

Université de Montréal

**Analyse d'une nouvelle forme de mort cellulaire
induite par CD47 dans les lymphocytes**

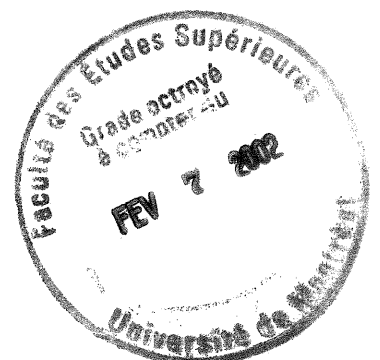
Par
Véronique Mateo

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en microbiologie et immunologie

Novembre 2001

© Véronique Mateo, 2001.



W
4
U58
2002
v.024

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Analyse d'une nouvelle forme de mort cellulaire
induite par CD47 dans les lymphocytes**

Présentée par :
Véronique Mateo

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur: Dr. Rafick-Pierre Sekaly

Directeur de recherche : Dr. Marika Sarfati

Membre du jury : Dr. Denis C. Roy

Examinateur externe : Dr. Santos Susin

ABSTRACT

Cell death has become one of the most studied biologic research fields for the last ten years. Novel insights have enriched seminal discoveries in cell-death processes. The work presented in this thesis contributed to this knowledge.

We herein report the description of a novel form of cell death, induced by ligation of the ubiquitously expressed CD47 antigen. The cell death was characterized by the cytoplasmic features of apoptosis including cell shrinkage, phosphatidylserine (PS) exposure to the outer leaflet of the cytoplasmic membrane and drop in mitochondrial membrane potential with maintenance of cytoplasmic membrane integrity. By contrast, caspases, the proteolytic enzymes responsible for the major biochemical and morphological changes observed during apoptosis, remained in their unprocessed forms and inactivated. In addition, no nuclear changes were observed during this novel cell-death process. CD47-induced cell-death signaling required the extracellular and transmembrane domains of the molecule. No other known CD47 signaling pathways appeared to be involved during this cell death process. However, cytoskeleton reorganization, cell volume regulation by potassium efflux, and an antimycin A sensitive signaling pathway were implicated in CD47-induced cell-death signal.

This novel cell-death can be triggered in various cell lines of the hematopoietic system and in B-cells from chronic lymphocytic leukemia patients (B-CLL). Nonetheless, hematopoietic stem cells, the renewal source of the lymphocytic and myeloid pools remained totally resistant to CD47-induced killing. We observed CD47-induced cell-death in all B-CLL patients tested regardless the presence of survival factors that are thought to be responsible for the incurable state of the disease. Moreover, B-CLL killed by CD47 ligation were efficiently cleared by immature dendritic cells through a phagocytosis mechanism, indicating that this

previously non-described cell-death process was effective. The discovery and characterization of CD47-induced caspase-independent cell-death might open new therapeutic avenues for B-CLL disease.

Key words: Human;
Immunology;
Cell-death;
CD47-antigen;
Chronic Lymphocytic Leukaemia;
Lymphocytes;
Dendritic cells;
Phagocytosis;
Caspases;
Mitochondria;

SOMMAIRE

L'étude de la mort cellulaire a connu un essor considérable, ces dix dernières années. À de grands concepts généraux se sont ajoutées de nouvelles voies qui viennent enrichir et diversifier le terme générique de mort cellulaire. Le travail présenté dans cette thèse contribue à élargir les connaissances acquises dans le domaine de la mort cellulaire programmée des cellules de la lignée hématopoïétique.

Nous rapportons que l'engagement de l'antigène ubiquitaire CD47 induit une nouvelle forme de mort cellulaire, qui se caractérise par des événements cytoplasmiques de l'apoptose, comme l'ecto-exposition des phosphatidylsérines, la diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité membranaire et la chute du potentiel membranaire mitochondrial. Par contre, l'activation des protéases tenues responsables de la plupart des modifications cytologiques de l'apoptose, les caspases, n'est pas observée. Enfin, les noyaux des cellules tuées par CD47 restent intacts. Cette signalisation mortelle nécessite les domaines extracellulaire et transmembranaire de la molécule, mais semble être indépendante des principales voies de signalisation déjà décrites pour CD47 et l'apoptose classique. Toutefois, la réorganisation du cytosquelette, la mise en place d'un efflux potassique et la participation d'une voie de signalisation inhibée par l'antimycine A, sont impliquées dans cette nouvelle forme de mort cellulaire programmée.

Nous avons observé l'effet mortel de CD47 dans différentes cellules du système immunitaire et dans les lymphocytes B issus de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC). Par contre, les cellules souches de la lignée hématopoïétique, nécessaire au renouvellement des populations lymphoïdes et myéloïdes, sont totalement résistantes à cette forme de mort cellulaire. Nous avons constaté que tous les lymphocytes B de LLC testés sont sensibles à CD47,

et ce même en présence des facteurs de survie de la LLC tenus en partie responsables de l'étiologie de la maladie et de son caractère incurable. De plus, nous montrons que les cellules B de LLC tués par CD47 sont efficacement phagocytés par des cellules dendritiques immatures, indiquant que cette mort particulière conduit à l'élimination effective de celles-ci. La description et la caractérisation de cette nouvelle voie d'induction de mort cellulaire, qui font l'objet de cette thèse, ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la LLC.

