells Critical for Protective Antitumor Immunity and How?, *Front Immunol* 10 (2019) 9.
- [81] O. Schulz, C. Reis e Sousa, Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α + dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells, *Immunology* 107(2) (2002) 183-9.
- [82] T. Iyoda, S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R.M. Steinman, K. Inaba, The CD8+Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo, *The Journal of Experimental Medicine* 195(10) (2002) 1289-1302.
- [83] M.L. Albert, S.F. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, N. Bhardwaj, Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes, *J Exp Med* 188(7) (1998) 1359-68.
- [84] G.T. Belz, D. Vremec, M. Febbraio, L. Corcoran, K. Shortman, F.R. Carbone, W.R. Heath, CD36 is differentially expressed by CD8+ splenic dendritic cells but is not required for cross-presentation in vivo, *J Immunol* 168(12) (2002) 6066-70.

- [85] D. Sancho, O.P. Joffre, A.M. Keller, N.C. Rogers, D. Martinez, P. Hernanz-Falcon, I. Rosewell, C. Reis e Sousa, Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity, *Nature* 458(7240) (2009) 899-903.
- [86] M.A. Wallet, P. Sen, R.R. Flores, Y. Wang, Z. Yi, Y. Huang, C.E. Mathews, H.S. Earp, G. Matsushima, B. Wang, R. Tisch, MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance, *J Exp Med* 205(1) (2008) 219-32.
- [87] D. Vremec, J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, K. Shortman, CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen, *The Journal of Immunology* 164(6) (2000) 2978-2986.
- [88] K.L. Lewis, M.L. Caton, M. Bogunovic, M. Greter, L.T. Grajkowska, D. Ng, A. Klinakis, I.F. Charo, S. Jung, J.L. Gommerman, Ivanov, II, K. Liu, M. Merad, B. Reizis, Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine, *Immunity* 35(5) (2011) 780-91.
- [89] M.H. Lahoud, A.I. Proietto, K.H. Gartlan, S. Kitsoulis, J. Curtis, J. Wettenhall, M. Sofi, C. Daunt, M. O'Keeffe, I. Caminschi, K. Satterley, A. Rizzitelli, P. Schnorrer, A. Hinohara, Y. Yamaguchi, L. Wu, G. Smyth, E. Handman, K. Shortman, M.D. Wright, Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8⁺ dendritic cells, *J Immunol* 177(1) (2006) 372-82.
- [90] M. Bogunovic, F. Ginhoux, J. Helft, L. Shang, D. Hashimoto, M. Greter, K. Liu, C. Jakubzick, M.A. Ingersoll, M. Leboeuf, E.R. Stanley, M. Nussenzweig, S.A. Lira, G.J. Randolph, M. Merad, Origin of the lamina propria dendritic cell network, *Immunity* 31(3) (2009) 513-25.
- [91] A.T. Satpathy, C.G. Briseno, J.S. Lee, D. Ng, N.A. Manieri, W. Kc, X. Wu, S.R. Thomas, W.L. Lee, M. Turkoz, K.G. McDonald, M.M. Meredith, C. Song, C.J. Guidos, R.D. Newberry, W. Ouyang, T.L. Murphy, T.S. Stappenbeck, J.L. Gommerman, M.C. Nussenzweig, M. Colonna, R. Kopan, K.M. Murphy, Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens, *Nat Immunol* 14(9) (2013) 937-48.
- [92] K.P. MacDonald, D.J. Munster, G.J. Clark, A. Dzionek, J. Schmitz, D.N. Hart, Characterization of human blood dendritic cell subsets, *Blood* 100(13) (2002) 4512-20.

- [93] C.A. Lubber, J. Cox, H. Lauterbach, B. Fancke, M. Selbach, J. Tschopp, S. Akira, M. Wiegand, H. Hochrein, M. O'Keeffe, M. Mann, Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells, *Immunity* 32(2) (2010) 279-89.
- [94] M.A. Kinnebrew, C.G. Buffie, G.E. Diehl, L.A. Zenewicz, I. Leiner, T.M. Hohl, R.A. Flavell, D.R. Littman, E.G. Pamer, Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense, *Immunity* 36(2) (2012) 276-87.
- [95] H. Liu, F. Chen, W. Wu, A.T. Cao, X. Xue, S. Yao, H.L. Evans-Marin, Y.Q. Li, Y. Cong, TLR5 mediates CD172alpha(+) intestinal lamina propria dendritic cell induction of Th17 cells, *Sci Rep* 6 (2016) 22040.
- [96] T.L. Denning, Y.C. Wang, S.R. Patel, I.R. Williams, B. Pulendran, Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses, *Nat Immunol* 8(10) (2007) 1086-94.
- [97] A.D. Edwards, S.S. Diebold, E.M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, C. Reis e Sousa, Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines, *Eur J Immunol* 33(4) (2003) 827-33.
- [98] A.I. Proietto, M. O'Keeffe, K. Gartlan, M.D. Wright, K. Shortman, L. Wu, M.H. Lahoud, Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets, *Immunobiology* 209(1-2) (2004) 163-72.
- [99] M. Guillemins, F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, S. Yona, Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny, *Nat Rev Immunol* 14(8) (2014) 571-8.
- [100] B.U. Schraml, C. Reis e Sousa, Defining dendritic cells, *Curr Opin Immunol* 32 (2015) 13-20.
- [101] T.L. Murphy, G.E. Grajales-Reyes, X. Wu, R. Tussiwand, C.G. Briseno, A. Iwata, N.M. Kretzer, V. Durai, K.M. Murphy, Transcriptional Control of Dendritic Cell Development, *Annu Rev Immunol* 34 (2016) 93-119.
- [102] J. Adolfsson, R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C.T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O.J. Borge, L.A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson, S.E. Jacobsen, Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking

erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment, *Cell* 121(2) (2005) 295-306.

[103] S.H. Naik, P. Sathe, H.Y. Park, D. Metcalf, A.I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J.Y. Kwak, L. Wu, K. Shortman, Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo, *Nat Immunol* 8(11) (2007) 1217-26.

[104] N. Onai, K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amai, N. Toyama-Sorimachi, K. Matsushima, K. Inaba, T. Ohteki, A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential, *Immunity* 38(5) (2013) 943-57.

[105] N. Onai, A. Obata-Onai, M.A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, M.G. Manz, Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow, *Nat Immunol* 8(11) (2007) 1207-16.

[106] M.G. Manz, D. Traver, T. Miyamoto, I.L. Weissman, K. Akashi, Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors, *Blood* 97(11) (2001) 3333-41.

[107] S.H. Naik, L. Perie, E. Swart, C. Gerlach, N. van Rooij, R.J. de Boer, T.N. Schumacher, Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors, *Nature* 496(7444) (2013) 229-32.

[108] D.S. Lin, A. Kan, J. Gao, E.J. Crampin, P.D. Hodgkin, S.H. Naik, DiSNE Movie Visualization and Assessment of Clonal Kinetics Reveal Multiple Trajectories of Dendritic Cell Development, *Cell Rep* 22(10) (2018) 2557-2566.

[109] M.M. Meredith, K. Liu, G. Darrasse-Jeze, A.O. Kamphorst, H.A. Schreiber, P. Guermonprez, J. Idoyaga, C. Cheong, K.H. Yao, R.E. Niec, M.C. Nussenzweig, Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage, *J Exp Med* 209(6) (2012) 1153-65.

[110] A.T. Satpathy, W. Kc, J.C. Albring, B.T. Edelson, N.M. Kretzer, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages, *J Exp Med* 209(6) (2012) 1135-52.

[111] S. Carotta, A. Dakic, A. D'Amico, S.H. Pang, K.T. Greig, S.L. Nutt, L. Wu, The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner, *Immunity* 32(5) (2010) 628-41.

- [112] J. Back, D. Allman, S. Chan, P. Kastner, Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis, *Exp Hematol* 33(4) (2005) 395-402.
- [113] S.L. Nutt, D. Metcalf, A. D'Amico, M. Polli, L. Wu, Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors, *J Exp Med* 201(2) (2005) 221-31.
- [114] Y. Bakri, S. Sarrazin, U.P. Mayer, S. Tillmanns, C. Nerlov, A. Boned, M.H. Sieweke, Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate, *Blood* 105(7) (2005) 2707-16.
- [115] C. Nerlov, T. Graf, PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors, *Genes Dev* 12(15) (1998) 2403-12.
- [116] R.P. DeKoter, H. Singh, Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1, *Science* 288(5470) (2000) 1439-41.
- [117] A. D'Amico, L. Wu, The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3, *J Exp Med* 198(2) (2003) 293-303.
- [118] H. Karsunky, M. Merad, A. Cozzio, I.L. Weissman, M.G. Manz, Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo, *J Exp Med* 198(2) (2003) 305-13.
- [119] H.J. McKenna, K.L. Stocking, R.E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C.R. Maliszewski, D.H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E.R. Roux, M. Teepe, S.D. Lyman, J.J. Peschon, Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells, *Blood* 95(11) (2000) 3489-97.
- [120] C. Waskow, K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, M. Nussenzweig, The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues, *Nat Immunol* 9(6) (2008) 676-83.
- [121] F. Ginhoux, K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S.A. Lira, E.R. Stanley, M. Nussenzweig, M. Merad, The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs, *J Exp Med* 206(13) (2009) 3115-30.
- [122] V. Durai, P. Bagadia, C.G. Briseno, D.J. Theisen, A. Iwata, J.T.t. Davidson, M. Gargaro, D.H. Fremont, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Altered compensatory cytokine signaling underlies the discrepancy between Flt3^(-/-) and Flt3l^(-/-) mice, *J Exp Med* 215(5) (2018) 1417-1435.

- [123] M. Chopin, A.T. Lun, Y. Zhan, J. Schreuder, H. Coughlan, A. D'Amico, L.A. Mielke, F.F. Almeida, A.J. Kueh, R.A. Dickins, G.T. Belz, S.H. Naik, A.M. Lew, P. Bouillet, M.J. Herold, G.K. Smyth, L.M. Corcoran, S.L. Nutt, Transcription Factor PU.1 Promotes Conventional Dendritic Cell Identity and Function via Induction of Transcriptional Regulator DC-SCRIPT, *Immunity* 50(1) (2019) 77-90 e5.
- [124] D. Kurotaki, W. Kawase, H. Sasaki, J. Nakabayashi, A. Nishiyama, H.C. Morse, 3rd, K. Ozato, Y. Suzuki, T. Tamura, Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8 in mice, *Blood* 133(17) (2019) 1803-1813.
- [125] A. Schlitzer, V. Sivakamasundari, J. Chen, H.R. Sumatoh, J. Schreuder, J. Lum, B. Malleret, S. Zhang, A. Larbi, F. Zolezzi, L. Renia, M. Poidinger, S. Naik, E.W. Newell, P. Robson, F. Ginhoux, Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow, *Nat Immunol* 16(7) (2015) 718-28.
- [126] G.E. Grajales-Reyes, A. Iwata, J. Albring, X. Wu, R. Tussiwand, W. Kc, N.M. Kretzer, C.G. Briseno, V. Durai, P. Bagadia, M. Halder, J. Schonheit, F. Rosenbauer, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8alpha(+) conventional DC clonogenic progenitor, *Nat Immunol* 16(7) (2015) 708-17.
- [127] S. Bedoui, S. Prato, J. Mintern, T. Gebhardt, Y. Zhan, A.M. Lew, W.R. Heath, J.A. Villadangos, E. Segura, Characterization of an immediate splenic precursor of CD8+ dendritic cells capable of inducing antiviral T cell responses, *J Immunol* 182(7) (2009) 4200-7.
- [128] L. Wu, A. D'Amico, H. Hochrein, M. O'Keeffe, K. Shortman, K. Lucas, Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors, *Blood* 98(12) (2001) 3376-82.
- [129] H. Yoshida, C.A. Lareau, R.N. Ramirez, S.A. Rose, B. Maier, A. Wroblewska, F. Desland, A. Chudnovskiy, A. Mortha, C. Dominguez, J. Tellier, E. Kim, D. Dwyer, S. Shinton, T. Nabekura, Y. Qi, B. Yu, M. Robinette, K.W. Kim, A. Wagers, A. Rhoads, S.L. Nutt, B.D. Brown, S. Mostafavi, J.D. Buenrostro, C. Benoist, P. Immunological Genome, The cis-Regulatory Atlas of the Mouse Immune System, *Cell* 176(4) (2019) 897-912 e20.
- [130] G. Schiavoni, F. Mattei, P. Sestili, P. Borghi, M. Venditti, H.C. Morse, 3rd, F. Belardelli, L. Gabriele, ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-

producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells, *J Exp Med* 196(11) (2002) 1415-25.

[131] G. Schiavoni, F. Mattei, P. Borghi, P. Sestili, M. Venditti, H.C. Morse, 3rd, F. Belardelli, L. Gabriele, ICSBP is critically involved in the normal development and trafficking of Langerhans cells and dermal dendritic cells, *Blood* 103(6) (2004) 2221-8.

[132] P. Tailor, T. Tamura, H.C. Morse, 3rd, K. Ozato, The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse, *Blood* 111(4) (2008) 1942-5.

[133] D. Sichien, C.L. Scott, L. Martens, M. Vanderkerken, S. Van Gassen, M. Plantinga, T. Joeris, S. De Prijck, L. Vanhoutte, M. Vanheerswyngheles, G. Van Isterdael, W. Toussaint, F.B. Madeira, K. Vergote, W.W. Agace, B.E. Clausen, H. Hammad, M. Dalod, Y. Saeys, B.N. Lambrecht, M. Guilliams, IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively, *Immunity* 45(3) (2016) 626-640.

[134] S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, I. Akitoyo, K. Yamamoto, T. Suematsu, M. Nakamura, K. Yui, A. Kumatori, Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8alpha⁻ dendritic cell development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(24) (2004) 8981-6.

[135] S. Bajana, K. Roach, S. Turner, J. Paul, S. Kovats, IRF4 promotes cutaneous dendritic cell migration to lymph nodes during homeostasis and inflammation, *J Immunol* 189(7) (2012) 3368-77.

[136] L. Burkly, C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L.A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate, D. Lo, Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells, *Nature* 373(6514) (1995) 531-6.

[137] L. Wu, A. D'Amico, K.D. Winkel, M. Suter, D. Lo, K. Shortman, RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha⁻ dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha⁺ dendritic cells, *Immunity* 9(6) (1998) 839-47.

[138] M.S. Hayden, A less-canonical, canonical NF-kappaB pathway in DCs, *Nat Immunol* 13(12) (2012) 1139-41.

[139] C.G. Briseno, M. Gargaro, V. Durai, J.T. Davidson, D.J. Theisen, D.A. Anderson, 3rd, D.V. Novack, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Deficiency of transcription factor RelB perturbs

myeloid and DC development by hematopoietic-extrinsic mechanisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(15) (2017) 3957-3962.

[140] M.L. Caton, M.R. Smith-Raska, B. Reizis, Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8(-) dendritic cells in the spleen, *Journal of Experimental Medicine* 204(7) (2007) 1653-1664.

[141] K. Lennert, W. Remmele, [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes], *Acta Haematol* 19(2) (1958) 99-113.

[142] F.P. Siegal, N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, Y.J. Liu, The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood, *Science* 284(5421) (1999) 1835-7.

[143] M. Cella, D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, M. Colonna, Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon, *Nat Med* 5(8) (1999) 919-23.

[144] C. Asselin-Paturel, A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, G. Trinchieri, Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology, *Nat Immunol* 2(12) (2001) 1144-50.

[145] P. Bjorck, Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice, *Blood* 98(13) (2001) 3520-6.

[146] H. Nakano, M. Yanagita, M.D. Gunn, CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells, *J Exp Med* 194(8) (2001) 1171-8.

[147] M. Colonna, G. Trinchieri, Y.J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nat Immunol* 5(12) (2004) 1219-26.

[148] A. Musumeci, K. Lutz, E. Winheim, A.B. Krug, What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity, *Front Immunol* 10 (2019) 1222.

[149] M. Swiecki, M. Colonna, The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells, *Nat Rev Immunol* 15(8) (2015) 471-85.

- [150] B. Reizis, A. Bunin, H.S. Ghosh, K.L. Lewis, V. Sisirak, Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions, *Annu Rev Immunol* 29 (2011) 163-83.
- [151] J. Zhang, A. Raper, N. Sugita, R. Hingorani, M. Salio, M.J. Palmowski, V. Cerundolo, P.R. Crocker, Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors, *Blood* 107(9) (2006) 3600-8.
- [152] A.L. Blasius, E. Giurisato, M. Cella, R.D. Schreiber, A.S. Shaw, M. Colonna, Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation, *J Immunol* 177(5) (2006) 3260-5.
- [153] R.J. Dress, C.A. Dutertre, A. Giladi, A. Schlitzer, I. Low, N.B. Shadan, A. Tay, J. Lum, M. Kairi, Y.Y. Hwang, E. Becht, Y. Cheng, M. Chevrier, A. Larbi, E.W. Newell, I. Amit, J. Chen, F. Ginhoux, Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D(+) lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage, *Nat Immunol* 20(7) (2019) 852-864.
- [154] T. Matsui, J.E. Connolly, M. Michnevitcz, D. Chaussabel, C.I. Yu, C. Glaser, S. Tindle, M. Pypaert, H. Freitas, B. Piqueras, J. Banchereau, A.K. Palucka, CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions, *J Immunol* 182(11) (2009) 6815-23.
- [155] S. Sozzani, W. Vermi, A. Del Prete, F. Facchetti, Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease, *Trends Immunol* 31(7) (2010) 270-7.
- [156] B. Cisse, M.L. Caton, M. Lehner, T. Maeda, S. Scheu, R. Locksley, D. Holmberg, C. Zweier, N.S. den Hollander, S.G. Kant, W. Holter, A. Rauch, Y. Zhuang, B. Reizis, Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development, *Cell* 135(1) (2008) 37-48.
- [157] M. Nagasawa, H. Schmidlin, M.G. Hazekamp, R. Schotte, B. Blom, Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B, *Eur J Immunol* 38(9) (2008) 2389-400.
- [158] D. Allman, M. Dalod, C. Asselin-Paturel, T. Delale, S.H. Robbins, G. Trinchieri, C.A. Biron, P. Kastner, S. Chan, Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation, *Blood* 108(13) (2006) 4025-34.
- [159] G. Penna, S. Sozzani, L. Adorini, Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells, *J Immunol* 167(4) (2001) 1862-6.