Mots clés : Humain
Immunologie
Leucémie Lymphoïde Chronique
Cellules Dendritiques
Caspases
Mitochondrie
Phagocytose
Cytosquelette
Apoptose
Inflammation

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
INTRODUCTION	1
1. La mort cellulaire chez les métazoaires	2
1.1. Généralités	2
1.2. L'apoptose	3
1.2.1. Rôle physiologique	3
1.2.2. Caractéristiques morphologiques	5
1.2.3. Caractéristiques biochimiques	7
1.2.3.1. <i>Les caspases</i>	8
1.2.3.2. <i>Les récepteurs de mort</i>	14
1.2.3.3. <i>Les protéines de la famille Bcl-2</i>	16
1.2.3.4. <i>Mécanismes intrinsèques de contrôle de l'apoptose</i>	19
1.3. La nécrose	21
1.3.1. Implications physiologiques	21
1.3.2. Signes distinctifs – Particularités	22
2. Rôle de la mort cellulaire dans le système immunitaire	23
2.1. Développement des lymphocytes B et T	23
2.2. Réponse immunitaire	25
3. La leucémie lymphoïde chronique	28
3.1. Définition	28
3.2. Néoplasie typique d'un défaut d'apoptose	29
3.2.1. Anomalies chromosomiques	30
3.2.2. Résistances multiples à l'apoptose	30
3.2.3. Facteurs de survie de la cellule B de LLC	31
3.3. Cas du CD23 dans la LLC	33
4. La molécule CD47	34
4.1. Description	34
4.2. Fonctions liées aux intégrines	35
4.3. Autres fonctions	36
RÉSULTATS	39
1. Article I	40
2. Article II	70
3. Article III	102

DISCUSSION	131
1. Redéfinition de la mort cellulaire programmée	132
1.1. Mort « cytoplasmique »	132
1.2. Mort « nucléaire »	135
2. Les caspases : pas uniquement des tueuses	140
2.1. Absence d'activation des caspases dans l'apoptose	140
2.2. Coexistence de voies non dépendantes des caspases dans la mort cellulaire	142
2.2.1. Mort induite par les récepteurs de la famille des TNFRs	142
2.2.2. Autres voies	143
2.3. Activation des caspases en l'absence de mort cellulaire	145
3. Implications physiologiques et régulation des fonctions de CD47 dans le système hématopoïétique	146
3.1. Implications dans la régulation de la mort cellulaire	146
3.2. Signalisation dans la mort induite via CD47	151
3.2.1. Implication du cytosquelette	151
3.2.2. Les PKC, la mort cellulaire et CD47	154
3.2.3. L'efflux potassique	156
3.2.4. La perte du potentiel membranaire mitochondrial : cause ou conséquence de la mort cellulaire induite via CD47	157
3.3. Implications lors de l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes professionnels	164
3.3.1. Généralités et bases moléculaires de la reconnaissance des cellules en apoptose.	164
3.3.2. CD47 et la phagocytose	165
3.4. Implications dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire	167
4. Conclusion générale	170
4.1. Thérapeutique dans la LLC	170
4.2. Synthèses	173
4.2.1. Signalisation de la mort cellulaire induite par CD47.	173
4.2.2. Immunomodulation via CD47	175
BIBLIOGRAPHIE	177

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** : Phénotypes des souris déficientes pour différentes caspases. **p. 11**
- Tableau II** : Système de classification Rai et Binet pour la leucémie lymphoïde chronique. **p. 30 bis**
- Article I, Table I** : Reduced B-CLL-viability on immobilized CD47 mAb. **p. 54**
- Article III, Table I** : IFN- γ fails to prevent inhibition of cytokine production by CD47 engagement on DCs. **p. 114**
- Tableau III** : Liste des inhibiteurs testés et leurs effets sur la mort induite par l'engagement de CD47. **p. 148**

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Changements morphologiques survenant lors de l'apoptose et de la nécrose. **p. 6**
- Figure 2** : Représentation schématique de quatorze membres de la famille des caspases. **p. 10**
- Figure 3** : Représentation schématique de seize membres de la famille de Bcl-2. **p. 18**
- Figure 4** : Quelques voies de signalisations pouvant survenir dans un lymphocyte lors de l'apoptose. **p. 20 bis**
- Figure 5** : Structure de la molécule CD47. **p. 34 bis**
-
- Article I, figure 1** : CD5 and CD23 expression on B-CLL lymphocytes after treatment with monoclonal antibody against CD47. **p. 55**
- Article I, figure 2** : CD47 ligation by immobilized monoclonal antibody against CD47 or by thrombospondin (TSP) induces apoptosis in B-CLL cells. **p. 56**
- Article I, figure 3** : Induction of apoptosis by monoclonal antibody against CD47 is CD47-mediated but not Fc-mediated and requires CD47 cross-linking. **p. 57**
- Article I, figure 4** : Apoptosis induced by monoclonal antibody against CD47 is not prevented by survival factors or cell activation. **p. 58**
- Article I, figure 5** : CD47 induces a caspase-independent cell death. **p. 59**
- Article I, figure 6** : Morphology of B-CLL cells treated with monoclonal antibody against CD47. **p. 60-61**
- Article I, figure 7** : Electron micrographs of B-CLL cells. **p. 62-63**
-
- Article II, figure 1** : Immature dendritic cells efficiently phagocytosed B-CLL cells killed by CD47-induced caspase-independent cell pathway. **p. 91**
- Article II, figure 2** : Differential susceptibility of normal human blood cells to CD47-induced cell-death. **p. 92**
- Article II, figure 3** : Susceptibility of human cell lines to CD47-induced cell-death: Lack of correlation between CD47 expression and CD47-induced cell death. **p. 93**
- Article II, figure 4** : Requirement of both extracellular and transmembrane domains for CD47-induced cell-death. **p. 94-95**

Article II, figure 5 : Down-regulation of CD47-induced PS-exposure by K⁺ efflux or Antimycine A treatment : lack of effect of PKC inhibitor rottlerin. **p. 96**

Article II, figure 6 : Link between CD47-induced PS exposure and cytoskeleton rearrangement. **p. 97**

Article III, figure 1 : DCs express the CD47 Ag. **p. 115**

Article III, figure 2 : CD47 ligation inhibits cytokine release by monocyte-derived DCs. **p. 116**

Article III, figure 3 : Suppression of cytokine production by intact or F(ab')₂ of CD47 Abs and synthetic peptide. **p. 117**

Article III, figure 4 : Suppression of cytokine production by CD47 mAbs is IL-10 independent. **p. 118**

Article III, figure 5 : CD47 engagement prevents SAC-induced DC maturation. **p. 119**

Article III, figure 6 : CD47 engagement during SAC-induced DC maturation impairs their ability to stimulate allogenic T cells. **p. 120**

Article III, figure 7 : Maturation of iDCs in the presence of anti-CD47 mAb does not alter the capacity of mDCs to produce IL-12 and IL-18. **p. 121**

Article III, figure 8 : CD47 engagement does not affect the endocytic and phagocytic capacities of iDCs. **p. 122**

Figure 6 : Effets comparés de l'antimycine A et de l'oligomycine sur l'exposition des PS et la chute du $\Delta\psi_m$. **p. 160**

Figure 7 : Conversion du patient « B ». **p. 171**

Figure 8 : Signalisation de la mort cellulaire par l'engagement de CD47. **p. 174**

Figure 9 : Régulation de la réponse inflammatoire par CD47. **p. 176**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac :	Anticorps
ADN :	Acide desoxyribonucléique
AICD :	Activation Induced Cell Death
AIF :	Apoptosis-Inducing Factor
Apaf-1 :	Apoptotic protease-activating factor 1
APC :	Antigen-presenting cells
CAD :	Caspase-Activated Deoxyribonuclease
CARD :	Caspase Recruitment Domain
CD :	Clusters of Differentiation
CED :	Cell Death abnormal
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DED :	Death Effector Domain
DD :	Death Domain
DISC :	Death-Inducing Signaling Complex
$\Delta\psi_m$:	Potentiel membranaire mitochondrial
HC :	Hydrocortisone
HLA :	Human Leucocyte Antigen
ICAD :	Inhibiteur de CAD
Ig	Immunoglobuline
IL- :	Interleukine
IFN :	Interferon
LLC :	Leucémie Lymphoïde Chronique
NK :	Natural Killer
PARP :	Poly ADP Ribose Polymerase
PMM :	Perméabilité membranaire mitochondriale

PTK :	Protéine tyrosine kinase
PS :	Phosphatidylsérine
RIP :	Receptor-interacting protein
SIDA :	Syndrome d'Immuno-déficience Acquise
TGF :	Tumor Growth Factor
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TNFR :	TNF-Receptor
TUNEL :	TdT-dependent dUTP-biotin Nick End Labelling
WASP :	Wiskott-Aldrich syndrome protein

REMERCIEMENTS

Un grand merci à ma directrice de recherches, D^r Marika Sarfati, pour son enseignement scientifique rigoureux, sa grande disponibilité et son écoute toujours attentive. Je lui sais également gré de sa générosité, elle qui partage son savoir et son temps sans compter, ainsi que de ses conseils précieux.

Je tiens aussi à remercier le D^r Guy Delespesse de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir transmis le sens de l'analyse.

Merci à Manuel Rubio pour son assistance technique de grande qualité et nos parties de rigolade.

Merci également au D^r Guy Biron du Département d'hématologie du CHUM, sans qui ce travail, pour lequel il a montré un grand intérêt, aurait pu difficilement se faire.

J'exprime enfin toute ma reconnaissance aux D^r Rafick P. Sékaly, Denis C. Roy et Santos Susin d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

INTRODUCTION

1. La mort cellulaire chez les métazoaires

1.1. Généralités

On distingue deux grands types de mort cellulaire chez les organismes pluricellulaires ; l'apoptose et la nécrose. L'apoptose est une mort cellulaire physiologique ordonnée, prédéterminée par un programme génétique et biochimique rigoureusement contrôlé. C'est un processus actif qui nécessite de l'énergie ; d'où le terme anthropomorphique alternativement employé de « suicide cellulaire ». À l'inverse, la nécrose est une mort cellulaire accidentelle passive sans programme identifié, et qui survient en absence d'énergie. Elle fait généralement suite à une lésion cellulaire importante, provoquée par une forte altération du milieu extracellulaire. L'apoptose peut n'affecter qu'une seule cellule au sein d'un tissu, alors que la nécrose touche souvent un ensemble de cellules. On ne discrimine habituellement la nécrose de l'apoptose que par des caractéristiques essentiellement morphologiques, ce qui peut s'avérer équivoque. En effet, le terme générique de nécrose est souvent employé pour décrire des types de mort cellulaire dont les caractéristiques morphologiques ne suivent pas les schémas conventionnels de l'apoptose (décrits au paragraphe 1.2), mais qui cependant sont des processus physiologiques^(1, 2), impliquant parfois les mêmes signaux d'initiation nécessaires à l'apoptose classique⁽³⁻⁵⁾. Il semble donc que l'apoptose et la nécrose puissent représenter les deux extrêmes d'une variété de formes de mort cellulaire aux caractéristiques morphologiques et biochimiques diversifiées^(3, 6, 7). Par souci de clarté, nous utiliserons le terme « mort cellulaire programmée » le plus souvent dans cette thèse. Cette mort programmée pouvant être de type apoptotique, nécrotique ou autre⁽⁷⁾.