- [160] E. Umemoto, K. Otani, T. Ikeno, N. Verjan Garcia, H. Hayasaka, Z. Bai, M.H. Jang, T. Tanaka, T. Nagasawa, K. Ueda, M. Miyasaka, Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling, *J Immunol* 189(1) (2012) 191-9.
- [161] H. Hadeiba, K. Lahl, A. Edalati, C. Oderup, A. Habtezion, R. Pachynski, L. Nguyen, A. Ghodsi, S. Adler, E.C. Butcher, Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance, *Immunity* 36(3) (2012) 438-50.
- [162] M. Wendland, N. Czeloth, N. Mach, B. Malissen, E. Kremmer, O. Pabst, R. Forster, CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15) (2007) 6347-52.
- [163] A. Schlitzer, A.F. Heiseke, H. Einwachter, W. Reindl, M. Schiemann, C.P. Manta, P. See, J.H. Niess, T. Suter, F. Ginhoux, A.B. Krug, Tissue-specific differentiation of a circulating CCR9- pDC-like common dendritic cell precursor, *Blood* 119(25) (2012) 6063-71.
- [164] A. Schlitzer, J. Loschko, K. Mair, R. Vogelmann, L. Henkel, H. Einwachter, M. Schiemann, J.H. Niess, W. Reindl, A. Krug, Identification of CCR9- murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs, *Blood* 117(24) (2011) 6562-70.
- [165] H. Shigematsu, B. Reizis, H. Iwasaki, S. Mizuno, D. Hu, D. Traver, P. Leder, N. Sakaguchi, K. Akashi, Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin, *Immunity* 21(1) (2004) 43-53.
- [166] P.F. Rodrigues, L. Alberti-Servera, A. Eremin, G.E. Grajales-Reyes, R. Ivanek, R. Tussiwand, Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells, *Nat Immunol* 19(7) (2018) 711-722.
- [167] C. Jakubzick, E.L. Gautier, S.L. Gibbings, D.K. Sojka, A. Schlitzer, T.E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J.R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D.W. Riches, W.M. Yokoyama, F. Ginhoux, P.M. Henson, G.J. Randolph, Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes, *Immunity* 39(3) (2013) 599-610.
- [168] B. Leon, M. Lopez-Bravo, C. Ardavin, Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*, *Immunity* 26(4) (2007) 519-31.

- [169] N.V. Serbina, T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel, E.G. Pamer, TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection, *Immunity* 19(1) (2003) 59-70.
- [170] T.M. Hohl, A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack, E.G. Pamer, Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection, *Cell Host Microbe* 6(5) (2009) 470-81.
- [171] H. Nakano, K.L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D.N. Cook, T. Kakiuchi, M.D. Gunn, Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses, *Nat Immunol* 10(4) (2009) 394-402.
- [172] K.R. Siddiqui, S. Laffont, F. Powrie, E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis, *Immunity* 32(4) (2010) 557-67.
- [173] M. Kool, T. Soullie, M. van Nimwegen, M.A. Willart, F. Muskens, S. Jung, H.C. Hoogsteden, H. Hammad, B.N. Lambrecht, Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells, *J Exp Med* 205(4) (2008) 869-82.
- [174] E. Segura, M. Durand, S. Amigorena, Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells, *J Exp Med* 210(5) (2013) 1035-47.
- [175] S. Boulet, J.F. Daudelin, L. Odagiu, A.N. Pelletier, T.J. Yun, S. Lesage, C. Cheong, N. Labrecque, The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(30) (2019) 15150-15159.
- [176] C.G. Briseno, M. Haldar, N.M. Kretzer, X. Wu, D.J. Theisen, W. Kc, V. Durai, G.E. Grajales-Reyes, A. Iwata, P. Bagadia, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells, *Cell Rep* 15(11) (2016) 2462-74.
- [177] C. Cheong, I. Matos, J.H. Choi, D.B. Dandamudi, E. Shrestha, M.P. Longhi, K.L. Jeffrey, R.M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C.G. Park, R.M. Steinman, Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas, *Cell* 143(3) (2010) 416-29.

- [178] A. Wollenberg, S. Kraft, D. Hanau, T. Bieber, Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema, *J Invest Dermatol* 106(3) (1996) 446-53.
- [179] L.C. Zaba, J. Fuentes-Duculan, N.J. Eungdamrong, M.V. Abello, I. Novitskaya, K.C. Pierson, J. Gonzalez, J.G. Krueger, M.A. Lowes, Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells, *J Invest Dermatol* 129(1) (2009) 79-88.
- [180] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, S. Amigorena, Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation, *Immunity* 38(2) (2013) 336-48.
- [181] M. Greter, J. Helft, A. Chow, D. Hashimoto, A. Mortha, J. Agudo-Cantero, M. Bogunovic, E.L. Gautier, J. Miller, M. Leboeuf, G. Lu, C. Aloman, B.D. Brown, J.W. Pollard, H. Xiong, G.J. Randolph, J.E. Chipuk, P.S. Frenette, M. Merad, GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells, *Immunity* 36(6) (2012) 1031-46.
- [182] M. Williams, A. Mildner, S. Yona, Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes, *Immunity* 49(4) (2018) 595-613.
- [183] F. Ginhoux, S. Jung, Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis, *Nat Rev Immunol* 14(6) (2014) 392-404.
- [184] R.L. Terry, S.D. Miller, Molecular control of monocyte development, *Cell Immunol* 291(1-2) (2014) 16-21.
- [185] J. Hettinger, D.M. Richards, J. Hansson, M.M. Barra, A.C. Joschko, J. Krijgsveld, M. Feuerer, Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor, *Nat Immunol* 14(8) (2013) 821-30.
- [186] Z. Liu, Y. Gu, S. Chakarov, C. Bleriot, I. Kwok, X. Chen, A. Shin, W. Huang, R.J. Dress, C.A. Dutertre, A. Schlitzer, J. Chen, L.G. Ng, H. Wang, Z. Liu, B. Su, F. Ginhoux, Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells, *Cell* 178(6) (2019) 1509-1525 e19.
- [187] E.I. Zuniga, L.Y. Liou, L. Mack, M. Mendoza, M.B. Oldstone, Persistent virus infection inhibits type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells to facilitate opportunistic infections, *Cell Host Microbe* 4(4) (2008) 374-86.

- [188] M. Macal, Y. Jo, S. Dallari, A.Y. Chang, J. Dai, S. Swaminathan, E.J. Wehrens, P. Fitzgerald-Bocarsly, E.I. Zuniga, Self-Renewal and Toll-like Receptor Signaling Sustain Exhausted Plasmacytoid Dendritic Cells during Chronic Viral Infection, *Immunity* 48(4) (2018) 730-744 e5.
- [189] E.J. Wherry, T cell exhaustion, *Nature Immunology* 13(6) (2011) 492-499.
- [190] E. Segura, A.L. Albiston, I.P. Wicks, S.Y. Chai, J.A. Villadangos, Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(48) (2009) 20377-81.
- [191] S. Menezes, D. Melandri, G. Anselmi, T. Perchet, J. Loschko, J. Dubrot, R. Patel, E.L. Gautier, S. Hugues, M.P. Longhi, J.Y. Henry, S.A. Quezada, G. Lauvau, A.M. Lennon-Dumenil, E. Gutierrez-Martinez, A. Bessis, E. Gomez-Perdiguero, C.E. Jacome-Galarza, H. Garner, F. Geissmann, R. Golub, M.C. Nussenzweig, P. Guermonprez, The Heterogeneity of Ly6C(hi) Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS(+) Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells, *Immunity* 45(6) (2016) 1205-1218.
- [192] F. Ginhoux, F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubeau, X.M. Dai, E.R. Stanley, G.J. Randolph, M. Merad, Langerhans cells arise from monocytes in vivo, *Nat Immunol* 7(3) (2006) 265-73.
- [193] J.D. Katz, J.K. Ondr, R.J. Opoka, Z. Garcia, E.M. Janssen, Cutting edge: merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes, *J Immunol* 185(4) (2010) 1999-2003.
- [194] R.A. Reboulet, C.M. Hennies, Z. Garcia, S. Nierkens, E.M. Janssen, Prolonged antigen storage endows merocytic dendritic cells with enhanced capacity to prime anti-tumor responses in tumor-bearing mice, *J Immunol* 185(6) (2010) 3337-47.
- [195] A.N. Pelletier, S. Lesage, The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility, *J Autoimmun* 43 (2013) 70-7.
- [196] R.I. Thacker, E.M. Janssen, Cross-presentation of cell-associated antigens by mouse splenic dendritic cell populations, *Front Immunol* 3 (2012) 41.
- [197] T. Birnberg, L. Bar-On, A. Sapozhnikov, M.L. Caton, L. Cervantes-Barragan, D. Makia, R. Krauthgamer, O. Brenner, B. Ludewig, D. Brockschnieder, D. Riethmacher, B. Reizis, S.

Jung, Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome, *Immunity* 29(6) (2008) 986-97.

[198] C. Ohnmacht, A. Pullner, S.B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, D. Voehringer, Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity, *J Exp Med* 206(3) (2009) 549-59.

[199] R.P. Singh, S. Hasan, S. Sharma, S. Nagra, D.T. Yamaguchi, D.T. Wong, B.H. Hahn, A. Hossain, Th17 cells in inflammation and autoimmunity, *Autoimmun Rev* 13(12) (2014) 1174-81.

[200] J. Loschko, G.J. Rieke, H.A. Schreiber, M.M. Meredith, K.H. Yao, P. Guermonprez, M.C. Nussenzweig, Inducible targeting of cDCs and their subsets in vivo, *J Immunol Methods* 434 (2016) 32-8.

[201] M. O'Keeffe, T.C. Brodnicki, B. Fancke, D. Vremec, G. Morahan, E. Maraskovsky, R. Steptoe, L.C. Harrison, K. Shortman, Fms-like tyrosine kinase 3 ligand administration overcomes a genetically determined dendritic cell deficiency in NOD mice and protects against diabetes development, *Int Immunol* 17(3) (2005) 307-14.

[202] M. Chen, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Huang, H. Sandoval, Y.J. Liu, J. Wang, Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance, *Science* 311(5764) (2006) 1160-4.

[203] M. Chen, L. Huang, J. Wang, Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity, *Blood* 109(10) (2007) 4360-7.

[204] T. Brocker, M. Riedinger, K. Karjalainen, Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo, *J Exp Med* 185(3) (1997) 541-50.

[205] L. Guerri, I. Peguillet, Y. Geraldo, S. Nabti, V. Premel, O. Lantz, Analysis of APC types involved in CD4 tolerance and regulatory T cell generation using reaggregated thymic organ cultures, *J Immunol* 190(5) (2013) 2102-10.

[206] Z. Hu, J.N. Lancaster, C. Sasiponganan, L.I. Ehrlich, CCR4 promotes medullary entry and thymocyte-dendritic cell interactions required for central tolerance, *J Exp Med* 212(11) (2015) 1947-65.

- [207] D.F. Atibalentja, K.M. Murphy, E.R. Unanue, Functional redundancy between thymic CD8alpha+ and Sirpalpha+ conventional dendritic cells in presentation of blood-derived lysozyme by MHC class II proteins, *J Immunol* 186(3) (2011) 1421-31.
- [208] F.X. Hubert, S.A. Kinkel, G.M. Davey, B. Phipson, S.N. Mueller, A. Liston, A.I. Proietto, P.Z. Cannon, S. Forehan, G.K. Smyth, L. Wu, C.C. Goodnow, F.R. Carbone, H.S. Scott, W.R. Heath, Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance, *Blood* 118(9) (2011) 2462-72.
- [209] L. Ardouin, H. Luche, R. Chelbi, S. Carpentier, A. Shawket, F. Montanana Sanchis, C. Santa Maria, P. Grenot, Y. Alexandre, C. Gregoire, A. Fries, T.P. Vu Manh, S. Tamoutounour, K. Crozat, E. Tomasello, A. Jorquera, E. Fossum, B. Bogen, H. Azukizawa, M. Bajenoff, S. Henri, M. Dalod, B. Malissen, Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery, *Immunity* 45(2) (2016) 305-18.
- [210] E. Donskoy, I. Goldschneider, Two Developmentally Distinct Populations of Dendritic Cells Inhabit the Adult Mouse Thymus: Demonstration by Differential Importation of Hematogenous Precursors Under Steady State Conditions, *The Journal of Immunology* 170(7) (2003) 3514-3521.
- [211] R. Bonasio, M.L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A.H. Lichtman, U.H. von Andrian, Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus, *Nat Immunol* 7(10) (2006) 1092-100.
- [212] T. Baba, Y. Nakamoto, N. Mukaida, Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner, *J Immunol* 183(5) (2009) 3053-63.
- [213] A.I. Proietto, S. van Dommelen, L. Wu, The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes, *Immunol Cell Biol* 87(1) (2009) 39-45.
- [214] J.M. Coquet, J.C. Ribot, N. Babala, S. Middendorp, G. van der Horst, Y. Xiao, J.F. Neves, D. Fonseca-Pereira, H. Jacobs, D.J. Pennington, B. Silva-Santos, J. Borst, Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway, *J Exp Med* 210(4) (2013) 715-28.

- [215] A.I. Proietto, S. van Dommelen, P. Zhou, A. Rizzitelli, A. D'Amico, R.J. Steptoe, S.H. Naik, M.H. Lahoud, Y. Liu, P. Zheng, K. Shortman, L. Wu, Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50) (2008) 19869-74.
- [216] J.P. van Meerwijk, S. Marguerat, R.K. Lees, R.N. Germain, B.J. Fowlkes, H.R. MacDonald, Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire, *J Exp Med* 185(3) (1997) 377-83.
- [217] P.D. Hughes, G.T. Belz, K.A. Fortner, R.C. Budd, A. Strasser, P. Bouillet, Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity, *Immunity* 28(2) (2008) 197-205.
- [218] J. Hutcheson, J.C. Scatizzi, A.M. Siddiqui, G.K. Haines, 3rd, T. Wu, Q.Z. Li, L.S. Davis, C. Mohan, H. Perlman, Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity, *Immunity* 28(2) (2008) 206-17.
- [219] J. Oh, S.H. Kim, S. Ahn, C.E. Lee, Suppressors of cytokine signaling promote Fas-induced apoptosis through downregulation of NF-kappaB and mitochondrial Bfl-1 in leukemic T cells, *J Immunol* 189(12) (2012) 5561-71.
- [220] C.H. Lehmann, L. Heger, G.F. Heidkamp, A. Baranska, J.J. Luhr, A. Hoffmann, D. Dudziak, Direct Delivery of Antigens to Dendritic Cells via Antibodies Specific for Endocytic Receptors as a Promising Strategy for Future Therapies, *Vaccines (Basel)* 4(2) (2016).
- [221] K. Mahnke, M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S.L. Swain, M. Nussenzweig, R.M. Steinman, The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments, *J Cell Biol* 151(3) (2000) 673-84.
- [222] C.T. Mayer, L. Berod, T. Sparwasser, Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity, *Front Immunol* 3 (2012) 183.
- [223] G.E. Hammer, E.E. Turer, K.E. Taylor, C.J. Fang, R. Advincula, S. Oshima, J. Barrera, E.J. Huang, B. Hou, B.A. Malynn, B. Reizis, A. DeFranco, L.A. Criswell, M.C. Nakamura, A. Ma, Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis, *Nat Immunol* 12(12) (2011) 1184-93.
- [224] G.K. Lee, H.J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D.H. Munn, A.L. Mellor, Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division, *Immunology* 107(4) (2002) 452-60.

- [225] A.L. Mellor, D.H. Munn, IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism, *Nat Rev Immunol* 4(10) (2004) 762-74.
- [226] A. Jones, J. Bourque, L. Kuehm, A. Opejin, R.M. Teague, C. Gross, D. Hawiger, Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells, *Immunity* 45(5) (2016) 1066-1077.
- [227] S. Yamazaki, D. Dudziak, G.F. Heidkamp, C. Fiorese, A.J. Bonito, K. Inaba, M.C. Nussenzweig, R.M. Steinman, CD8+CD205+ Splenic Dendritic Cells Are Specialized to Induce Foxp3+ Regulatory T Cells, *The Journal of Immunology* 181(10) (2008) 6923-6933.
- [228] A. Schildknecht, S. Brauer, C. Brenner, K. Lahl, H. Schild, T. Sparwasser, H.C. Probst, M. van den Broek, FoxP3+ regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8+ T-cell tolerance induced by steady-state dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1) (2010) 199-203.
- [229] G. Darrasse-Jeze, S. Deroubaix, H. Mouquet, G.D. Victora, T. Eisenreich, K.H. Yao, R.F. Masilamani, M.L. Dustin, A. Rudensky, K. Liu, M.C. Nussenzweig, Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo, *J Exp Med* 206(9) (2009) 1853-62.
- [230] X. Huang, J. Yuang, A. Goddard, A. Foulis, R.F. James, A. Lernmark, R. Pujol-Borrell, A. Rabinovitch, N. Somoza, T.A. Stewart, Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes, *Diabetes* 44(6) (1995) 658-64.
- [231] J.A. Carrero, B. Calderon, F. Towfic, M.N. Artyomov, E.R. Unanue, Defining the transcriptional and cellular landscape of type 1 diabetes in the NOD mouse, *PLoS One* 8(3) (2013) e59701.
- [232] M.J. Rahman, G. Rahir, M.B. Dong, Y. Zhao, K.B. Rodrigues, C. Hotta-Iwamura, Y. Chen, A. Guerrero, K.V. Tarbell, Despite Increased Type 1 IFN, Autoimmune Nonobese Diabetic Mice Display Impaired Dendritic Cell Response to CpG and Decreased Nuclear Localization of IFN-Activated STAT1, *J Immunol* 196(5) (2016) 2031-40.
- [233] B. Poligone, D.J. Weaver, Jr., P. Sen, A.S. Baldwin, Jr., R. Tisch, Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function, *J Immunol* 168(1) (2002) 188-96.
- [234] D.J. Weaver, Jr., B. Poligone, T. Bui, U.M. Abdel-Motal, A.S. Baldwin, Jr., R. Tisch, Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF-kappa B regulation due to a hyperactive I kappa B kinase, *J Immunol* 167(3) (2001) 1461-8.