Le domaine de la biologie qui s'intéresse à la mort cellulaire a connu un essor considérable ces cinq dernières années. Rien qu'en l'année 2000, plus de 10 000 publications ont traité de ce sujet. Ce champ d'étude concerne toutes les disciplines de la biologie, de l'embryologie à l'étude du vieillissement, en passant par l'oncologie, l'immunologie, la neurologie etc.... De très nombreuses voies conduisant à de nouvelles formes de mort cellulaire ont été identifiées ces 20 dernières années. Elles ont introduit de nouveaux concepts et terminologies⁽⁸⁾. Toutefois nous n'entrerons pas ici dans la polémique sémantique concernant les divers vocables proposés [Apoïkis, Autophagie, Nécrapoptose, Oncose, Thanaptosis etc....]. D'un point de vue phylogénétique, la mort cellulaire programmée est un processus très conservé, puisqu'elle intervient dans le développement de tous les métazoaires⁽⁹⁾ et existe même chez les plantes lors la chute des feuilles ou la formation de l'écorce⁽¹⁾. Au demeurant, les bases moléculaires de la mort cellulaire programmée sont posées par Horvitz et son équipe dans les années 80, grâce à l'étude d'un petit ver d'à peine 1 mm de long, le nématode *Ceanorhabditis elegans*. Les gènes *ced* (*cell death abnormal*) aujourd'hui fameux sont ainsi identifiés^(10, 11).

1.2. L'apoptose

1.2.1. Rôle physiologique

La survie d'un organisme multicellulaire dépend du fonctionnement de groupes de cellules différenciées qui constituent les différents tissus, membres et organes du corps. Un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire assure leur développement harmonieux, leur renouvellement et leur maintien. Chez les vertébrés, le renouvellement tissulaire est assuré par la différenciation et l'expansion de progéniteurs cellulaire (cellules souches), compensées par

l'élimination des cellules excédentaires ou sénescents par apoptose. C'est le maintien de l'homéostasie. On estime que l'équivalent en masse d'un corps humain est ainsi renouvelé chaque année. Toutefois, les cellules du système nerveux dont le capital cellulaire est pratiquement atteint à l'âge de trois ans chez l'Homme, les cellules du myocarde, les cellules ciliées de l'oreille interne et les fibres cristalliniennes font exception à ce processus de renouvellement.

L'apoptose joue un rôle prépondérant pendant le développement embryonnaire et fœtal. Elle permet le dimorphisme sexuel, intervient lors du modelage des membres et organes, et lors du développement du système nerveux durant lequel le cerveau et le réseau des connexions sont façonnés. Enfin, elle représente le stade ultime de la différenciation cellulaire pour les fibres cristalliniennes, les kératinocytes ou les érythrocytes, qui perdent leurs noyaux par un mécanisme apoptotique. L'apoptose est également garante de la stabilité génomique, puisqu'elle rentre dans le processus d'élimination des cellules dont les dommages à l'ADN sont irréparables et potentiellement délétères (perte/gain de fonction, transmission d'aberrations chromosomiques pouvant conduire à des transformations néoplasiques). Finalement, en ce qui nous concerne, elle intervient lors de l'établissement (formation du répertoire) et du fonctionnement (élimination de cellules cibles, terminaison de la réponse immunitaire, maintien de l'homéostasie) du système immunitaire. Nous aborderons dans un chapitre ultérieur ces points en particulier.

De nombreuses pathologies humaines sont provoquées par un dérèglement du processus d'apoptose^(12, 13). On distingue les maladies dont les manifestations cliniques résultent d'une apoptose suractivée (maladies dégénératives, SIDA,...), ou d'une apoptose insuffisante (malformations, néoplasies, maladies auto-immunes...). L'étude de ces dérèglements a permis de mieux comprendre certains des mécanismes de régulation de la vie cellulaire. Les connaissances acquises dans le

domaine de la mort cellulaire vont favoriser la mise au point de stratégies thérapeutiques visant ces pathologies⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

1.2.2. Caractéristiques morphologiques

Les premières observations de cellules en apoptose ont été rapportées dès le milieu du 19^{ème} siècle^(1, 8), mais le terme d'apoptose n'est introduit qu'un siècle plus tard par Kerr, Wyllie et Currie en 1972, lorsque ceux-ci remarquent que des changements morphologiques comparables surviennent lors de la mort d'hépatocytes exposés à des toxines et de lymphocytes traités aux hormones⁽¹⁷⁾.

Les cellules en apoptose présentent un boursoufflement de la membrane plasmique (*blebbing*), une diminution de volume marquée par un rétrécissement cellulaire (*shrinking*), une condensation de la chromatine (noyaux pyknotiques) suivie d'une fragmentation de l'ADN (karyorrhexose), et finalement un morcellement de la cellule par bourgeonnement en corps apoptotiques, contenant du matériel cytoplasmique et nucléaire (fig. 1). Généralement les autres organites apparaissent morphologiquement intacts, néanmoins les mitochondries peuvent être légèrement contractées, avec un épaissement de leurs matrices et on peut mettre en évidence une baisse du potentiel mitochondrial membranaire [$\Delta\psi_m$]. Ces modifications ont lieu alors que la membrane plasmique est pratiquement inaltérée (exclusion des colorants vitaux). *In vitro*, les cellules n'étant pas éliminées par hétérophagie (Cf. Discussion), on observe finalement une lyse des cellules due à la rupture de la membrane plasmique; phénomène désigné par le terme de « nécrose secondaire » ou « nécrose tardive ». Cette séquence d'altérations morphologiques