- [235] J.D. Price, N.M. Beauchamp, G. Rahir, Y. Zhao, C.C. Rieger, A.W. Lau-Kilby, K.V. Tarbell, CD8⁺ dendritic cell-mediated tolerance of autoreactive CD4⁺ T cells is deficient in NOD mice and can be corrected by blocking CD40L, *J Leukoc Biol* 95(2) (2014) 325-36.
- [236] G.M. Vaitaitis, M.H. Olmstead, D.M. Waid, J.R. Carter, D.H. Wagner, Jr., A CD40-targeted peptide controls and reverses type 1 diabetes in NOD mice, *Diabetologia* 57(11) (2014) 2366-73.
- [237] R.J. Steptoe, J.M. Ritchie, L.C. Harrison, Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice, *J Immunol* 168(10) (2002) 5032-41.
- [238] A.C. Vasquez, M. Feili-Hariri, R.J. Tan, P.A. Morel, Qualitative and quantitative abnormalities in splenic dendritic cell populations in NOD mice, *Clin Exp Immunol* 135(2) (2004) 209-18.
- [239] C.N. Lee, A.M. Lew, K. Shortman, L. Wu, NOD mice are functionally deficient in the capacity of cross-presentation, *Immunol Cell Biol* 93(6) (2015) 548-57.
- [240] O.P. Joffre, E. Segura, A. Savina, S. Amigorena, Cross-presentation by dendritic cells, *Nat Rev Immunol* 12(8) (2012) 557-69.
- [241] S.T. Ferris, J.A. Carrero, J.F. Mohan, B. Calderon, K.M. Murphy, E.R. Unanue, A minor subset of Batf3-dependent antigen-presenting cells in islets of Langerhans is essential for the development of autoimmune diabetes, *Immunity* 41(4) (2014) 657-69.
- [242] J.W. Han, H.F. Zheng, Y. Cui, L.D. Sun, D.Q. Ye, Z. Hu, J.H. Xu, Z.M. Cai, W. Huang, G.P. Zhao, H.F. Xie, H. Fang, Q.J. Lu, J.H. Xu, X.P. Li, Y.F. Pan, D.Q. Deng, F.Q. Zeng, Z.Z. Ye, X.Y. Zhang, Q.W. Wang, F. Hao, L. Ma, X.B. Zuo, F.S. Zhou, W.H. Du, Y.L. Cheng, J.Q. Yang, S.K. Shen, J. Li, Y.J. Sheng, X.X. Zuo, W.F. Zhu, F. Gao, P.L. Zhang, Q. Guo, B. Li, M. Gao, F.L. Xiao, C. Quan, C. Zhang, Z. Zhang, K.J. Zhu, Y. Li, D.Y. Hu, W.S. Lu, J.L. Huang, S.X. Liu, H. Li, Y.Q. Ren, Z.X. Wang, C.J. Yang, P.G. Wang, W.M. Zhou, Y.M. Lv, A.P. Zhang, S.Q. Zhang, D. Lin, Y. Li, H.Q. Low, M. Shen, Z.F. Zhai, Y. Wang, F.Y. Zhang, S. Yang, J.J. Liu, X.J. Zhang, Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus, *Nat Genet* 41(11) (2009) 1234-7.
- [243] V. Gateva, J.K. Sandling, G. Hom, K.E. Taylor, S.A. Chung, X. Sun, W. Ortmann, R. Kosoy, R.C. Ferreira, G. Nordmark, I. Gunnarsson, E. Svenungsson, L. Padyukov, G. Sturfelt,

A. Jonsen, A.A. Bengtsson, S. Rantapaa-Dahlqvist, E.C. Baechler, E.E. Brown, G.S. Alarcon, J.C. Edberg, R. Ramsey-Goldman, G. McGwin, Jr., J.D. Reveille, L.M. Vila, R.P. Kimberly, S. Manzi, M.A. Petri, A. Lee, P.K. Gregersen, M.F. Seldin, L. Ronnblom, L.A. Criswell, A.C. Syvanen, T.W. Behrens, R.R. Graham, A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus, *Nat Genet* 41(11) (2009) 1228-33.

[244] S.J. Kim, Y.R. Zou, J. Goldstein, B. Reizis, B. Diamond, Tolerogenic function of Blimp-1 in dendritic cells, *J Exp Med* 208(11) (2011) 2193-9.

[245] S.J. Kim, S. Schatzle, S.S. Ahmed, W. Haap, S.H. Jang, P.K. Gregersen, G. Georgiou, B. Diamond, Increased cathepsin S in Prdm1(-/-) dendritic cells alters the TFH cell repertoire and contributes to lupus, *Nat Immunol* 18(9) (2017) 1016-1024.

[246] S.J. Kim, P.K. Gregersen, B. Diamond, Regulation of dendritic cell activation by microRNA let-7c and BLIMP1, *J Clin Invest* 123(2) (2013) 823-33.

[247] M. Greter, F.L. Heppner, M.P. Lemos, B.M. Odermatt, N. Goebels, T. Laufer, R.J. Noelle, B. Becher, Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis, *Nat Med* 11(3) (2005) 328-34.

[248] B.D. Clarkson, A. Walker, M.G. Harris, A. Rayasam, M. Hsu, M. Sandor, Z. Fabry, CCR7 deficient inflammatory Dendritic Cells are retained in the Central Nervous System, *Sci Rep* 7 (2017) 42856.

[249] S.L. Bailey, B. Schreiner, E.J. McMahon, S.D. Miller, CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE, *Nat Immunol* 8(2) (2007) 172-80.

[250] C. Sie, T. Korn, M. Mitsdoerffer, Th17 cells in central nervous system autoimmunity, *Exp Neurol* 262 Pt A (2014) 18-27.

[251] M. Koyama, M. Cheong, K.A. Markey, K.H. Gartlan, R.D. Kuns, K.R. Locke, K.E. Lineburg, B.E. Teal, L. Leveque-El Mouttie, M.D. Bunting, S. Vuckovic, P. Zhang, M.W. Teng, A. Varelias, S.K. Tey, L.F. Wockner, C.R. Engwerda, M.J. Smyth, G.T. Belz, S.R. McColl, K.P. MacDonald, G.R. Hill, Donor colonic CD103+ dendritic cells determine the severity of acute graft-versus-host disease, *J Exp Med* 212(8) (2015) 1303-21.

[252] A. Liston, E.J. Carr, M.A. Linterman, Shaping Variation in the Human Immune System, *Trends Immunol* 37(10) (2016) 637-646.

- [253] D. White, M. Rabago-Smith, Genotype-phenotype associations and human eye color, *J Hum Genet* 56(1) (2011) 5-7.
- [254] Y. Kochi, Genetics of autoimmune diseases: perspectives from genome-wide association studies, *Int Immunol* 28(4) (2016) 155-61.
- [255] M. Roederer, L. Quaye, M. Mangino, M.H. Beddall, Y. Mahnke, P. Chattopadhyay, I. Tosi, L. Napolitano, M. Terranova Barberio, C. Menni, F. Villanova, P. Di Meglio, T.D. Spector, F.O. Nestle, The genetic architecture of the human immune system: a bioresource for autoimmunity and disease pathogenesis, *Cell* 161(2) (2015) 387-403.
- [256] W.J. Housley, S.D. Fernandez, K. Vera, S.R. Murikinati, J. Grutzendler, N. Cuerdon, L. Glick, P.L. De Jager, M. Mitrovic, C. Cotsapas, D.A. Hafler, Genetic variants associated with autoimmunity drive NFkappaB signaling and responses to inflammatory stimuli, *Sci Transl Med* 7(291) (2015) 291ra93.
- [257] G.L. Wojcik, M. Graff, K.K. Nishimura, R. Tao, J. Haessler, C.R. Gignoux, H.M. Highland, Y.M. Patel, E.P. Sorokin, C.L. Avery, G.M. Belbin, S.A. Bien, I. Cheng, S. Cullina, C.J. Hodonsky, Y. Hu, L.M. Huckins, J. Jeff, A.E. Justice, J.M. Kocarnik, U. Lim, B.M. Lin, Y. Lu, S.C. Nelson, S.L. Park, H. Poisner, M.H. Preuss, M.A. Richard, C. Schurmann, V.W. Setiawan, A. Sockell, K. Vahi, M. Verbanck, A. Vishnu, R.W. Walker, K.L. Young, N. Zubair, V. Acuna-Alonso, J.L. Ambite, K.C. Barnes, E. Boerwinkle, E.P. Bottinger, C.D. Bustamante, C. Caberto, S. Canizales-Quinteros, M.P. Conomos, E. Deelman, R. Do, K. Doheny, L. Fernandez-Rhodes, M. Fornage, B. Hailu, G. Heiss, B.M. Henn, L.A. Hindorff, R.D. Jackson, C.A. Laurie, C.C. Laurie, Y. Li, D.Y. Lin, A. Moreno-Estrada, G. Nadkarni, P.J. Norman, L.C. Pooler, A.P. Reiner, J. Romm, C. Sabatti, K. Sandoval, X. Sheng, E.A. Stahl, D.O. Stram, T.A. Thornton, C.L. Wassel, L.R. Wilkens, C.A. Winkler, S. Yoneyama, S. Buyske, C.A. Haiman, C. Kooperberg, L. Le Marchand, R.J.F. Loos, T.C. Matise, K.E. North, U. Peters, E.E. Kenny, C.S. Carlson, Genetic analyses of diverse populations improves discovery for complex traits, *Nature* 570(7762) (2019) 514-518.
- [258] J.A. Pearson, F.S. Wong, L. Wen, The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes, *J Autoimmun* 66 (2016) 76-88.
- [259] A.M. Magnuson, G.M. Thurber, R.H. Kohler, R. Weissleder, D. Mathis, C. Benoist, Population dynamics of islet-infiltrating cells in autoimmune diabetes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(5) (2015) 1511-6.

- [260] J.A. Carrero, S.T. Ferris, E.R. Unanue, Macrophages and dendritic cells in islets of Langerhans in diabetic autoimmunity: a lesson on cell interactions in a mini-organ, *Curr Opin Immunol* 43 (2016) 54-59.
- [261] B. Calderon, A. Suri, M.J. Miller, E.R. Unanue, Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(16) (2008) 6121-6.
- [262] J. Diana, Y. Simoni, L. Furio, L. Beaudoin, B. Agerberth, F. Barrat, A. Lehuen, Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes, *Nat Med* 19(1) (2013) 65-73.
- [263] J.P. Driver, D.V. Serreze, Y.G. Chen, Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease, *Semin Immunopathol* 33(1) (2011) 67-87.
- [264] J.C. Barrett, D.G. Clayton, P. Concannon, B. Akolkar, J.D. Cooper, H.A. Erlich, C. Julier, G. Morahan, J. Nerup, C. Nierras, V. Plagnol, F. Pociot, H. Schuilenburg, D.J. Smyth, H. Stevens, J.A. Todd, N.M. Walker, S.S. Rich, C. Type 1 Diabetes Genetics, Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes, *Nat Genet* 41(6) (2009) 703-7.
- [265] J.C. Barrett, S. Hansoul, D.L. Nicolae, J.H. Cho, R.H. Duerr, J.D. Rioux, S.R. Brant, M.S. Silverberg, K.D. Taylor, M.M. Barmada, A. Bitton, T. Dassopoulos, L.W. Datta, T. Green, A.M. Griffiths, E.O. Kistner, M.T. Murtha, M.D. Regueiro, J.I. Rotter, L.P. Schumm, A.H. Steinhart, S.R. Targan, R.J. Xavier, N.I.G. Consortium, C. Libioulle, C. Sandor, M. Lathrop, J. Belaiche, O. Dewit, I. Gut, S. Heath, D. Laukens, M. Mni, P. Rutgeerts, A. Van Gossum, D. Zelenika, D. Franchimont, J.P. Hugot, M. de Vos, S. Vermeire, E. Louis, I.B.D.C. Belgian-French, C. Wellcome Trust Case Control, L.R. Cardon, C.A. Anderson, H. Drummond, E. Nimmo, T. Ahmad, N.J. Prescott, C.M. Onnie, S.A. Fisher, J. Marchini, J. Ghorri, S. Bumpstead, R. Gwilliam, M. Tremelling, P. Deloukas, J. Mansfield, D. Jewell, J. Satsangi, C.G. Mathew, M. Parkes, M. Georges, M.J. Daly, Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease, *Nat Genet* 40(8) (2008) 955-62.
- [266] R. Quartey-Papafio, T. Lund, P. Chandler, J. Picard, P. Ozegbe, S. Day, P.R. Hutchings, L. O'Reilly, D. Kioussis, E. Simpson, et al., Aspartate at position 57 of nonobese diabetic I-

Ag7 beta-chain diminishes the spontaneous incidence of insulin-dependent diabetes mellitus, *J Immunol* 154(10) (1995) 5567-75.

[267] A. Suri, M.G. Levisetti, E.R. Unanue, Do the peptide-binding properties of diabetogenic class II molecules explain autoreactivity?, *Curr Opin Immunol* 20(1) (2008) 105-10.

[268] R. Collin, V. Dugas, A.N. Pelletier, G. Chabot-Roy, S. Lesage, The mouse *idd2* locus is linked to the proportion of immunoregulatory double-negative T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance, *J Immunol* 193(7) (2014) 3503-12.

[269] V. Dugas, A. Liston, E.E. Hillhouse, R. Collin, G. Chabot-Roy, A.N. Pelletier, C. Beauchamp, K. Hardy, S. Lesage, *Idd13* is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice, *Genes Immun* 15(2) (2014) 82-7.

[270] R. Collin, V. Dugas, G. Chabot-Roy, D. Salem, A. Zahn, J.M. Di Noia, J. Rauch, S. Lesage, Autoimmunity and antibody affinity maturation are modulated by genetic variants on mouse chromosome 12, *J Autoimmun* 58 (2015) 90-9.

[271] A.N. Pelletier, F. Guimont-Desrochers, M.P. Ashton, T.C. Brodnicki, S. Lesage, The size of the plasmacytoid dendritic cell compartment is a multigenic trait dominated by a locus on mouse chromosome 7, *J Immunol* 188(11) (2012) 5561-70.

[272] R. Collin, C. St-Pierre, L. Guilbault, V. Mullins-Dansereau, A. Policheni, F. Guimont-Desrochers, A.N. Pelletier, D.H. Gray, E. Drobetsky, C. Perreault, E.E. Hillhouse, S. Lesage, An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation, *J Immunol* 199(4) (2017) 1490-1504.

[273] D.V. Serreze, M. Bridgett, H.D. Chapman, E. Chen, S.D. Richard, E.H. Leiter, Subcongenic analysis of the *Idd13* locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin, *J Immunol* 160(3) (1998) 1472-8.

[274] E.E. Hamilton-Williams, D.V. Serreze, B. Charlton, E.A. Johnson, M.P. Marron, A. Mullbacher, R.M. Slattery, Transgenic rescue implicates beta2-microglobulin as a diabetes susceptibility gene in nonobese diabetic (NOD) mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20) (2001) 11533-8.

[275] A.M. Marleau, K.L. Summers, B. Singh, Differential Contributions of APC Subsets to T Cell Activation in Nonobese Diabetic Mice, *J Immunol* 180(8) (2008) 5235-49.

- [276] S.J. Prasad, C.C. Goodnow, Cell-intrinsic effects of non-MHC NOD genes on dendritic cell generation in vivo, *Int Immunol* 14(6) (2002) 677-84.
- [277] E.M. van Beek, F. Cochrane, A.N. Barclay, T.K. van den Berg, Signal regulatory proteins in the immune system, *J Immunol* 175(12) (2005) 7781-7.
- [278] V.Q. Van, S. Lesage, S. Bouguermouh, P. Gautier, M. Rubio, M. Levesque, S. Nguyen, L. Galibert, M. Sarfati, Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs, *EMBO J* 25(23) (2006) 5560-8.
- [279] Y. Saito, H. Iwamura, T. Kaneko, H. Ohnishi, Y. Murata, H. Okazawa, Y. Kanazawa, M. Sato-Hashimoto, H. Kobayashi, P.A. Oldenborg, M. Naito, Y. Kaneko, Y. Nojima, T. Matozaki, Regulation by SIRPalpha of dendritic cell homeostasis in lymphoid tissues, *Blood* 116(18) (2010) 3517-25.
- [280] A.S. Wong, S. Mortin-Toth, M. Sung, A.J. Canty, O. Gulban, D.R. Greaves, J.S. Danska, Polymorphism in the innate immune receptor SIRPalpha controls CD47 binding and autoimmunity in the nonobese diabetic mouse, *J Immunol* 193(10) (2014) 4833-44.
- [281] K. Takenaka, T.K. Prasolava, J.C. Wang, S.M. Mortin-Toth, S. Khalouei, O.I. Gan, J.E. Dick, J.S. Danska, Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells, *Nat Immunol* 8(12) (2007) 1313-23.
- [282] E.J. Brown, W.A. Frazier, Integrin-associated protein (CD47) and its ligands, *Trends Cell Biol* 11(3) (2001) 130-5.
- [283] A. Liston, S. Lesage, D.H. Gray, L.A. O'Reilly, A. Strasser, A.M. Fahrner, R.L. Boyd, J. Wilson, A.G. Baxter, E.M. Gallo, G.R. Crabtree, K. Peng, S.R. Wilson, C.C. Goodnow, Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim, *Immunity* 21(6) (2004) 817-30.
- [284] S. Zucchelli, P. Holler, T. Yamagata, M. Roy, C. Benoist, D. Mathis, Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics, *Immunity* 22(3) (2005) 385-96.
- [285] R.V. Sionov, S.A. Vlahopoulos, Z. Granot, Regulation of Bim in Health and Disease, *Oncotarget* 6(27) (2015) 23058-134.
- [286] A. Strasser, The role of BH3-only proteins in the immune system, *Nat Rev Immunol* 5(3) (2005) 189-200.
- [287] L.S. Wicker, J. Clark, H.I. Fraser, V.E. Garner, A. Gonzalez-Munoz, B. Healy, S. Howlett, K. Hunter, D. Rainbow, R.L. Rosa, L.J. Smink, J.A. Todd, L.B. Peterson, Type 1

diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice, *J Autoimmun* 25 Suppl (2005) 29-33.