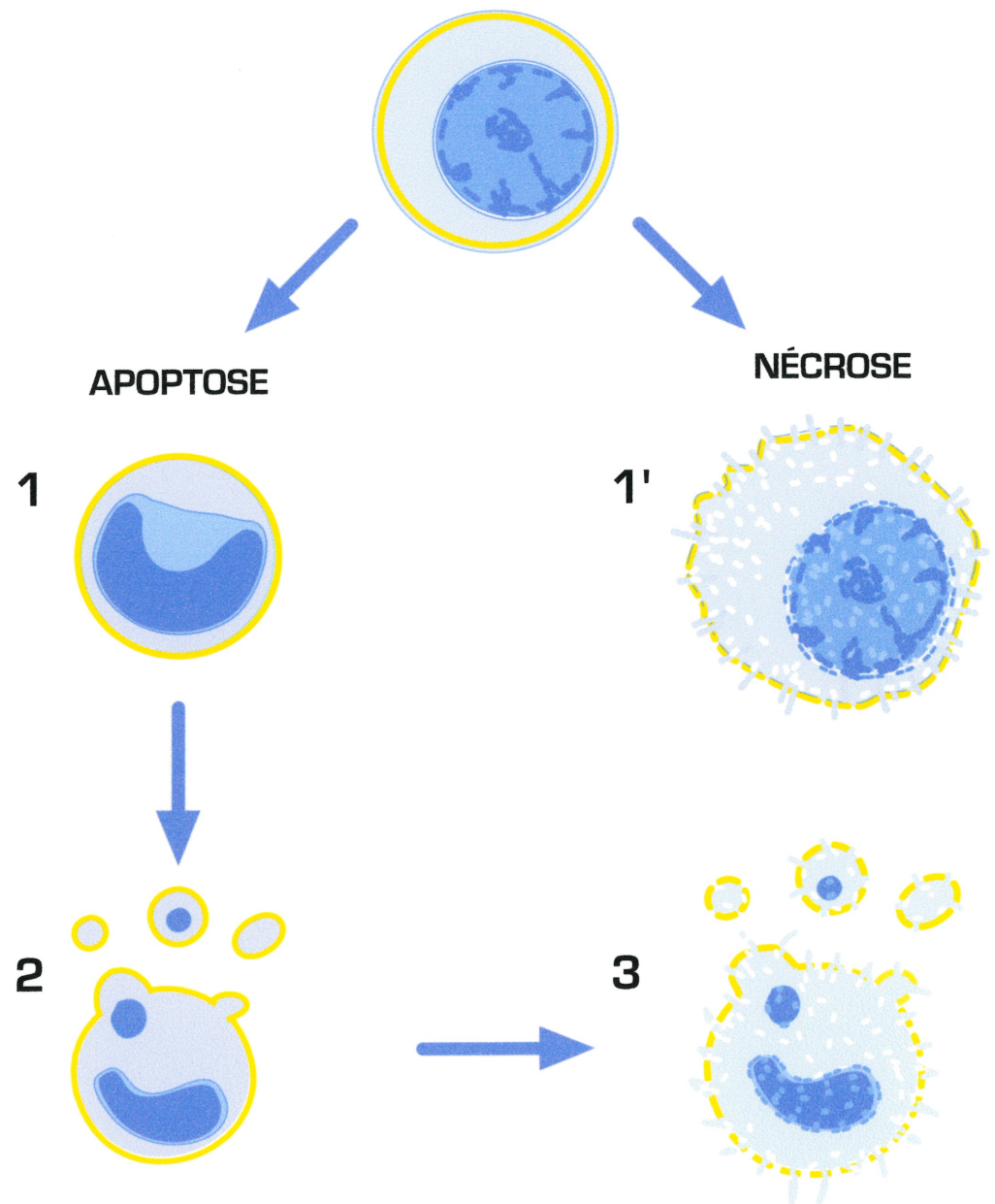


Figure 1: Changements morphologiques survenant lors de l'apoptose et de la nécrose. 1: Cellule engagée dans une voie apoptotique; la cellule et le noyau se condensent, les phosphatidylsérines sont exposées (en jaune). 2: Plus tardivement la cellule se fractionne en "corps apoptotiques". 3: In vitro, la cellule n'étant pas éliminée va finalement perdre son intégrité membranaire et rentrer en "nécrose tardive". 1': La cellule nécrotique gonfle, perd son intégrité membranaire et expose ses phosphatidylsérines simultanément. Le noyau reste apparemment intact.

est coordonnée par la mise en place de signaux d'induction, puis d'exécution de l'apoptose. Différents intervenants moléculaires, regroupés en familles de gènes, y participent.

1.2.3. Caractéristiques biochimiques

Un grand nombre de gènes orchestrant la régulation de l'apoptose ont déjà été caractérisés. L'étude du nématode *Ceanorhabditis elegans*, un animal ancestral, phylogénétiquement éloigné de l'Homme de plusieurs millions d'années, est à la base de ces travaux. Il est constitué à l'âge adulte d'à peine 1000 cellules somatiques et, durant son développement exactement 131 cellules sont perdues par un processus d'apoptose. Cet organisme transparent permet le suivi de chaque cellule au sein de l'animal vivant. L'analyse de mutants a permis d'identifier quatre gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire chez ce ver. Ces gènes codent les protéines Ced-3, Ced-4 et Ced-9 (Ced; *cell death abnormal*) ainsi que Egl-1 (Egl; *Egg-laying defective*). Ced-3 est une protéase à cystéine, dont l'association avec Ced-4 est nécessaire pour son activation. Ced-9 inhibe cette activation en se fixant à Ced-4. Enfin, Egl-1 est un antagoniste de Ced-9.