[288] E.M. Carrington, J.G. Zhang, R.M. Sutherland, I.B. Vikstrom, J.L. Brady, P. Soo, D. Vremec, C. Allison, E.F. Lee, W.D. Fairlie, P. Bouillet, S. Grabow, E. Ottina, M.J. Herold, M. Pellegrini, D.C. Huang, D.M. Tarlinton, A. Strasser, A.M. Lew, Y. Zhan, Prosurvival Bcl-2 family members reveal a distinct apoptotic identity between conventional and plasmacytoid dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(13) (2015) 4044-9.

[289] P. Bouillet, J.F. Purton, D.I. Godfrey, L.C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J.M. Adams, A. Strasser, BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes, *Nature* 415(6874) (2002) 922-6.

[290] W.M. Ridgway, L.B. Peterson, J.A. Todd, D.B. Rainbow, B. Healy, O.S. Burren, L.S. Wicker, Gene-gene interactions in the NOD mouse model of type 1 diabetes, *Adv Immunol* 100 (2008) 151-75.

[291] A. Lehuen, J. Diana, P. Zaccane, A. Cooke, Immune cell crosstalk in type 1 diabetes, *Nat Rev Immunol* 10(7) (2010) 501-13.

[292] T. Matozaki, Y. Murata, H. Okazawa, H. Ohnishi, Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway, *Trends Cell Biol* 19(2) (2009) 72-80.

[293] S. Lesage, S.B. Hartley, S. Akkaraju, J. Wilson, M. Townsend, C.C. Goodnow, Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes, *J Exp Med* 196(9) (2002) 1175-88.

[294] V.S. Marsden, A. Strasser, Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more, *Annu Rev Immunol* 21 (2003) 71-105.

[295] A. Shamas-Din, J. Kale, B. Leber, D.W. Andrews, Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4) (2013) a008714.

[296] B. Krishnamurthy, J. Chee, G. Jhala, P. Trivedi, T. Catterall, C. Selck, E.N. Gurzov, T.C. Brodnicki, K.L. Graham, J.A. Wali, Y. Zhan, D. Gray, A. Strasser, J. Allison, H.E. Thomas, T.W. Kay, BIM Deficiency Protects NOD Mice From Diabetes by Diverting Thymocytes to Regulatory T Cells, *Diabetes* 64(9) (2015) 3229-38.

[297] T.C. Nogueira, F.M. Paula, O. Villate, M.L. Colli, R.F. Moura, D.A. Cunha, L. Marselli, P. Marchetti, M. Cnop, C. Julier, D.L. Eizirik, GLIS3, a susceptibility gene for type 1 and type

2 diabetes, modulates pancreatic beta cell apoptosis via regulation of a splice variant of the BH3-only protein Bim, *PLoS Genet* 9(5) (2013) e1003532.

[298] M.W. Ludwinski, J. Sun, B. Hilliard, S. Gong, F. Xue, R.J. Carmody, J. DeVirgiliis, Y.H. Chen, Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice, *J Clin Invest* 119(6) (2009) 1706-13.

[299] G. Zekavat, R. Mozaffari, V.J. Arias, S.Y. Rostami, A. Badkerhanian, A.J. Tenner, K.E. Nichols, A. Naji, H. Noorchashm, A novel CD93 polymorphism in non-obese diabetic (NOD) and NZB/W F1 mice is linked to a CD4+ iNKT cell deficient state, *Immunogenetics* 62(6) (2010) 397-407.

[300] A.T. Satpathy, X. Wu, J.C. Albring, K.M. Murphy, Re(de)fining the dendritic cell lineage, *Nat Immunol* 13(12) (2012) 1145-54.

[301] D.V. Serreze, M. Prochazka, P.C. Reifsnnyder, M.M. Bridgett, E.H. Leiter, Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene, *J Exp Med* 180(4) (1994) 1553-8.

[302] K.P. Li, A. Fahrnich, E. Roy, C.M. Cuda, H.L. Grimes, H.R. Perlman, K. Kalies, D.A. Hildeman, Temporal Expression of Bim Limits the Development of Agonist-Selected Thymocytes and Skews Their TCRbeta Repertoire, *J Immunol* 198(1) (2017) 257-269.

[303] M.P. Poltorak, B.U. Schraml, Fate mapping of dendritic cells, *Front Immunol* 6 (2015) 199.

[304] C.M. Hennies, R.A. Reboulet, Z. Garcia, S. Nierkens, M.C. Wolkers, E.M. Janssen, Selective expansion of merocytic dendritic cells and CD8DCs confers anti-tumour effect of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand treatment in vivo, *Clin Exp Immunol* 163(3) (2011) 381-91.

[305] R.L. Sabado, S. Balan, N. Bhardwaj, Dendritic cell-based immunotherapy, *Cell Res* 27(1) (2017) 74-95.

[306] S.H. Naik, A.I. Proietto, N.S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M.H. Lahoud, M. O'Keeffe, Q.x. Shao, W.f. Chen, J.A. Villadangos, K. Shortman, L. Wu, Cutting Edge: Generation of Splenic CD8+ and CD8- Dendritic Cell Equivalents in Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand Bone Marrow Cultures, *The Journal of Immunology* 174(11) (2005) 6592-6597.

[307] K. Inaba, M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, R.M. Steinman, Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures

supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *J Exp Med* 176(6) (1992) 1693-702.

[308] M.E. Kirkling, U. Cytlak, C.M. Lau, K.L. Lewis, A. Resteu, A. Khodadadi-Jamayran, C.W. Siebel, H. Salmon, M. Merad, A. Tsirigos, M. Collin, V. Bigley, B. Reizis, Notch Signaling Facilitates In Vitro Generation of Cross-Presenting Classical Dendritic Cells, *Cell Rep* 23(12) (2018) 3658-3672 e6.

[309] J. Helft, J. Bottcher, P. Chakravarty, S. Zelenay, J. Huotari, B.U. Schraml, D. Goubau, C. Reis e Sousa, GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells, *Immunity* 42(6) (2015) 1197-211.

[310] M. van Gulijk, F. Dammeijer, J. Aerts, H. Vroman, Combination Strategies to Optimize Efficacy of Dendritic Cell-Based Immunotherapy, *Front Immunol* 9 (2018) 2759.

[311] C.C. Bain, J. Montgomery, C.L. Scott, J.M. Kel, M.J.H. Girard-Madoux, L. Martens, T.F.P. Zangerle-Murray, J. Ober-Blobaum, D. Lindenbergh-Kortleve, J.N. Samsom, S. Henri, T. Lawrence, Y. Saeys, B. Malissen, M. Dalod, B.E. Clausen, A.M. Mowat, TGFbetaR signalling controls CD103(+)CD11b(+) dendritic cell development in the intestine, *Nat Commun* 8(1) (2017) 620.

[312] K. Asano, M. Miwa, K. Miwa, R. Hanayama, H. Nagase, S. Nagata, M. Tanaka, Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice, *J Exp Med* 200(4) (2004) 459-67.

[313] A. Bondanza, V.S. Zimmermann, P. Rovere-Querini, J. Turnay, I.E. Dumitriu, C.M. Stach, R.E. Voll, U.S. Gaipl, W. Bertling, E. Poschl, J.R. Kalden, A.A. Manfredi, M. Herrmann, Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo, *J Exp Med* 200(9) (2004) 1157-65.

[314] A. Krispin, Y. Bledi, M. Atallah, U. Trahtemberg, I. Verbovetski, E. Nahari, O. Zelig, M. Linial, D. Mevorach, Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states, *Blood* 108(10) (2006) 3580-9.

[315] H. Yamaguchi, T. Maruyama, Y. Urade, S. Nagata, Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells, *Elife* 3 (2014) e02172.

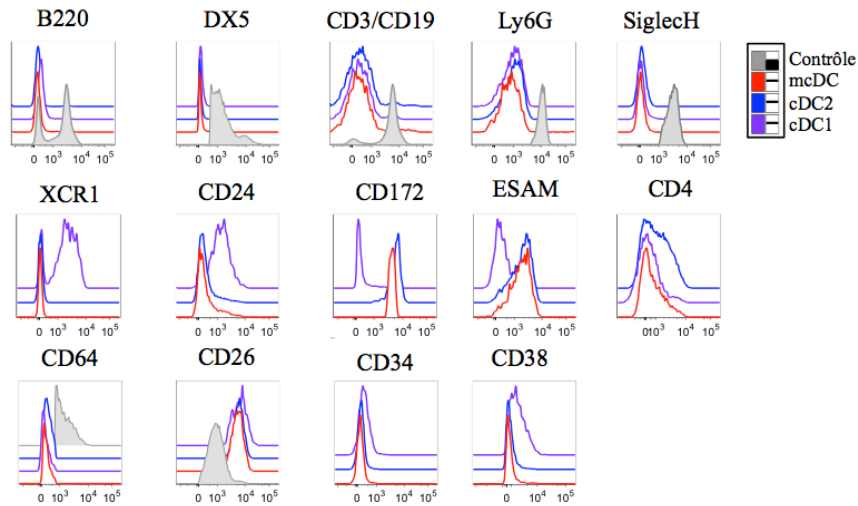
- [316] L.M. Stuart, M. Lucas, C. Simpson, J. Lamb, J. Savill, A. Lacy-Hulbert, Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation, *J Immunol* 168(4) (2002) 1627-35.
- [317] I. Tassioulas, K.H. Park-Min, Y. Hu, L. Kellerman, D. Mevorach, L.B. Ivashkiv, Apoptotic cells inhibit LPS-induced cytokine and chemokine production and IFN responses in macrophages, *Hum Immunol* 68(3) (2007) 156-64.
- [318] C.V. Rothlin, S. Ghosh, E.I. Zuniga, M.B. Oldstone, G. Lemke, TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response, *Cell* 131(6) (2007) 1124-36.
- [319] G. Trinchieri, Type I interferon: friend or foe?, *J Exp Med* 207(10) (2010) 2053-63.
- [320] J. Dai, N.J. Megjugorac, S.B. Amrute, P. Fitzgerald-Bocarsly, Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN-alpha production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells, *J Immunol* 173(3) (2004) 1535-48.
- [321] P. Taylor, T. Tamura, H.J. Kong, T. Kubota, M. Kubota, P. Borghi, L. Gabriele, K. Ozato, The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8, *Immunity* 27(2) (2007) 228-39.
- [322] A. Savina, A. Peres, I. Cebrian, N. Carmo, C. Moita, N. Hacohen, L.F. Moita, S. Amigorena, The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells, *Immunity* 30(4) (2009) 544-55.
- [323] L. O'Connor, A. Strasser, L.A. O'Reilly, G. Hausmann, J.M. Adams, S. Cory, D.C. Huang, Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis, *EMBO J* 17(2) (1998) 384-95.
- [324] C. Audiger, S. Lesage, BIM determines the number of merocytic dendritic cells, a cell type that breaks immune tolerance, *Immunol Cell Biol* 96(9) (2018) 1008-1017.
- [325] A. Nopora, T. Brocker, Bcl-2 Controls Dendritic Cell Longevity In Vivo, *The Journal of Immunology* 169(6) (2002) 3006-3014.
- [326] E.M. Carrington, D.M. Tarlinton, D.H. Gray, N.D. Huntington, Y. Zhan, A.M. Lew, The life and death of immune cell types: the role of BCL-2 anti-apoptotic molecules, *Immunol Cell Biol* 95(10) (2017) 870-877.
- [327] J. Kale, E.J. Osterlund, D.W. Andrews, BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death Differ* 25(1) (2018) 65-80.

- [328] E.M. Carrington, Y. Zhan, J.L. Brady, J.G. Zhang, R.M. Sutherland, N.S. Anstee, R.L. Schenk, I.B. Vikstrom, R.B. Delconte, D. Segal, N.D. Huntington, P. Bouillet, D.M. Tarlinton, D.C. Huang, A. Strasser, S. Cory, M.J. Herold, A.M. Lew, Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo, *Cell Death Differ* 24(5) (2017) 878-888.
- [329] D. Gatto, K. Wood, I. Caminschi, D. Murphy-Durland, P. Schofield, D. Christ, G. Karupiah, R. Brink, The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells, *Nat Immunol* 14(5) (2013) 446-53.
- [330] R.L. Schenk, S. Tuzlak, E.M. Carrington, Y. Zhan, S. Heinzl, C.E. Teh, D.H. Gray, L. Tai, A.M. Lew, A. Villunger, A. Strasser, M.J. Herold, Characterisation of mice lacking all functional isoforms of the pro-survival BCL-2 family member A1 reveals minor defects in the haematopoietic compartment, *Cell Death Differ* 24(3) (2017) 534-545.
- [331] D. Kingston, M.A. Schmid, N. Onai, A. Obata-Onai, D. Baumjohann, M.G. Manz, The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis, *Blood* 114(4) (2009) 835-43.
- [332] W.L. Chang, N. Baumgarth, M.K. Eberhardt, C.Y. Lee, C.A. Baron, J.P. Gregg, P.A. Barry, Exposure of myeloid dendritic cells to exogenous or endogenous IL-10 during maturation determines their longevity, *J Immunol* 178(12) (2007) 7794-804.
- [333] M. Ito, Y. Minamiya, H. Kawai, S. Saito, H. Saito, T. Nakagawa, K. Imai, M. Hirokawa, J. Ogawa, Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node, *J Immunol* 176(9) (2006) 5637-43.
- [334] T.A. Borkowski, J.J. Letterio, A.G. Farr, M.C. Udey, A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells, *J Exp Med* 184(6) (1996) 2417-22.
- [335] P. Bouillet, L.C. Zhang, D.C. Huang, G.C. Webb, C.D. Bottema, P. Shore, H.J. Eyre, G.R. Sutherland, J.M. Adams, Gene structure alternative splicing, and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim, *Mamm Genome* 12(2) (2001) 163-8.
- [336] M. Marani, T. Tenev, D. Hancock, J. Downward, N.R. Lemoine, Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis, *Mol Cell Biol* 22(11) (2002) 3577-89.

- [337] A. Weber, S.A. Paschen, K. Heger, F. Wilfling, T. Frankenberg, H. Bauerschmitt, B.M. Seiffert, S. Kirschnek, H. Wagner, G. Hacker, BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins, *J Cell Biol* 177(4) (2007) 625-36.
- [338] J. Liu, X. Zhang, K. Chen, Y. Cheng, S. Liu, M. Xia, Y. Chen, H. Zhu, Z. Li, X. Cao, CCR7 Chemokine Receptor-Inducible Inc-Dpf3 Restrains Dendritic Cell Migration by Inhibiting HIF-1alpha-Mediated Glycolysis, *Immunity* 50(3) (2019) 600-615 e15.
- [339] K. Weber, N. Harper, J. Schwabe, G.M. Cohen, BIM-mediated membrane insertion of the BAK pore domain is an essential requirement for apoptosis, *Cell Rep* 5(2) (2013) 409-20.
- [340] E.H. Cheng, M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, S.J. Korsmeyer, BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis, *Mol Cell* 8(3) (2001) 705-11.
- [341] H. Puthalakath, D.C. Huang, L.A. O'Reilly, S.M. King, A. Strasser, The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex, *Mol Cell* 3(3) (1999) 287-96.
- [342] H. Harada, B. Quearry, A. Ruiz-Vela, S.J. Korsmeyer, Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(43) (2004) 15313-7.
- [343] Y. Zhu, B.J. Swanson, M. Wang, D.A. Hildeman, B.C. Schaefer, X. Liu, H. Suzuki, K. Mihara, J. Kappler, P. Marrack, Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(20) (2004) 7681-6.
- [344] T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, J.E. Chipuk, C. Bonzon, B.A. Sullivan, D.R. Green, D.D. Newmeyer, BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol Cell* 17(4) (2005) 525-35.
- [345] D. Merino, M. Giam, P.D. Hughes, O.M. Siggs, K. Heger, L.A. O'Reilly, J.M. Adams, A. Strasser, E.F. Lee, W.D. Fairlie, P. Bouillet, The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins, *J Cell Biol* 186(3) (2009) 355-62.
- [346] J.E. Chipuk, D.R. Green, Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(3) (2005) 268-75.

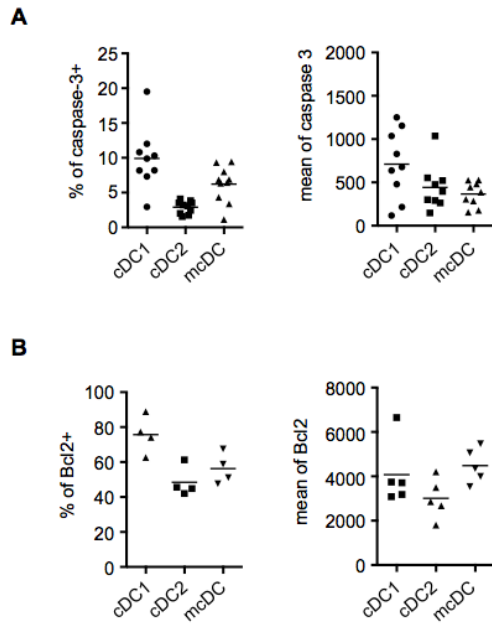
[347] P.S. Jeng, A. Inoue-Yamauchi, J.J. Hsieh, E.H. Cheng, BH3-Dependent and Independent Activation of BAX and BAK in Mitochondrial Apoptosis, *Curr Opin Physiol* 3 (2018) 71-81.