Le premier orthologue identifié chez les mammifères fut le proto-oncogène *bcl-2*. Sa capacité à relever l'absence de *ced-9* chez *C. elegans* suggère à l'époque que la mort cellulaire est conservée dans la phylogénèse⁽¹⁾. Cette hypothèse est aujourd'hui corroborée par des études complémentaires faites, entre autres, chez la Drosophile, la Souris et l'Homme, chez qui il existe des homologues respectifs de ces quatre gènes. Chez l'Homme, 15 homologues de Ced-3 (la famille des caspases), une quinzaine d'homologues de Ced-9 et Egl-1 (la familles de Bcl-2 et de Bid), et un homologue de Ced-4 [Apaf-1] ont été caractérisés à ce jour.

La mort cellulaire par apoptose peut être induite par des voies très variées chez les vertébrés, en fonction du type de cellule, de son stade de différenciation, de sa fonction, de son environnement, mais aussi en fonction de son propre état. La cellule peut donc intégrer des signaux mortels qui proviennent de l'extérieur de la cellule, mais aussi de l'intérieur, traduisant une atteinte de son intégrité. En effet, une cellule dont l'AND est trop endommagé, dont le réticulum endoplasmique ou les mitochondries sont détériorées, ou bien qui présente une anomalie dans la machinerie de division cellulaire, va se « suicider ». Il existe virtuellement autant de voies conduisant à l'apoptose qu'il existe de situations différentes. Néanmoins, quelles qu'en soient les expressions (infections, toxines, signalisation via des récepteurs spécialisés, privation de facteurs de survie, suicide...) le sort d'une cellule qui a reçu un signal « fatal » diverge généralement peu. Une fois le signal reçu (l'induction), l'apoptose utilise un nombre apparemment plus restreint de gènes lors de sa phase effectrice. Délibérément, nous ne survolerons dans ce chapitre que les voies majeures qui surviennent dans des conditions physiologiques normales chez les mammifères, et plus particulièrement dans les cellules du système immunitaire. Grossièrement, deux schémas généraux d'induction de l'apoptose peuvent être dégagés de l'ensemble des études entreprises dans ces cellules. Une induction extrinsèque (via des récepteurs membranaires) et intrinsèque (via la mitochondrie). Ces voies, cependant, ne sont pas mutuellement exclusives. Autour des principaux intervenants moléculaires de l'apoptose, nous illustrerons par quelques exemples le déroulement de ce processus dans les lymphocytes.

1.2.3.1. *Les caspases*

Les caspases constituent une famille de cystéine protéases composée de 15 membres à ce jour identifiés [casp-1 à casp-15]^(18, 19). Leur nom (caspase : *cysteinyl*

aspartate-specific proteases] provient de leur spécificité de clivage après un résidu aspartique placé en position P1 de la séquence peptidique qu'elles reconnaissent. Elles peuvent être classées selon un ordonnancement phylogénétique, en fonction de leur degré d'affinité pour les résidus P2-P4 en amont de leur site de clivage⁽²⁰⁾, ou encore en fonction de leur participation reconnue dans l'apoptose⁽²¹⁾ (fig. 2).

Parmi les caspases impliquées dans la mort programmée des cellules du système immunitaire, certaines interviennent durant la phase d'induction de l'apoptose, les caspases inductrices (ex : casp-8, -9 et -10), d'autre lors de la phase effectrice, les caspases exécutoires (casp-3, -6 et -7).

La plupart des caspases sont présentes dans la cellule (au niveau du cytoplasme ou de la mitochondrie) sous des formes zymogènes ayant une activité enzymatique résiduelle. Celle-ci est exacerbée par clivage protéolytique. Les caspases sont composées d'un pro-domaine N-terminal qui leur confèrent la capacité de s'associer à des partenaires moléculaires, et des domaines p10 et p20 qui, une fois clivés (après un résidu aspartique), vont produire l'enzyme active. Cette dernière est généralement constituée d'un tétramère formé de deux hétérodimères p10-p20. De façon schématique, l'activation des caspases se déroule selon trois mécanismes : 1/ la transactivation par « proximité induite » (ex. casp-8); 2/ l'autoactivation par modifications allostériques (ex. casp-9); et 3/ l'activation protéolytique par d'autres caspases en amont (ex. casp-3)^(19, 22). Les deux premiers procédés impliquent la participation de molécules adaptatrices nécessaires à la régulation et à l'activation des caspases inductrices (Cf. Chap. suivants). Les caspases s'y connectent par des interactions homotypiques, grâce à des motifs déterminés contenus dans leur pro-domaine. Il s'agit du motif CARD (*caspase recruitment domain*) de la casp-9 et du