Annexe 1. Le phénotype des mcDCs



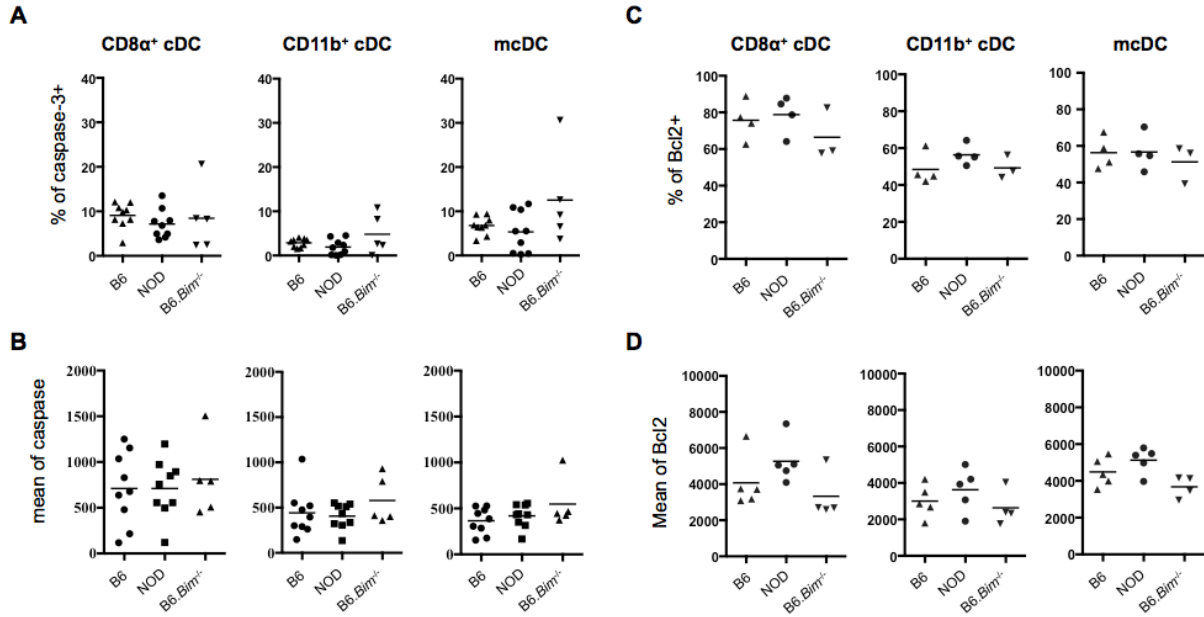
Annexe 1. Histogramme représentant l'expression de différents marqueurs de surface sur les mcDCs (rouge), cDC1 (violet), cDC2 (bleu) isolées d'une rate d'une souris C57Bl/6 ainsi que sur une population contrôle (gris).

Annexe 2. Expression de marqueurs de survie par les cDCs



Annexe 2. (A-B) Le pourcentage de cellules positives (droite) ou l'expression (gauche) de caspase-3(A) ou Bcl-2 (B) a été déterminé pour chaque sous-population de cDCs spléniques isolées d'une souris B6. n=au moins 3 expériences indépendantes.

Annexe 3. Expression de marqueurs de survie par lignée murine



Annexe 3. (A&C) Pourcentage de cellule positive pour l'expression de caspase-3 active (A) ou Bcl-2 (B). (B&C) Expression de la caspase-3 active (B) et de Bcl-2 (C) sur chaque sous-type de cDCs. (A-D) Les cDCs spléniques ont été isolées d'une souris B6, NOD ou B6.Bim^{-/-}. n = au moins 3 expériences indépendantes.

Annexe 4. Article de revue sur les DCs dans la tolérance immunitaire

Full title: The importance of dendritic cells in maintaining immune tolerance

Running title: Dendritic cells in immune tolerance

Cindy Audiger^{*,†,1}, M. Jubayer Rahman^{‡,1}, Tae Jin Yun[§], Kristin V. Tarbell[‡], Sylvie Lesage^{*,†}

* Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada

† Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

‡ Immune Tolerance Section, Diabetes, Endocrinology, and Obesity Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

§ Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, QC H2W 1R7, Canada; Division of Experimental Medicine, Department of Medicine, McGill University, Montréal, QC H3A 1A3, Canada

¹ both authors contributed equally to this work

Corresponding author information:

Sylvie Lesage: sylvie.lesage@umontreal.ca, 514-252-3400, ext 4649

Fax number 1-514-252-3430

Abstract

Immune tolerance is necessary to prevent the immune system from reacting against self, and thus to avoid the development of autoimmune diseases. Here, we review key findings that position dendritic cells (DCs) as critical modulators of both thymic and peripheral immune tolerance. Although DCs are important for inducing both immunity and tolerance, increased autoimmunity associated with decreased DCs suggests their non-redundant role in tolerance induction. DC-mediated T cell immune tolerance is an active process that is influenced by genetic variants, environmental signals as well as the nature of the specific DC subset presenting antigen to T cells. Answering the many open questions with regards to the role of DC in immune tolerance could lead to the development of novel therapies for the prevention of autoimmune diseases.

Keywords:

Dendritic cells, immune tolerance, autoimmunity

Introduction

APCs, namely B cells, macrophages and dendritic cells (DCs) initiate both protective and autoimmune T cell responses, and DCs bear the highest antigen-presentation potential, as shown by stronger induction of naive T cell activation (1). DCs play a non-redundant role in the initiation of immune responses and the control of some pathogens. For instance, *IRF8* mutations in humans cause defects in DCs resulting in opportunistic infections and an increase in anergic T cells (2). In addition, DCs also play a key role in maintaining immune tolerance, as we will review here.

The importance of DCs in maintaining immune tolerance was shown by using mouse models to manipulate the number of DCs in vivo. For one, the CD11c-Cre/ROSA-diphtheria toxin A (CD11c-DTA) transgenic mouse model allows for specific depletion of CD11c⁺ cells (3). CD11c is an integrin expressed at high levels by DCs and at much lower levels by many cellular subsets, namely neutrophils, macrophages, natural killer cells as well activated monocytes and T cells. Selective depletion of CD11c⁺ cells induces an increase in effector Th1 and Th17 cells and strong autoimmune symptoms, such as lymphadenopathy, splenomegaly, and infiltration of non-lymphoid organs (3-5). Elimination of DCs in mice thus is sufficient to break immune tolerance and lead to autoimmune pathology, suggesting that DCs play a central role in the maintenance of immune tolerance. Notably, these findings were recently confirmed in a model that permits more selective elimination of DCs. Indeed, within the hematopoietic system, the *Zbtb46* transcription factor is exclusively expressed in DCs (6). The specific depletion of DCs in *Zbtb46*-diphtheria toxin receptor (DTR) adult mice via diphtheria toxin

injection causes lymphoangiogenesis and myeloproliferative disorders, thus confirming the importance of DCs in the maintenance of immune tolerance (7, 8). Interestingly, the autoimmune pathology was less severe in the *Zbtb46*-DTR mice when compared to the CD11c-DTA mice, possibly because of either the more selective nature of the *Zbtb46*-DTR model or the timing of DC deletion. CD11c-DTA model continuously delete DCs from early development, but the deletion of DCs in *Zbtb46*-DTR mice is transiently induced in adult mice. Nevertheless, both experimental settings show that elimination of DCs in mice is sufficient to break immune tolerance and lead to autoimmune pathology, suggesting that DCs play a central role in the maintenance of immune tolerance.

If depletion of DCs leads to autoimmune phenotypes, one could postulate that increasing the prevalence of DCs would strengthen immune tolerance and prevent autoimmune disease occurrence. To that effect, Flt3 ligand injection increases the proportion of DCs in vivo and prevents autoimmune diabetes onset in NOD mice (9). Yet, a break in immune tolerance is observed in mouse models where DC number is increased by inhibiting DC apoptosis. Specifically, transgenic mice with CD11c promoter-driven p35, a caspase inhibitor that blocks apoptosis, present with an accumulation of DCs in lymphoid organs over time (10). Consequently, CD11c-p35 transgenic mice exhibit lymphocytic infiltration in non-lymphoid organs, activation of both T and B cells and production of anti-DNA antibody (10). Also, DC-specific knock-out of *Bim* decreases DC apoptosis, which leads to an increase in DCs and results in inflammation (11). Therefore, depending on the context, increase in the number of DCs can either increase or decrease T cell tolerance. This is perhaps due to distinct impacts on the DC phenotype, such that expansion of DCs either by stimulating hematopoiesis or by

blocking DC apoptosis may yield different outcomes in the maintenance of immune tolerance. Still, because DCs are capable of both immunity and tolerance, manipulation of numbers alone may not be a consistent way to alter the balance of immunity and tolerance.

Induction of stable tolerogenic DC could provide a powerful platform for antigen-specific treatment of autoimmune diseases. In vitro protocols to induce DC with tolerogenic properties (tol-DC) include the differentiation of DC precursors in media complemented with agents such as dexamethasone, IL-10 or TGF- β (12). These tol-DC can then be loaded with specific antigens and, upon injection in vivo, are expected to provide antigen-specific immune tolerance through different means, such as by promoting antigen-specific regulatory T cells (Tregs) differentiation or by producing IDO and/or NO (13). Various DC populations that facilitate immune tolerance have also been identified in vivo (14). For example, spleen CD11c^{low}CD45RB⁺ DC induce antigen-specific differentiation of Tregs via antigen-presentation and IL-10 production (15, 16). In addition, CD11c^{low}CD11b^{hi}I-A^{low} DCs create a tolerogenic environment by secreting high levels of IL-10 and NO (17). Therefore, understanding the mechanisms by which DCs can induce and maintain both central and peripheral immune tolerance may inform treatments for autoimmunity. In this review, we will discuss the mechanisms by which DC subsets can induce steady state immune tolerance, and how an inflammatory/autoimmune disease context can change DC-mediated tolerance.

Thymic tolerance

The process of central tolerance in the thymus eliminates potentially autoreactive thymocytes by negative selection and promotes T cell differentiation into various Treg cell subsets via

additional selection processes (18-22). Central tolerance is, in fact, highly dependent on the presentation of self-antigens to T cells by both thymic epithelial cells and APCs (23-25). Early work showed that MHC expression on thymic bone marrow-derived APCs contributes to central tolerance induction (26). Among these APCs, DCs clearly contribute to elimination of maturing autoreactive thymocytes, as DC-specific expression of MHC-II I-E is sufficient to negatively select thymocytes specific for endogenous superantigens in a manner comparable to that of mice expressing the I-E α transgene on all APCs (27). MHC expression on DCs thus appears sufficient, at least in the context of superantigens, to induce effective central tolerance (27). In comparison to macrophages and B cells, only DCs were able to induce negative selection of thymocytes in reaggregate thymus organ cultures (RTOCs) (25), showing the dominant role of DCs in central tolerance. More recently, it was shown that DCs are not simply bystanders in the thymocyte selection process. They actively attract post-positive selection thymocytes by producing CCR4 ligand to facilitate the negative selection process (28). Interestingly, and likely due to the experimental challenges associated with separating central and peripheral tolerance processes, the general outcome of a defect in DC-mediated central tolerance on the potential development of an autoimmune phenotype has yet to be clearly defined.

Although all thymic DCs contribute to central tolerance, they do so through different means (Figure 1). Three thymic DC subsets contribute to central tolerance, namely resident DC (CD8 α ⁺SIRP α ⁻), migratory DC (CD8 α ⁻CD11b⁺SIRP α ⁺) and plasmacytoid DC (pDC, CD11c^{int}CD45RA^{int}) (29-32). Resident DCs that develop from thymic lymphoid precursors are the most abundant subset and are primarily localized in the medulla (29, 31, 33, 34). They

contribute to the elimination of autoreactive thymocytes by presenting a wide array of self-antigens, and by cross-presenting both blood-derived antigen and tissue specific antigens from medullary thymic epithelial cells (35-37). Migratory SIRP α^+ DCs also contribute to central tolerance. They develop in periphery and, as shown in parabiosis experiments, migrate to the thymus *via* CCR2/ α 4 integrin where they mostly localize to the cortical-medullary junction to present peripheral self-antigens to developing thymocytes (34, 38, 39). pDCs also develop in periphery and use CCR9/ α 4 integrin signals to migrate to the thymus and contribute to the maintenance of immune tolerance (32). Interestingly, in RTOCs experiments, pDCs were shown to only minimally contribute to the induction of negative selection (25). The reason for this discrepancy is not clear, but may be due to the different localization of cells in RTOCs. Still, all the DC subsets contribute to immune tolerance by presenting self-antigens and inducing negative selection of developing thymocytes that present with a high affinity to self-ligands. While pDC and migratory DC specialize in the presentation of peripheral antigens, resident DCs provide immature T cells with a distinct self-antigenic repertoire. In addition, although thymic resident and migratory cDC can uptake MHC-I and MHC-II from thymic epithelial cells in a cell-contact dependent manner, this process is dependent on PI3K pathway only for CD8 α^+ resident cDCs (40), further supporting the view that each DC subset provides a non-redundant role in antigen-presentation to T cells and in the maintenance of central tolerance.

In addition to inducing negative selection, thymic DCs are also important for the selection of natural Tregs during thymocyte differentiation. Proietto et al. constructed mixed bone marrow chimeric mice, with T cells specific to a given antigen (from OT-II.Rag2 $^{-/-}$ mice) and DCs as

the only source of APC presenting this antigen (from CD11c-OVA mice). In these mice, DCs successfully induced the differentiation of natural antigen-specific Tregs in the thymus (41). Specifically, both resident and migratory DCs, but not pDCs, are able to induce Tregs in vitro (25, 41, 42), but the mechanisms by which they induce Tregs are distinct (Figure 1). Resident DCs promote Treg cell survival via their expression of CD70, whereas CD70-deficient migratory DCs effectively induce Tregs through an undefined pathway (42). Yet, the capacity to induce Tregs is not restricted to DCs. When high concentrations of self-antigens are present, Tregs can differentiate in RTOCs devoid of APCs suggesting that epithelial cells can sometimes induce Tregs (25). As such, thymic Treg numbers are normal in mice that only express MHC-II on epithelial cells (43). Therefore, both thymic epithelial cells and DCs play an active role in the induction of central tolerance through both the elimination of potentially autoreactive thymocytes and in facilitating the generation of Tregs. As thymic epithelial cells and DCs bear distinct immunopeptidomes, one can presume that these roles are not fully redundant. Indeed, both have the capacity to uptake antigens from different sources and exploit different proteolytic pathways resulting in distinct peptide repertoires each contributing towards effective induction of central tolerance (20).

DC-mediated peripheral tolerance mechanisms

Although thymic selection efficiently eliminates many self-reactive T cells, some remain and must be kept in check with additional peripheral tolerance mechanisms to avoid autoimmunity. In the absence of inflammation, DCs can present self-antigens to T cells, providing transient T cell activation that can lead to either anergy or deletion of these T cells (44). DC-mediated tolerance is thus an active process that requires TCR signalling (45). T cell

clonal deletion is mediated by the activation of Fas-, Bim- or TNF-dependent apoptosis and inhibition of NF- κ B signalling (46-48). Many DC factors contribute to the balance of tolerance and immunity, including maturation states defined by their gene signature, and the level of antigen presentation; therefore it is necessary to understand the conditions under which DCs remain immature or become activated (37, 49, 50).

Steady state DCs that normally express low levels of DC maturation markers and promote tolerance induction are termed immature DCs (51). Once activated by pathogen or damage associated molecular patterns, DCs turn on different metabolic, cellular and gene transcription programs that initiate increased DC migration out of peripheral tissue into draining lymph nodes where antigen presentation to T cells occurs (52-54). DC maturation is marked by increased expression of molecules relevant for T cell activation including MHC-II, costimulatory proteins such as CD40, CD80/CD86 and inflammatory cytokines or chemokines (55-57). However functional capacity of DCs to induce T cell activation does not always directly correlate with common maturation markers, in part because Tregs use some of the same signals including CD80/CD86 (58-60). Therefore, tolerogenic and immunogenic DC should ideally be defined based on the signals they give to conventional or regulatory T cells (37).

Steady state DCs are exposed to commensal microorganisms and other tonic inflammatory signals that can induce the expression of maturation markers at low levels, which are not sufficient to break self-tolerance in most individuals. The ability of steady-state DCs to remain in an immature/non-activated form likely depends on the timing, dose, and signal strength of

the factors interacting with DCs. Steady-state DC migration is associated with considerable transcriptional changes, suggesting that immunoregulatory function of steady-state DCs is an active process (37). Indeed, regulators such as A20 can modulate NF- κ B signalling and contribute to maintaining tolerance (61-64). Upregulation in DC of IDO synthesis, a rate-limiting enzyme of tryptophan catabolism, contributes in tolerance by depleting tryptophan and causing apoptosis of effector T cells (65-67). Negative costimulation via CTLA4-CD80/CD86 or PD-1-PD-L1/ PD-L2 is also implicated in the induction of tolerance, but, these proteins display minimal expression on steady state DCs suggesting that these inhibitory signals may be more important for dampening activation in the context of inflammatory signals (68-70).