Caspases

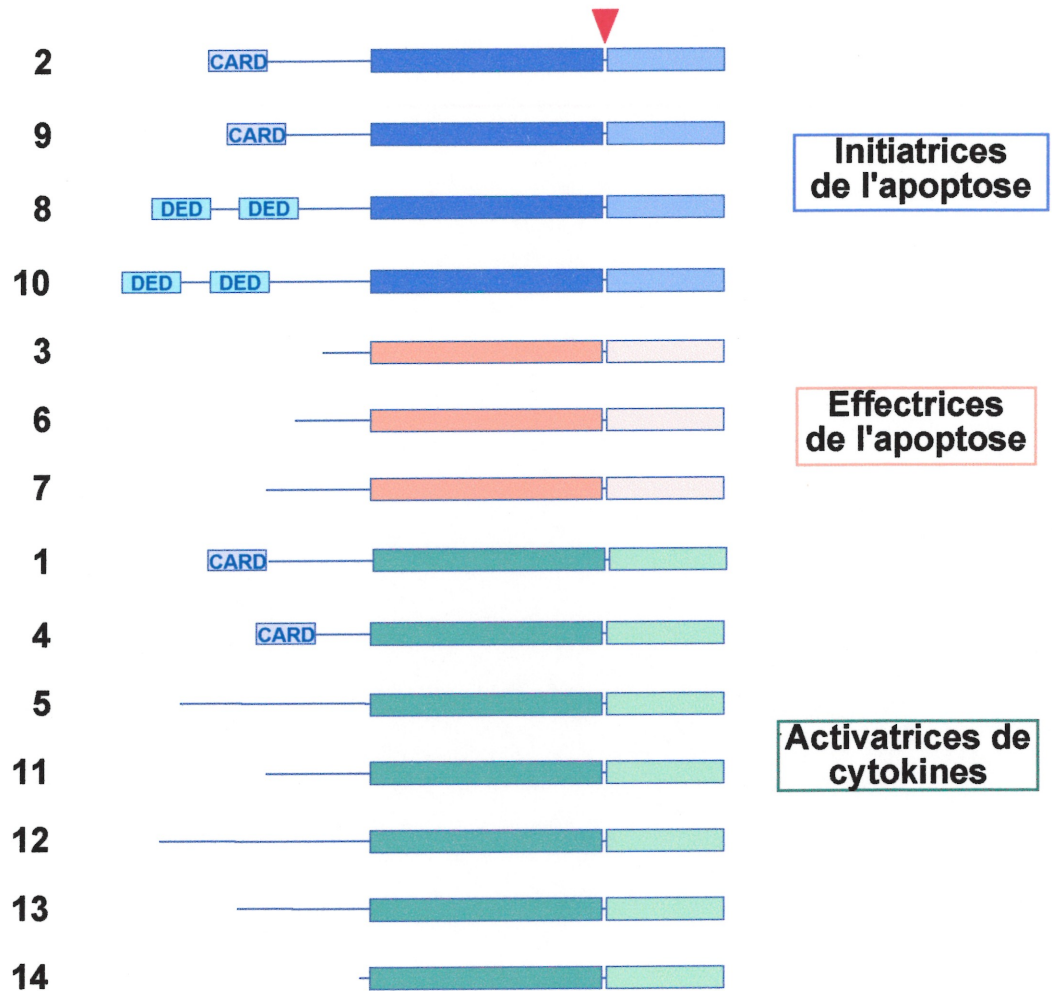


Figure 2: Représentation schématique de quatorze membres de la famille des caspases. Les sites de clivages (flèche rouge) se trouvent entre les domaines p20 (rectangles foncés) et les domaines p10 (rectangles clairs). Les régions CARD et DED sont indiquées. Adaptée de Strasser et al. 2000. (Réf. 18)

TABLEAU I. Phénotypes des souris déficientes pour différentes caspases

CASPASES	DÉVELOPPEMENT	DÉFAULTS
Caspase-1	Normal	Pas d'IL-1 β ni d'IL-18 mature ; Résistance au choc toxique induit par le LPS
Caspase-2	Normal	Ovocytes en surnombre, motoneurones faciaux moins nombreux Résistance des cellules B lymphoblastiques aux granzymes B
Caspase-3	Mortalité périnatale Développement cérébral anormal	Apoptose défectueuse chez les progéniteurs cellulaires des neurones. Pas de fragmentation d'ADN lors de l'apoptose des autres cellules.
Caspase-6	Normal	Non démontré
Caspase-7	Létalité embryonnaire	Non démontré
Caspase-8	Létalité embryonnaire Développement anormal du muscle cardiaque et du système hématopoïétique	Résistance des cellules fibroblastiques embryonnaires aux récepteurs de mort (Fas, TNF-R1 et DR-3)
Caspase-9	Létalité embryonnaire / mortalité périnatale Développement cérébral anormal	Apoptose défectueuse chez les progéniteurs cellulaires des neurones. Défaut de la voie apoptotique mitochondriale chez les thymocytes
Caspase-11	Normal	Pas d'IL-1 β ni d'IL-18 mature ; Résistance au choc toxique induit par le LPS
Caspase-12	Normal	Pas d'apoptose induite suite à un stress du réticulum endoplasmique.

motif DED (*death effector domain*) des casp-8 et -10. Une fois activées, les caspases inductrices activent à leur tour les caspases effectrices par clivage. Cette cascade protéolytique déclenche une boucle catalytique amplificatrice. Les caspases effectrices vont alors lyser une série de substrats cellulaires déterminés. Cette protéolyse ciblée va entraîner les conséquences suivantes : 1/ lever l'inhibition d'autres effecteurs de l'apoptose (ex : ICAD/CAD); 2/ activer d'autres voies importantes de signalisation participant à la phase effectrice (ex : caspases effectrices, Bid, ROCK-1...); 3/ interrompre les processus biologiques de la cellule en désactivant des substrats nécessaires au maintien de la signalisation (ex : Rb, STAT1, Akt-1...), de l'intégrité du génome (ex : PARP, DNA-PK...), et de la structure cellulaire (ex : actine, kératine, lamines, vimentine...). L'ensemble de ces événements contribue à l'établissement de la plupart des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose⁽²³⁻²⁶⁾. À titre d'exemple, les changements structuraux du noyau dépendent en grande partie de l'activité des caspases. En effet, le clivage de l'ADN en fragments internucléosomiaux résulte de l'activité DNase de CAD (CAD : *Caspase-Activated Deoxyribonuclease*). Dans une cellule en vie, cette DNase est maintenue dans le cytoplasme où son activité est inhibée par son association avec ICAD (ICAD : inhibiteur de CAD). La levée de l'inhibition se fait quand ICAD est clivé par la casp-3. Ceci permet la libération de CAD, sa translocation dans le noyau et, conséquemment, la fragmentation de l'ADN en fragments multiples de 180 paires de bases^(27, 28). Très récemment, une autre DNase participant à la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose, l'endonucléase mitochondriale G (endo-G), a été clonée. Sa translocation de la mitochondrie vers le noyau dépend également des caspases⁽²⁹⁾.