Peripheral DCs are subdivided in functional subsets with various locations and roles in both immunity and tolerance, namely pDC, monocyte-derived DC (moDC) and conventional DC (cDC). The latter are further subdivided in 2 populations, the CD8 α^+ /CD103 $^+$ and the CD11b $^+$ (71). moDCs (CD11c $^+$ CD11b hi MHCII $^+$) are usually inflammatory and separated from the cDCs by higher CD11b expression and lack of cDC-specific markers such as CD4 and DCIR2 (54, 72). Because many studies do not separate cDCs from moDCs in their analysis, it is not yet clear if moDCs can contribute to tolerance induction, whereas strong evidence support a clear role for both cDCs and pDCs in the maintenance of immune tolerance.

cDCs prime T cells via antigen presentation and other signals, leading to immunogenicity or tolerance (49, 70, 73-75). Delivering antigen to particular cDC subsets via chimeric antibodies specific for lectin cell surface receptors can elucidate the role of these subsets in T cell

tolerance induction (Figure 2). $CD8\alpha^+$ cDCs express DEC205 and are located in the T cell zone in the spleen where they can cross-present exogenous antigen to $CD8^+$ T cells via MHC-I. DCIR2, another DC lectin receptor, is expressed by murine $CD11b^+$ cDCs and some human DCs (76-78). In mice, $CD11b^+DCIR2^+$ DCs located in the red pulp and marginal zone area of the spleen can migrate to the edge of the T cell zone where they primarily stimulate $CD4^+$ T cells (79-82). Both DEC205 and DCIR2 are efficiently internalized upon receptor-ligand interaction and these receptors are directed to endosomal/lysosomal compartments for antigen presentation (79, 83). In mice that have been challenged with anti-DEC205 or anti-DCIR2-mediated antigen delivery to cDCs during steady state, antigen-specific T cells are rapidly deleted and the remaining antigen specific T cells become unresponsive upon in vitro stimulation (65, 75, 79). Some studies have proposed that natural ligands for DEC205 such as apoptotic, necrotic materials or CpG may stimulate $CD8\alpha^+$ cDCs and possibly contribute to their maturation (84, 85). Still, many lectins can impart maturation or inhibitory signals upon binding ligand or antibody (86, 87), and recent evidence points to DCIR2 in providing a negative signal to cDCs, further adding to the role of DCIR2 in the cDC-mediated maintenance of steady-state tolerance (88).

cDCs not only induce tolerance by deleting antigen-specific T cells or by inducing anergy, they can also promote Treg cell differentiation or function (Figure 2). While $CD8\alpha^+$ cDCs are more efficient in providing TGF- β for de novo FoxP3 $^+$ Treg cell generation, likely potentiated by BLTA expression (89), $CD11b^+$ cDCs enhance activation and proliferation of existing $CD4^+FoxP3^+$ Tregs (90). Interestingly, Tregs play a very important role in steady state cDC-mediated tolerance. Depletion of FoxP3 $^+$ Tregs increases cDC numbers as well as the surface

expression of costimulatory molecules, resulting in enhanced T cell responses (91). This strongly suggests that Tregs also contribute to the peripheral tolerance by maintaining cDCs in immature state (91, 92).

pDCs are a specialized subset of DC that rapidly make a large amount of type 1 IFN in response to signals such as viral infections (Figure 2). In the steady state, pDCs express very low levels of MHC-II and costimulatory molecules and may contribute to T cell unresponsiveness. Though pDCs are not as efficient as cDCs for antigen presentation to T cells, pDCs can upregulate MHC-II molecules on their surface and migrate to the T cell area, induce T cell proliferation and Treg generation (93, 94). Activated pDCs can have enhanced MHC-II expression (95, 96), allowing for prolonged T cell activation that may contribute to Treg development as increased MHC-II on pDCs is required for Treg homeostasis (97). Type 1 IFN and IL-10 produced by pDCs may also contribute to Treg generation (98). pDCs can produce IDO and express PD-L1 that correlate with an increased Treg frequency (99, 100). Tolerogenic pDCs have been reported in many inflammatory disorders including acute graft-versus-host disease (GVHD), autoimmune arthritis, and oral tolerance, where they promote tolerance by modulating Treg function or by maintaining antigen-specific T cell tolerance (101-103).

The local environment also plays an important role in modulating DC tolerogenic function. For example, migratory dermal DCs and Langerhan cells present in the both skin and skin-draining lymph nodes appear to play a central role in Treg differentiation. DCs in skin draining lymph nodes are particularly effective at inducing Tregs, as Tregs converted from

naïve CD4 T cells display enhanced immunoregulatory properties when isolated from the skin draining lymph nodes rather than the spleen of mice (104). In mice where langerin⁺ migratory DC are depleted using DT injections in Lang-DTR transgenic mice, anti-DEC205-mediated antigen-specific delivery to DCs is no longer able to induce antigen-specific Tregs in the spleen and skin-draining lymph nodes and results in a loss of immune tolerance (105, 106). Importantly, langerin⁺ migratory DCs may, in fact, uniquely contribute to the induction of Tregs and the maintainance of peripheral tolerance, as the specific depletion of langerin⁺ DCs has no effect on the initiation of anti-viral responses (107). This latter finding suggests that specific DC subsets found in unique environments may have specialized roles in immune tolerance. Further investigation of the role of langerin⁺ DC in the modulation of various immune responses is needed to clarify their contribution in pathogenic settings.

DCs found in the gut associated lymphoid tissues can also promote immune tolerance. As in the skin, CD103⁺ DCs in the gut tissue express high levels of the enzyme aldehyde dehydrogenase, which converts vitamin A into retinoic acid (RA), that in turn promotes the conversion of naïve T cells into Tregs (108, 109). A second mechanism by which gut DCs induce tolerance is through the production of IDO, that itself facilitates induction of Tregs (110). In fact, selective elimination of CD103⁺CD11b⁻ DCs results in a decrease in IDO levels and an increased susceptibility to DSS-induced colitis (111). Finally, CD103⁺CD11b⁺ DCs also significantly contribute to immune tolerance through the expression of acyloxyacyl hydrolase, an enzyme able to inactivate LPS and thus to prevent effective TLR-4 activation that induces the differentiation of naïve T cells into effector Th17 cells (112). Altogether, these data support the view that DCs found in the gut microenvironment are geared to promote

immune tolerance, likely because of the perpetual exposure to microflora and to food antigens (113).

How do DCs maintain/adjust tolerance against self-antigens in the context of inflammatory signals? Although activated DCs acquire strong phenotypic changes linked with enhanced effector T cell function and inflammatory cytokine production, DCs can also exert regulatory function under inflammatory situations. For example, pDCs promote persistence of viral infection in the liver (114). Even under strong activation due to allergen exposure, pulmonary DCs can stimulate the development of CD4⁺ T regulatory 1-like cells (115). Immunoregulatory-DCs in the context of infection have been defined based on the net sum of inhibitory versus stimulatory signals. Induction of inhibitory molecules including PD-1, TGF- β or IDO and down regulation of costimulatory molecules or cytokines are important correlates of regulatory DC function (116, 117). For example, upon infection with *Listeria monocytogenes*, DCs induce both stimulatory and regulatory molecules (118). Infected DCs suppress T cell activity mainly by IL-10 and cyclooxygenase 2-mediated mechanisms (118, 119). In certain contexts, signals associated with inflammation, such as TLR2, TNF- α and prostaglandin receptor can induce immunoregulatory-DC phenotypes (118). In chronic viral infection, DCs can become immunosuppressive, losing their surface expression of MHC class I and II and costimulatory molecules (120). DCs also upregulate PD-L1 during chronic viral infections such as HIV and hepatitis C virus (121-123). PD-L1 interacts with PD-1 on T cells which can induce T cell deletion and also increase Treg generation and function by enhancing FoxP3 expression, in human (124).

DC and autoimmune pathologies/diseases

Autoimmune diseases occur, in part, because of changes in DC function that result from genetic and environmental alterations (125-127). Disruption of the tolerance network contributed by each DC subsets can promote autoreactive T cell responses and pathology. Therefore, therapies targeting DCs may be effective treatment for autoimmunity. Identifying the DC signalling pathways that are altered in the context of autoimmunity and that can interrupt T cell tolerance induction will help define the signals that allow induction of stable tolerogenic DCs. In addition to the pattern recognition receptors that sense danger signals, host derived non-pathogen-associated chronic inflammatory signals are also playing a role in autoimmune pathology (75, 128). DC function could be altered under this persistent host-derived inflamed situation (Figure 2).

One critical inflammatory signal in systemic autoimmunity is type 1 IFN. Patients with systemic lupus erythematosus display an increased interferon gene signature (129, 130) and pDCs from these patients are more prone to induce pathogenic T cell responses (131, 132). The pathogenic role of type 1 IFN in other autoimmune diseases is less clear, but may also contribute to these pathologies (133, 134). Prior to islet infiltration by autoreactive T cells, autoimmune-prone NOD mice already exhibit increased type 1 IFN and IFN response genes in the islets, and blocking type 1 IFN at this early stage inhibit diabetes pathogenesis (135-137). This suggests that type 1 IFN is critical for the initial break in tolerance. But the role of chronic innate signals on DCs at later disease stages is less clear. Despite increased chronic type 1 IFN exposure, DCs from older prediabetic NOD mice display impaired type 1 IFN responses due in part to down-modulation of IFN-A receptor (137, 138). Yet, NOD DCs and

other APCs are hyperactive due to increased proinflammatory signals resulting from a defect in NF κ B regulation that enhances antigen presentation to CD8 T cells (139, 140). Therefore, the balance of different types of inflammatory signal is likely important for autoimmune pathogenesis, and type 1 IFN and IL-1 signals can counter-regulate each other (141-143). IL-1 and increased NF κ B activation may be the dominant inflammatory signal for type 1 diabetes (144). Autoimmunity may also lead to changes in DC costimulatory molecule expression. DCs from prediabetic NOD mice have increased CD40 expression that is dependent on adaptive immune cells. Increased CD40 expression could be more indicative of inflammation, as blocking CD40 signals blocks NOD autoimmune diabetes pathogenesis (145-148).

The role of particular DC subsets in tolerance induction also differs in autoimmune contexts. Although both CD8 α^+ DEC205 $^+$ and CD11b $^+$ DCIR2 $^+$ DCs are tolerogenic in normal mice, only the CD11b $^+$ DCIR2 $^+$ DCs are able to induce CD4 tolerance in NOD mice (78). NOD mice have fewer CD8 α^+ DCs in the spleen and the function of this DC subset is altered; the cross-presentation capacity of NOD DCs is reduced relative to CD8 α^+ DC from non-autoimmune prone mice (149). This significantly reduces the potential for cross-tolerance, a mechanism involved in maintaining immune tolerance (150). This more pathogenic role for CD8 α^+ DEC205 $^+$ DCs in NOD mice was further confirmed by the lack of diabetes development in NOD Batf3 $^{-/-}$ mice that cannot develop these cross-presenting DCs (151). NOD mice also exhibit an increased proportion of recently described merocytic DCs (152, 153). This unconventional DC subset is sufficient to break tolerance at steady state (154). In addition, the H2 g7 specific MHC haplotype affects the spectrum of antigen presentation, which has been proposed to contribute to autoimmune susceptibility (155). In experimental autoimmune

encephalitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis, the role of DCs for controlling immune tolerance was demonstrated with two complementary approaches. The lack of MHC-II on APCs using MHC class II-deficient bone marrow chimeric mice reduced EAE symptoms and histopathology scores. Conversely, MHC-II expression restricted to CD11c⁺ DCs is sufficient to induce EAE pathophysiology in mice bearing myelin oligodendrocyte-specific T cells (156). pDCs are also important in regulating multiple sclerosis susceptibility, but their protective or detrimental role is highly dependent on the timing. Indeed, antibody-mediated depletion of pDCs at the onset of EAE exacerbates the pathophysiological response (157, 158). Similarly, in mice lacking MHC-II expression in pDCs, EAE severity was increased and this was linked to a decrease in Treg proliferation, suggesting that pDCs contribute to immune tolerance by activating Tregs (97). In contrast, pDC depletion during the priming phase decreases the onset and the severity of the disease (158). Therefore, the context and timing in which DCs transmit signals to other immune cells determine if they will contribute to exacerbating the immunopathology or confer immune tolerance.

Maintenance of immune tolerance is also relevant in the context of GVHD where pathogenic alloimmunity develops. Depletion of DCs in GVHD setting *via* the utilization of CD11c-DTR bone marrow decreases the expansion of allogenic T cells, suggesting that donor DCs contribute to the pathogenesis (159). Specifically, the CD103⁺CD11b⁻ DC subset is sufficient to cause GVHD, as exemplified in *Irf4*-deficient bone marrow chimeras (159). However, pDCs were shown to protect against GVHD by inducing Tregs (101). MHC-II-deficient DCs are also linked with a reduction in Tregs in the context of GVHD (160). These findings support an immunoregulatory role for DCs in GVHD, at least by the induction of Tregs. In

addition to immune tolerance, DCs may help prevent GVHD by restoring immune T cell homeostasis, which is severely affected following bone marrow transplants. Although IL-7 treatment facilitates CD8⁺ T cell homeostatic proliferation, recent evidence suggests that adding either Flt3 or SDF1, two molecules that potentiate DC numbers *in vivo*, favours homeostatic reconstitution of CD4⁺ T cells (161). Immunoregulation by DCs is thus relevant for the prevention or treatment of GVHD.

A specific role for pDCs has also been delineated in vascular inflammatory settings. In vascularized grafts, as in GVHD, pDCs promote the development of Treg and prevent allograft rejection (162). pDCs similarly contribute to prevent atherosclerosis, where specific depletion of pDCs leads to a reduction in Tregs and an exacerbation of atherosclerosis lesions (163). This latter study demonstrates that pDCs induce antigen-specific Treg *via* the production of IDO. Together, these studies support a tolerogenic role for pDCs through induction of Tregs.

Conclusion

DCs are potent APCs which, depending on the context, can either induce effective immune responses or contribute to immune tolerance. There are many challenges associated with studying the role of specific DC subsets at steady state, under inflammatory or pathological conditions to carefully dissect their contrasting immunoregulatory and immunogenic properties. To examine the fundamental tolerogenic function of DCs at steady state, various mouse models have been engineered to allow manipulation of DCs in an unscathed *in vivo* setting. Studies exploiting these models have established that DCs contribute to the

maintenance of immune tolerance. As DCs efficiently maintain immune tolerance, various protocols have been attempted to effectively produce tol-DC for the potential treatment of autoimmune diseases. DCs are a rare heterogeneous cellular population and their phenotype and function is readily modulated by both tissue localization and inflammatory responses. Notably, the context in which a specific DC subset is found can dictate its role. For instance, the CD8 α ⁺ cDCs subset may exhibit at least three distinct functions depending on its location and activation status. Under homeostatic maturation signals in the thymus, they permit effective induction of T cell central tolerance whereas, in secondary lymphoid organs, they induce T cell cross-tolerance (37). In contrast, immunogenic activation of this same cDC subset will initiate effective anti-viral responses (37). Recent studies have begun to transpose the role of each murine DC subset to their human equivalent (164-166). This may help lead to the development of new therapeutic strategies for using DCs to establish immune tolerance and treat autoimmune diseases.

Acknowledgements

We dedicate this work to our colleague and friend, the late Cheolho Cheong, whom was excited at the thought of contributing to the writing of this manuscript.

References

1. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296.
2. Salem, S., D. Langlais, F. Lefebvre, G. Bourque, V. Bigley, M. Haniffa, J. L. Casanova, D. Burk, A. Berghuis, K. M. Butler, T. R. Leahy, S. Hambleton, and P. Gros. 2014. Functional characterization of the human dendritic cell immunodeficiency associated with the IRF8(K108E) mutation. *Blood* 124: 1894-1904.
3. Birnberg, T., L. Bar-On, A. Sapozhnikov, M. L. Caton, L. Cervantes-Barragan, D. Makia, R. Krauthgamer, O. Brenner, B. Ludewig, D. Brockschneider, D. Riethmacher, B. Reizis, and S. Jung. 2008. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29: 986-997.
4. Ohnmacht, C., A. Pullner, S. B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, and D. Voehringer. 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206: 549-559.
5. Singh, R. P., S. Hasan, S. Sharma, S. Nagra, D. T. Yamaguchi, D. T. Wong, B. H. Hahn, and A. Hossain. 2014. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 13: 1174-1181.
6. Satpathy, A. T., W. Kc, J. C. Albring, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, D. Bhattacharya, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2012. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* 209: 1135-1152.
7. Meredith, M. M., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, A. O. Kamphorst, H. A. Schreiber, P. Guermonprez, J. Idoyaga, C. Cheong, K. H. Yao, R. E. Niec, and M. C. Nussenzweig. 2012. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* 209: 1153-1165.
8. Loschko, J., H. A. Schreiber, G. J. Rieke, D. Esterhazy, M. M. Meredith, V. A. Pedicord, K. H. Yao, S. Caballero, E. G. Pamer, D. Mucida, and M. C. Nussenzweig. 2016. Absence of MHC class II on cDCs results in microbial-dependent intestinal inflammation. *J Exp Med* 213: 517-534.

9. O'Keeffe, M., T. C. Brodnicki, B. Fancke, D. Vremec, G. Morahan, E. Maraskovsky, R. Steptoe, L. C. Harrison, and K. Shortman. 2005. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand administration overcomes a genetically determined dendritic cell deficiency in NOD mice and protects against diabetes development. *Int Immunol* 17: 307-314.
10. Chen, M., Y. H. Wang, Y. Wang, L. Huang, H. Sandoval, Y. J. Liu, and J. Wang. 2006. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311: 1160-1164.
11. Chen, M., L. Huang, and J. Wang. 2007. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood* 109: 4360-4367.
12. Garcia-Gonzalez, P., G. Ubilla-Olguin, D. Catalan, K. Schinnerling, and J. C. Aguilon. 2016. Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*.
13. Liu, J., and X. Cao. 2015. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun* 63: 1-12.
14. Zanoni, I., and F. Granucci. 2011. The regulatory role of dendritic cells in the induction and maintenance of T-cell tolerance. *Autoimmunity* 44: 23-32.
15. Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez, and H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18: 605-617.
16. Svensson, M., A. Maroof, M. Ato, and P. M. Kaye. 2004. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 21: 805-816.
17. Zhang, M., H. Tang, Z. Guo, H. An, X. Zhu, W. Song, J. Guo, X. Huang, T. Chen, J. Wang, and X. Cao. 2004. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 5: 1124-1133.
18. Hogquist, K. A., T. A. Baldwin, and S. C. Jameson. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5: 772-782.
19. Labrecque, N., T. Baldwin, and S. Lesage. 2011. Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection. *Immunol Cell Biol* 89: 16-26.

20. Klein, L., B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14: 377-391.
21. Baldwin, T. A., K. A. Hogquist, and S. C. Jameson. 2004. The Fourth Way? Harnessing Aggressive Tendencies in the Thymus. *The Journal of Immunology* 173: 6515-6520.
22. Pobeziński, L. A., G. S. Angelov, X. Tai, S. Jeurling, F. Van Laethem, L. Feigenbaum, J. H. Park, and A. Singer. 2012. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol* 13: 569-578.
23. Jenkinson, E. J., G. Anderson, and J. J. Owen. 1992. Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations in vitro. *J Exp Med* 176: 845-853.
24. Gallegos, A. M., and M. J. Bevan. 2004. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200: 1039-1049.
25. Guerri, L., I. Peguillet, Y. Geraldo, S. Nabti, V. Premel, and O. Lantz. 2013. Analysis of APC types involved in CD4 tolerance and regulatory T cell generation using reaggregated thymic organ cultures. *J Immunol* 190: 2102-2110.
26. van Meerwijk, J. P., S. Marguerat, R. K. Lees, R. N. Germain, B. J. Fowlkes, and H. R. MacDonald. 1997. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med* 185: 377-383.
27. Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen. 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185: 541-550.
28. Hu, Z., J. N. Lancaster, C. Sasiponganan, and L. I. Ehrlich. 2015. CCR4 promotes medullary entry and thymocyte-dendritic cell interactions required for central tolerance. *J Exp Med* 212: 1947-1965.
29. Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen. *The Journal of Immunology* 164: 2978-2986.
30. Lahoud, M. H., A. I. Proietto, K. H. Gartlan, S. Kitsoulis, J. Curtis, J. Wettenhall, M. Sofi, C. Daunt, M. O'Keefe, I. Caminschi, K. Satterley, A. Rizzitelli, P. Schnorrer, A.

- Hinohara, Y. Yamaguchi, L. Wu, G. Smyth, E. Handman, K. Shortman, and M. D. Wright. 2006. Signal Regulatory Protein Molecules Are Differentially Expressed by CD8- Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 177: 372-382.
31. Corcoran, L., I. Ferrero, D. Vremec, K. Lucas, J. Waithman, M. O'Keeffe, L. Wu, A. Wilson, and K. Shortman. 2003. The Lymphoid Past of Mouse Plasmacytoid Cells and Thymic Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 170: 4926-4932.
32. Wu, L., and K. Shortman. 2005. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 17: 304-312.
33. Porritt, H. E., K. Gordon, and H. T. Petrie. 2003. Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med* 198: 957-962.
34. Donskoy, E., and I. Goldschneider. 2003. Two Developmentally Distinct Populations of Dendritic Cells Inhabit the Adult Mouse Thymus: Demonstration by Differential Importation of Hematogenous Precursors Under Steady State Conditions. *The Journal of Immunology* 170: 3514-3521.
35. Atibalentja, D. F., K. M. Murphy, and E. R. Unanue. 2011. Functional redundancy between thymic CD8 α ⁺ and Sirp α ⁺ conventional dendritic cells in presentation of blood-derived lysozyme by MHC class II proteins. *J Immunol* 186: 1421-1431.
36. Hubert, F. X., S. A. Kinkel, G. M. Davey, B. Phipson, S. N. Mueller, A. Liston, A. I. Proietto, P. Z. Cannon, S. Forehan, G. K. Smyth, L. Wu, C. C. Goodnow, F. R. Carbone, H. S. Scott, and W. R. Heath. 2011. Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* 118: 2462-2472.
37. Ardouin, L., H. Luche, R. Chelbi, S. Carpentier, A. Shawket, F. Montanana Sanchis, C. Santa Maria, P. Grenot, Y. Alexandre, C. Gregoire, A. Fries, T. P. Vu Manh, S. Tamoutounour, K. Crozat, E. Tomasello, A. Jorquera, E. Fossum, B. Bogen, H. Azukizawa, M. Bajenoff, S. Henri, M. Dalod, and B. Malissen. 2016. Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. *Immunity* 45: 305-318.

38. Bonasio, R., M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A. H. Lichtman, and U. H. von Andrian. 2006. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7: 1092-1100.
39. Baba, T., Y. Nakamoto, and N. Mukaida. 2009. Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J Immunol* 183: 3053-3063.
40. Kroger, C. J., N. A. Spidale, B. Wang, and R. Tisch. 2016. Thymic Dendritic Cell Subsets Display Distinct Efficiencies and Mechanisms of Intercellular MHC Transfer. *J Immunol*.
41. Proietto, A. I., S. van Dommelen, P. Zhou, A. Rizzitelli, A. D'Amico, R. J. Steptoe, S. H. Naik, M. H. Lahoud, Y. Liu, P. Zheng, K. Shortman, and L. Wu. 2008. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19869-19874.
42. Coquet, J. M., J. C. Ribot, N. Babala, S. Middendorp, G. van der Horst, Y. Xiao, J. F. Neves, D. Fonseca-Pereira, H. Jacobs, D. J. Pennington, B. Silva-Santos, and J. Borst. 2013. Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *J Exp Med* 210: 715-728.
43. Liston, A., K. M. Nutsch, A. G. Farr, J. M. Lund, J. P. Rasmussen, P. A. Koni, and A. Y. Rudensky. 2008. Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11903-11908.
44. Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194: 769-779.
45. Skokos, D., G. Shakhar, R. Varma, J. C. Waite, T. O. Cameron, R. L. Lindquist, T. Schwickert, M. C. Nussenzweig, and M. L. Dustin. 2007. Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes. *Nat Immunol* 8: 835-844.
46. Hughes, P. D., G. T. Belz, K. A. Fortner, R. C. Budd, A. Strasser, and P. Bouillet. 2008. Apoptosis regulators fas and bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28: 197-205.

47. Hutcheson, J., J. C. Scatizzi, A. M. Siddiqui, G. K. Haines, 3rd, T. Wu, Q. Z. Li, L. S. Davis, C. Mohan, and H. Perlman. 2008. Combined Deficiency of Proapoptotic Regulators Bim and Fas Results in the Early Onset of Systemic Autoimmunity. *Immunity* 28: 206-217.
48. Oh, J., S. H. Kim, S. Ahn, and C. E. Lee. 2012. Suppressors of cytokine signaling promote Fas-induced apoptosis through downregulation of NF-kappaB and mitochondrial Bfl-1 in leukemic T cells. *J Immunol* 189: 5561-5571.
49. Wallet, M. A., P. Sen, and R. Tisch. 2005. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 3: 166-175.
50. George, T. C., J. Bilsborough, J. L. Viney, and A. M. Norment. 2003. High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *Eur J Immunol* 33: 502-511.
51. Steinman, R. M. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30: 1-22.
52. Alvarez, D., E. H. Vollmann, and U. H. von Andrian. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29: 325-342.
53. Randolph, G. J., V. Angeli, and M. A. Swartz. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5: 617-628.
54. Dong, H., and T. N. Bullock. 2014. Metabolic influences that regulate dendritic cell function in tumors. *Front Immunol* 5: 24.
55. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180: 1263-1272.
56. Tan, J. K., and H. C. O'Neill. 2005. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol* 78: 319-324.
57. Jensen, S. S., and M. Gad. 2010. Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. *J Inflamm (Lond)* 7: 37.
58. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the

- CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12: 431-440.
59. Zheng, Y., C. N. Manzotti, M. Liu, F. Burke, K. I. Mead, and D. M. Sansom. 2004. CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 172: 2778-2784.
 60. Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198: 235-247.
 61. Johnson, D. J., and P. S. Ohashi. 2013. Molecular programming of steady-state dendritic cells: impact on autoimmunity and tumor immune surveillance. *Ann N Y Acad Sci* 1284: 46-51.
 62. Gon, Y., Y. Asai, S. Hashimoto, K. Mizumura, I. Jibiki, T. Machino, C. Ra, and T. Horie. 2004. A20 inhibits toll-like receptor 2- and 4-mediated interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 330-336.
 63. Hammer, G. E., E. E. Turer, K. E. Taylor, C. J. Fang, R. Advincula, S. Oshima, J. Barrera, E. J. Huang, B. Hou, B. A. Malynn, B. Reizis, A. DeFranco, L. A. Criswell, M. C. Nakamura, and A. Ma. 2011. Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nat Immunol* 12: 1184-1193.
 64. Kool, M., G. van Loo, W. Waelput, S. De Prijck, F. Muskens, M. Sze, J. van Praet, F. Branco-Madeira, S. Janssens, B. Reizis, D. Elewaut, R. Beyaert, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. 2011. The ubiquitin-editing protein A20 prevents dendritic cell activation, recognition of apoptotic cells, and systemic autoimmunity. *Immunity* 35: 82-96.
 65. Mayer, C. T., L. Berod, and T. Sparwasser. 2012. Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity. *Front Immunol* 3: 183.
 66. Lee, G. K., H. J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D. H. Munn, and A. L. Mellor. 2002. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107: 452-460.

67. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4: 762-774.
68. Probst, H. C., S. Muth, and H. Schild. 2014. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. *Eur J Immunol* 44: 927-933.
69. Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita. 2002. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *The Journal of Immunology* 169: 5538-5545.
70. Probst, H. C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6: 280-286.
71. Steinman, R. M., and J. Idoyaga. 2010. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev* 234: 5-17.
72. Miller, J. C., B. D. Brown, T. Shay, E. L. Gautier, V. Jojic, A. Cohain, G. Pandey, M. Leboeuf, K. G. Elpek, J. Helft, D. Hashimoto, A. Chow, J. Price, M. Greter, M. Bogunovic, A. Bellemare-Pelletier, P. S. Frenette, G. J. Randolph, S. J. Turley, M. Merad, and C. Immunological Genome. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13: 888-899.
73. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
74. Tarbell, K. V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, and R. M. Steinman. 2004. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199: 1467-1477.
75. Price, J. D., and K. V. Tarbell. 2015. The Role of Dendritic Cell Subsets and Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Other Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 6: 288.
76. Bates, E. E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J. J. Pin, S. M. Zurawski, S. Patel, J. S. Abrams, S. Lebecque, P. Garrone, and S. Saeland. 1999. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 163: 1973-1983.

77. Meyer-Wentrup, F., D. Benitez-Ribas, P. J. Tacke, C. J. Punt, C. G. Figdor, I. J. de Vries, and G. J. Adema. 2008. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* 111: 4245-4253.
78. Price, J. D., C. Hotta-Iwamura, Y. Zhao, N. M. Beauchamp, and K. V. Tarbell. 2015. DCIR2+ cDC2 DCs and Zbtb32 Restore CD4+ T-Cell Tolerance and Inhibit Diabetes. *Diabetes* 64: 3521-3531.
79. Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumppfeller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315: 107-111.
80. Calabro, S., D. Liu, A. Gallman, M. S. Nascimento, Z. Yu, T. T. Zhang, P. Chen, B. Zhang, L. Xu, U. Gowthaman, J. K. Krishnaswamy, A. M. Haberman, A. Williams, and S. C. Eisenbarth. 2016. Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. *Cell Rep* 16: 2472-2485.
81. Lindquist, R. L., G. Shakhar, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M. L. Dustin, and M. C. Nussenzweig. 2004. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 5: 1243-1250.
82. Witmer-Pack, M. D., W. J. Swiggard, A. Mirza, K. Inaba, and R. M. Steinman. 1995. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol* 163: 157-162.
83. Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151: 673-684.
84. Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R. M. Steinman, and K. Inaba. 2002. The CD8+Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 195: 1289-1302.

85. Lahoud, M. H., F. Ahmet, J. G. Zhang, S. Meuter, A. N. Policheni, S. Kitsoulis, C. N. Lee, M. O'Keeffe, L. C. Sullivan, A. G. Brooks, R. Berry, J. Rossjohn, J. D. Mintern, J. Vega-Ramos, J. A. Villadangos, N. A. Nicola, M. C. Nussenzweig, K. J. Stacey, K. Shortman, W. R. Heath, and I. Caminschi. 2012. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16270-16275.
86. Sancho, D., and C. Reis e Sousa. 2012. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 30: 491-529.
87. Li, D., G. Romain, A. L. Flamar, D. Duluc, M. Dullaers, X. H. Li, S. Zurawski, N. Bosquet, A. K. Palucka, R. Le Grand, A. O'Garra, G. Zurawski, J. Banchereau, and S. Oh. 2012. Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *J Exp Med* 209: 109-121.
88. Uto, T., T. Fukaya, H. Takagi, K. Arimura, T. Nakamura, N. Kojima, B. Malissen, and K. Sato. 2016. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity. *Nat Commun* 7: 11273.
89. Jones, A., J. Bourque, L. Kuehm, A. Opejin, R. M. Teague, C. Gross, and D. Hawiger. 2016. Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity* 45: 1066-1077.
90. Yamazaki, S., D. Dudziak, G. F. Heidkamp, C. Fiorese, A. J. Bonito, K. Inaba, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2008. CD8+CD205+ Splenic Dendritic Cells Are Specialized to Induce Foxp3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 181: 6923-6933.
91. Schildknecht, A., S. Brauer, C. Brenner, K. Lahl, H. Schild, T. Sparwasser, H. C. Probst, and M. van den Broek. 2010. FoxP3+ regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8+ T-cell tolerance induced by steady-state dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 199-203.
92. Darrasse-Jeze, G., S. Deroubaix, H. Mouquet, G. D. Victora, T. Eisenreich, K. H. Yao, R. F. Masilamani, M. L. Dustin, A. Rudensky, K. Liu, and M. C. Nussenzweig. 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 206: 1853-1862.

93. Kohli, K., A. Janssen, and R. Forster. 2016. Plasmacytoid dendritic cells induce tolerance predominantly by cargoing antigen to lymph nodes. *Eur J Immunol*.
94. Gehrie, E., W. Van der Touw, J. S. Bromberg, and J. C. Ochando. 2011. Plasmacytoid dendritic cells in tolerance. *Methods Mol Biol* 677: 127-147.
95. LeibundGut-Landmann, S., J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2004. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 34: 1513-1525.
96. LeibundGut-Landmann, S., J. M. Waldburger, C. Reis e Sousa, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2004. MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 5: 899-908.
97. Irla, M., N. Kupfer, T. Suter, R. Lissilaa, M. Benkhoucha, J. Skupsky, P. H. Lalive, A. Fontana, W. Reith, and S. Hugues. 2010. MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 207: 1891-1905.
98. Martin, P., G. M. Del Hoyo, F. Anjuere, C. F. Arias, H. H. Vargas, L. A. Fernandez, V. Parrillas, and C. Ardavin. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100: 383-390.
99. Manches, O., D. Munn, A. Fallahi, J. Lifson, L. Chaperot, J. Plumas, and N. Bhardwaj. 2008. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* 118: 3431-3439.
100. Wang, L., K. Pino-Lagos, V. C. de Vries, I. Guleria, M. H. Sayegh, and R. J. Noelle. 2008. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9331-9336.
101. Hadeiba, H., T. Sato, A. Habtezion, C. Oderup, J. Pan, and E. C. Butcher. 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9: 1253-1260.
102. Jongbloed, S. L., R. A. Benson, M. B. Nickdel, P. Garside, I. B. McInnes, and J. M. Brewer. 2009. Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate Breach of Self-Tolerance in Autoimmune Arthritis. *The Journal of Immunology* 182: 963-968.

103. Dubois, B., G. Joubert, M. Gomez de Agüero, M. Gouanvic, A. Goubier, and D. Kaiserlian. 2009. Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* 137: 1019-1028.
104. Vitali, C., F. Mingozi, A. Broggi, S. Barresi, F. Zolezzi, J. Bayry, G. Raimondi, I. Zanoni, and F. Granucci. 2012. Migratory, and not lymphoid-resident, dendritic cells maintain peripheral self-tolerance and prevent autoimmunity via induction of iTreg cells. *Blood* 120: 1237-1245.
105. Bennett, C. L., E. van Rijn, S. Jung, K. Inaba, R. M. Steinman, M. L. Kapsenberg, and B. E. Clausen. 2005. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169: 569-576.
106. Idoyaga, J., C. Fiorese, L. Zbytnuik, A. Lubkin, J. Miller, B. Malissen, D. Mucida, M. Merad, and R. M. Steinman. 2013. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest* 123: 844-854.
107. Anandasabapathy, N., R. Feder, S. Mollah, S. W. Tse, M. P. Longhi, S. Mehandru, I. Matos, C. Cheong, D. Ruane, L. Brane, A. Teixeira, J. Dobrin, O. Mizenina, C. G. Park, M. Meredith, B. E. Clausen, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2014. Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *J Exp Med* 211: 1875-1891.
108. Guilliams, M., K. Crozat, S. Henri, S. Tamoutounour, P. Grenot, E. Devilard, B. de Bovis, L. Alexopoulou, M. Dalod, and B. Malissen. 2010. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* 115: 1958-1968.
109. Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204: 1775-1785.
110. Matteoli, G., E. Mazzini, I. D. Iliev, E. Mileti, F. Fallarino, P. Puccetti, M. Chieppa, and M. Rescigno. 2010. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 59: 595-604.
111. Muzaki, A. R., P. Tetlak, J. Sheng, S. C. Loh, Y. A. Setiagani, M. Poidinger, F. Zolezzi, K. Karjalainen, and C. Ruedl. 2016. Intestinal CD103(+)/CD11b(-) dendritic

- cells restrain colitis via IFN-gamma-induced anti-inflammatory response in epithelial cells. *Mucosal Immunol* 9: 336-351.
112. Janelsins, B. M., M. Lu, and S. K. Datta. 2014. Altered inactivation of commensal LPS due to acyloxyacyl hydrolase deficiency in colonic dendritic cells impairs mucosal Th17 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 373-378.
 113. Steimle, A., and J. S. Frick. 2016. Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *J Immunol Res* 2016: 1958650.
 114. Lai, W. K., S. M. Curbishley, S. Goddard, E. Alabraba, J. Shaw, J. Youster, J. McKeating, and D. H. Adams. 2007. Hepatitis C is associated with perturbation of intrahepatic myeloid and plasmacytoid dendritic cell function. *J Hepatol* 47: 338-347.
 115. Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2: 725-731.
 116. Kalinski, P., C. M. Hilkens, A. Snijders, F. G. Snijdewint, and M. L. Kapsenberg. 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 159: 28-35.
 117. Selenko-Gebauer, N., O. Majdic, A. Szekeres, G. Hofler, E. Guthann, U. Korthauer, G. Zlabinger, P. Steinberger, W. F. Pickl, H. Stockinger, W. Knapp, and J. Stockl. 2003. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol* 170: 3637-3644.
 118. Popov, A., J. Driesen, Z. Abdullah, C. Wickenhauser, M. Beyer, S. Debey-Pascher, T. Saric, S. Kummer, O. Takikawa, E. Domann, T. Chakraborty, M. Kronke, O. Utermohlen, and J. L. Schultze. 2008. Infection of Myeloid Dendritic Cells with *Listeria monocytogenes* Leads to the Suppression of T Cell Function by Multiple Inhibitory Mechanisms. *The Journal of Immunology* 181: 4976-4988.
 119. Schmidt, S. V., A. C. Nino-Castro, and J. L. Schultze. 2012. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol* 3: 274.
 120. Sevilla, N., D. B. McGavern, C. Teng, S. Kunz, and M. B. A. Oldstone. 2004. Viral targeting of hematopoietic progenitors and inhibition of DC maturation as a dual strategy for immune subversion. *Journal of Clinical Investigation* 113: 737-745.

121. Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E. A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M. R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R. S. Balderas, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12: 1198-1202.
122. Penna, A., M. Pilli, A. Zerbini, A. Orlandini, S. Mezzadri, L. Sacchelli, G. Missale, and C. Ferrari. 2007. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 45: 588-601.
123. Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27: 111-122.
124. Francisco, L. M., V. H. Salinas, K. E. Brown, V. K. Vanguri, G. J. Freeman, V. K. Kuchroo, and A. H. Sharpe. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206: 3015-3029.
125. Hotta-Iwamura, C., and K. V. Tarbell. 2016. Type 1 diabetes genetic susceptibility and dendritic cell function: potential targets for treatment. *J Leukoc Biol* 100: 65-80.
126. Amodio, G., and S. Gregori. 2012. Dendritic cells a double-edge sword in autoimmune responses. *Front Immunol* 3: 233.
127. Lopez de Padilla, C. M., and A. M. Reed. 2007. Involvement of dendritic cells in autoimmune diseases in children. *Pediatr Rheumatol Online J* 5: 16.
128. Santin, I., and D. L. Eizirik. 2013. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and beta-cell apoptosis. *Diabetes Obes Metab* 15 Suppl 3: 71-81.
129. Ferreira, R. C., H. Guo, R. M. Coulson, D. J. Smyth, M. L. Pekalski, O. S. Burren, A. J. Cutler, J. D. Doecke, S. Flint, E. F. McKinney, P. A. Lyons, K. G. Smith, P. Achenbach, A. Beyerlein, D. B. Dunger, D. G. Clayton, L. S. Wicker, J. A. Todd, E. Bonifacio, C. Wallace, and A. G. Ziegler. 2014. A type I interferon transcriptional signature precedes autoimmunity in children genetically at risk for type 1 diabetes. *Diabetes* 63: 2538-2550.
130. Obermoser, G., R. D. Sontheimer, and B. Zelger. 2010. Overview of common, rare and atypical manifestations of cutaneous lupus erythematosus and histopathological correlates. *Lupus* 19: 1050-1070.

131. Palucka, A. K., J. Banchereau, P. Blanco, and V. Pascual. 2002. The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol* 80: 484-488.
132. Chaussabel, D., C. Quinn, J. Shen, P. Patel, C. Glaser, N. Baldwin, D. Stichweh, D. Blankenship, L. Li, I. Munagala, L. Bennett, F. Allantaz, A. Mejias, M. Ardura, E. Kaizer, L. Monnet, W. Allman, H. Randall, D. Johnson, A. Lanier, M. Punaro, K. M. Wittkowski, P. White, J. Fay, G. Klintmalm, O. Ramilo, A. K. Palucka, J. Banchereau, and V. Pascual. 2008. A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus. *Immunity* 29: 150-164.
133. Niewold, T. B. 2014. Type I interferon in human autoimmunity. *Front Immunol* 5: 306.
134. Meyer, O. 2009. Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine* 76: 464-473.
135. Diana, J., Y. Simoni, L. Furio, L. Beaudoin, B. Agerberth, F. Barrat, and A. Lehuen. 2013. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med* 19: 65-73.
136. Li, Q., B. Xu, S. A. Michie, K. H. Rubins, R. D. Schreiber, and H. O. McDevitt. 2008. Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12439-12444.
137. Carrero, J. A., B. Calderon, F. Towfic, M. N. Artyomov, and E. R. Unanue. 2013. Defining the transcriptional and cellular landscape of type 1 diabetes in the NOD mouse. *PLoS One* 8: e59701.
138. Rahman, M. J., G. Rahir, M. B. Dong, Y. Zhao, K. B. Rodrigues, C. Hotta-Iwamura, Y. Chen, A. Guerrero, and K. V. Tarbell. 2016. Despite Increased Type 1 IFN, Autoimmune Nonobese Diabetic Mice Display Impaired Dendritic Cell Response to CpG and Decreased Nuclear Localization of IFN-Activated STAT1. *J Immunol* 196: 2031-2040.
139. Poligone, B., D. J. Weaver, Jr., P. Sen, A. S. Baldwin, Jr., and R. Tisch. 2002. Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol* 168: 188-196.
140. Weaver, D. J., Jr., B. Poligone, T. Bui, U. M. Abdel-Motal, A. S. Baldwin, Jr., and R. Tisch. 2001. Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF-kappa B regulation due to a hyperactive I kappa B kinase. *J Immunol* 167: 1461-1468.

141. Mayer-Barber, K. D., and B. Yan. 2016. Clash of the Cytokine Titans: counter-regulation of interleukin-1 and type I interferon-mediated inflammatory responses. *Cell Mol Immunol*.
142. Blanco, P., A. K. Palucka, V. Pascual, and J. Banchereau. 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 41-52.
143. Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspod, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J. W. Fay, V. Pascual, A. K. Palucka, and J. Banchereau. 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 219: 118-142.
144. Chen, Y. G., S. M. Cabrera, S. Jia, M. L. Kaldunski, J. Kramer, S. Cheong, R. Geoffrey, M. F. Roethle, J. E. Woodliff, C. J. Greenbaum, X. Wang, and M. J. Hessner. 2014. Molecular signatures differentiate immune states in type 1 diabetic families. *Diabetes* 63: 3960-3973.
145. Price, J. D., N. M. Beauchamp, G. Rahir, Y. Zhao, C. C. Rieger, A. W. Lau-Kilby, and K. V. Tarbell. 2014. CD8+ dendritic cell-mediated tolerance of autoreactive CD4+ T cells is deficient in NOD mice and can be corrected by blocking CD40L. *J Leukoc Biol* 95: 325-336.
146. Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer, and P. Santamaria. 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 19: 877-889.
147. Vaitaitis, G. M., M. H. Olmstead, D. M. Waid, J. R. Carter, and D. H. Wagner, Jr. 2014. A CD40-targeted peptide controls and reverses type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetologia* 57: 2366-2373.
148. Mahmoud, T. I., J. Wang, J. L. Karnell, Q. Wang, S. Wang, B. Naiman, P. Gross, P. Z. Brohawn, C. Morehouse, J. Aoyama, C. Wasserfall, L. Carter, M. A. Atkinson, D. V. Serreze, H. Braley-Mullen, T. Mustelin, R. Kolbeck, R. Herbst, and R. Ettinger. 2016. Autoimmune manifestations in aged mice arise from early-life immune dysregulation. *Sci Transl Med* 8: 361ra137.
149. Lee, C. N., A. M. Lew, K. Shortman, and L. Wu. 2015. NOD mice are functionally deficient in the capacity of cross-presentation. *Immunol Cell Biol* 93: 548-557.

150. Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12: 557-569.
151. Ferris, S. T., J. A. Carrero, J. F. Mohan, B. Calderon, K. M. Murphy, and E. R. Unanue. 2014. A minor subset of batf3-dependent antigen-presenting cells in islets of langerhans is essential for the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 41: 657-669.
152. Pelletier, A. N., and S. Lesage. 2013. The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *J Autoimmun* 43: 70-77.
153. Katz, J. D., J. K. Ondr, R. J. Opoka, Z. Garcia, and E. M. Janssen. 2010. Cutting edge: Merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes. *J Immunol* 185: 1999-2003.
154. Thacker, R. I., and E. M. Janssen. 2012. Cross-presentation of cell-associated antigens by mouse splenic dendritic cell populations. *Frontiers in immunology* 3: 41.
155. Mohan, J. F., and E. R. Unanue. 2012. Unconventional recognition of peptides by T cells and the implications for autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 12: 721-728.
156. Greter, M., F. L. Heppner, M. P. Lemos, B. M. Odermatt, N. Goebels, T. Laufer, R. J. Noelle, and B. Becher. 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11: 328-334.
157. Bailey-Bucktrout, S. L., S. C. Caulkins, G. Goings, J. A. A. Fischer, A. Dzionek, and S. D. Miller. 2008. Cutting Edge: Central Nervous System Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate the Severity of Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 180: 6457-6461.
158. Ioannou, M., T. Alissafi, L. Boon, D. Boumpas, and P. Verginis. 2013. In vivo ablation of plasmacytoid dendritic cells inhibits autoimmunity through expansion of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 190: 2631-2640.
159. Koyama, M., M. Cheong, K. A. Markey, K. H. Gartlan, R. D. Kuns, K. R. Locke, K. E. Lineburg, B. E. Teal, L. Leveque-El Mouttie, M. D. Bunting, S. Vuckovic, P. Zhang, M. W. Teng, A. Varelias, S. K. Tey, L. F. Wockner, C. R. Engwerda, M. J. Smyth, G. T. Belz, S. R. McColl, K. P. MacDonald, and G. R. Hill. 2015. Donor colonic CD103+

- dendritic cells determine the severity of acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 212: 1303-1321.
160. Leveque-El Mouttie, L., M. Koyama, L. Le Texier, K. A. Markey, M. Cheong, R. D. Kuns, K. E. Lineburg, B. E. Teal, K. A. Alexander, A. D. Clouston, B. R. Blazar, G. R. Hill, and K. P. MacDonald. 2016. Corruption of dendritic cell antigen presentation during acute GVHD leads to regulatory T-cell failure and chronic GVHD. *Blood* 128: 794-804.
161. Gauthier, S. D., D. Leboeuf, R. Manuguerra-Gagne, L. Gaboury, and M. Guimond. 2015. Stromal-Derived Factor-1alpha and Interleukin-7 Treatment Improves Homeostatic Proliferation of Naive CD4(+) T Cells after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 1721-1731.
162. Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph, and J. S. Bromberg. 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7: 652-662.
163. Yun, T. J., J. S. Lee, K. Machmach, D. Shim, J. Choi, Y. J. Wi, H. S. Jang, I. H. Jung, K. Kim, W. K. Yoon, M. A. Miah, B. Li, J. Chang, M. G. Bego, T. N. Pham, J. Loschko, J. H. Fritz, A. B. Krug, S. P. Lee, T. Keler, J. V. Guimond, E. Haddad, E. A. Cohen, M. G. Sirois, I. El-Hamamsy, M. Colonna, G. T. Oh, J. H. Choi, and C. Cheong. 2016. Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Expressing Aortic Plasmacytoid Dendritic Cells Protect against Atherosclerosis by Induction of Regulatory T Cells. *Cell Metab* 23: 852-866.
164. Jongbloed, S. L., A. J. Kassianos, K. J. McDonald, G. J. Clark, X. Ju, C. E. Angel, C. J. Chen, P. R. Dunbar, R. B. Wadley, V. Jeet, A. J. Vulink, D. N. Hart, and K. J. Radford. 2010. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 207: 1247-1260.
165. Robbins, S. H., T. Walzer, D. Dembele, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, F. R. Sharp, S. Chan, P. Kastner, and M. Dalod. 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 9: R17.

166. Williams, M., C. A. Dutertre, C. L. Scott, N. McGovern, D. Sichen, S. Chakarov, S. Van Gassen, J. Chen, M. Poidinger, S. De Pijck, S. J. Tavernier, I. Low, S. E. Irac, C. N. Mattar, H. R. Sumatoh, G. H. Low, T. J. Chung, D. K. Chan, K. K. Tan, T. L. Hon, E. Fossum, B. Bogen, M. Choolani, J. K. Chan, A. Larbi, H. Luche, S. Henri, Y. Saeys, E. W. Newell, B. N. Lambrecht, B. Malissen, and F. Ginhoux. 2016. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* 45: 669-684.

Figures

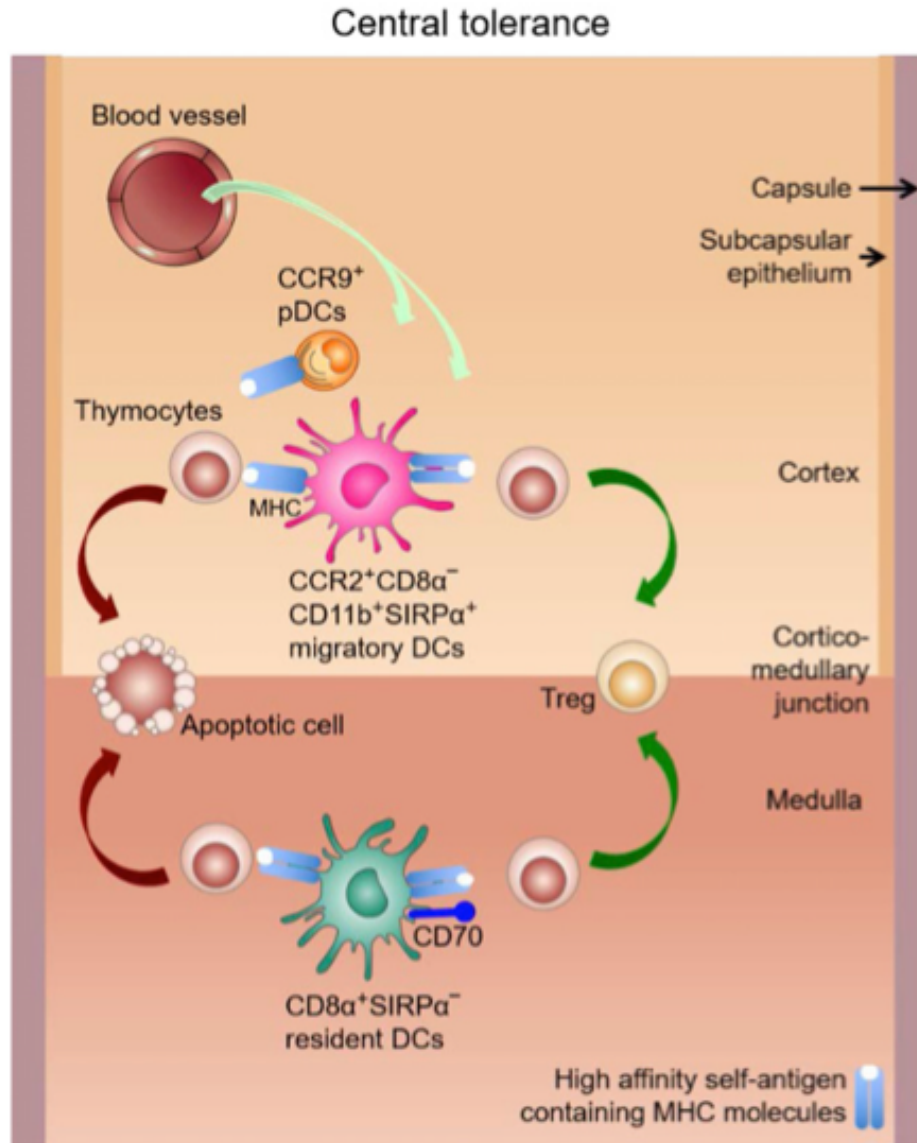


Figure 1. DC-mediated central tolerance.

Migratory $CD11b^+ CCR2^+$ DCs and $CCR9^+$ pDCs migrate from periphery to the thymic cortex and induce tolerance to peripheral self-antigens by inducing apoptosis of autoreactive thymocytes. Migratory DCs also promote Treg differentiation. $CD8\alpha^+$ resident DCs induce apoptosis of thymocytes reactive to self-antigens and promote Treg differentiation and survival.

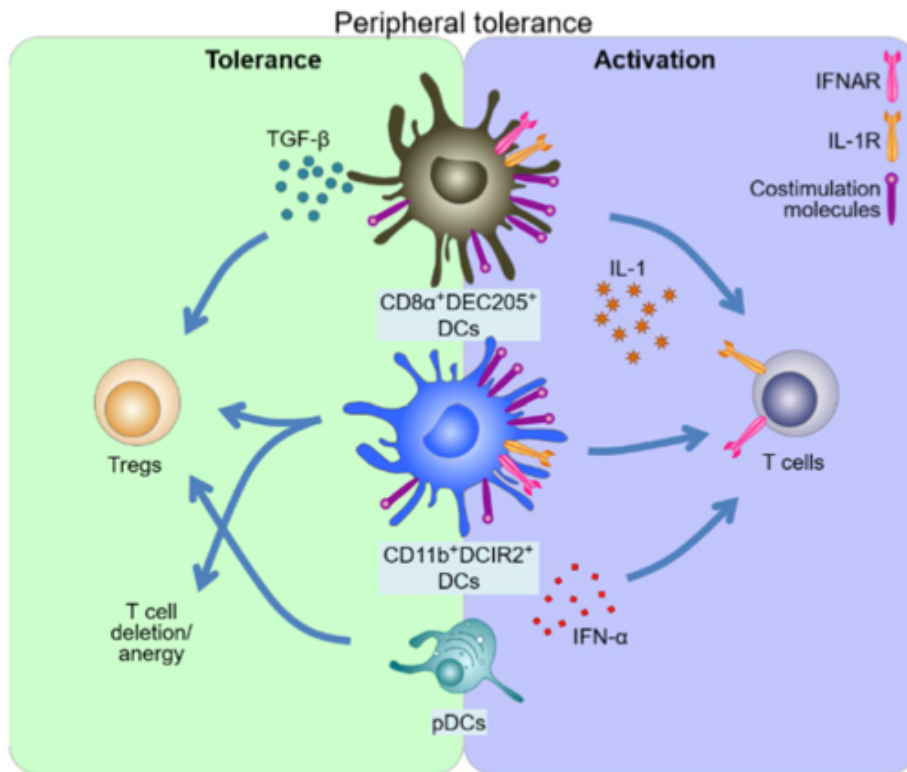


Figure 2. DC-mediated peripheral tolerance.

cDCs and pDCs induce tolerance by promoting Treg differentiation or function.

cDCs can also induce peripheral tolerance by inducing T cell anergy or T cell

deletion. In inflammatory conditions, cDCs and pDCs promote T cell activation.