L'étude de souris dont les gènes de différentes caspases ont été invalidés par recombinaison homologue, les souris knock-outs*, à permis de mettre en évidence les divers niveaux d'implication des caspases et leur hiérarchisation dans la mort cellulaire⁽³⁰⁻³²⁾. En effet, si certaines caspases sont essentielles, d'autres ne jouent aucun rôle dans l'apoptose. D'autre part, leur nécessité varie en fonction des tissus, du type de signal apoptotique et du stade de développement examiné. Les phénotypes des différentes souris knock-outs sont résumés dans le tableau I. Les souris casp-1 et -11 knock-out par exemple, ne présentent aucun défaut d'apoptose. Par contre la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 n'a plus lieu, impliquant que ces caspases sont responsables de leur activation. Les souris casp-2 knock-out ne présentent que de très légères altérations. Notamment un nombre supérieur de cellules germinales est présent chez les femelles, et une résistance accrue à la cytotoxicité est détectée (Cf. Chap. 2.2). Les souris casp-12 présentent un défaut mineur de réponse au stress.

Cependant, les caspases-3, -7, -8 et -9 sont essentielles au développement embryonnaire et à la survie des souris parvenues à terme. Les souris casp-3 et -9 knock-out ont un phénotype très similaire, quoique l'inactivation de la caspase-9 conduise à des altérations plus sévères dans le développement neuronal (mort in utero). Ces souris ont un développement neuronal très fortement altéré, cause probable de leur mort. En dehors des cellules du système nerveux, les souris casp-3 knock-out ne présentent pas de déficience majeure d'apoptose. Leurs cellules hématopoïétiques répondent à des stimuli apoptotiques extrinsèques et intrinsèques. Cependant, la fragmentation d'ADN et le bourgeonnement de la membrane plasmique ne sont généralement pas observés. Chez les souris casp-9

*Certains des termes de biologie employés dans cette thèse sont en langage international, non-traduits, par souci de clarté et/ou de concision. Il en va de même pour certains des sigles et abréviations listées précédemment.

knock-out, la réponse aux signaux intrinsèques est absente alors que les cellules répondent bien aux signaux via les récepteurs de mort.

Chez l'homme, une étude récente rapporte le cas de deux familles chez qui la caspase-10 est mutée. Le phénotype de ces patients est très proche de celui des patients qui présentent des mutations dans les gènes Fas ou FasL (Cf. Chap. suivant). Au niveau cellulaire, cette mutation entraîne une accumulation de cellules dendritiques (DCs) dans la zone T des ganglions lymphatiques, due à une résistance des DCs à l'apoptose induite par TRAIL (TRAIL : *TNF-related apoptosis inducing ligand*). Des défauts dans la voie Fas sont aussi observés. Le maintien d'un grand nombre de cellules dendritiques présentatrices d'antigène dans la zone T, ajouté aux altérations observées dans la voie Fas, participeraient à la suractivation des T conduisant à une lymphoprolifération et une auto-immunité plus sévère chez ces patients.

1.2.3.2. Les récepteurs de mort

Le contrôle de l'homéostasie lymphocytaire dépend en partie de la régulation de deux grandes familles de molécules : les récepteurs membranaires de la superfamille du TNF-R (*tumor necrosis factor receptor*) et leurs ligands respectifs de la famille du TNF. Suivant la nature du récepteur, du type cellulaire et des signaux connexes reçus, ces molécules peuvent signaler la survie, la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire.

Les « récepteurs de mort » constituent une sous-famille des TNF-Rs dont la particularité réside dans leur portion intracytoplasmique. Ces molécules contiennent toutes un « domaine de mort » DD (*death domain*), nécessaire à la transmission d'un signal mortel. En effet, ces récepteurs (TNF-RI, CD95/Fas, DR3, DR4, DR5, DR6...) n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque. Leur association

avec des molécules adaptatrices (FADD : *Fas-associating death domain protein*, TRADD : *TNFR1-associated death domain protein* et RIP : *receptor-interacting protein*) permet de les connecter aux caspases (généralement la casp-8) qui vont transmettre le signal⁽¹⁸⁾. Ces molécules adaptatrices contiennent également un motif DD en plus d'un motif DED. Les ligands des récepteurs de mort (FasL, TRAIL, TNF- α , Lymphotoxine- α etc...) sont pour la plupart synthétisés sous forme trimérique (membranaire ou soluble), et une forte agrégation de leur récepteur semble indispensable à la transmission du signal.

Le cas de Fas/FasL est le plus étudié en immunologie car des mutations chez l'Homme et la Souris affectent particulièrement le système lymphoïde (Cf. Chap. 2). Brièvement, sous l'action de son ligand FasL, Fas se trimérise. Ceci entraîne une modification allostérique de ses domaines DD et permet une interaction homotypique avec les domaines DD des molécules FADD. À leur tour, les molécules FADD vont recruter plusieurs formes zymogènes de casp-8, cette fois par une interaction homotypique DED-DED, et ainsi former un complexe multimoléculaire nommé DISC (*death inducing signaling complex*). Le regroupement de plusieurs casp-8 permet leur activation, probablement par clivage en « trans » (modèle de proximité induite)⁽³³⁾. Ainsi activées, ces caspases vont initier la cascade de signalisation en clivant (activant) les caspases effectrices casp-3, et casp-7⁽³⁴⁾. Dans les cellules qui contiennent un nombre insuffisant de casp-8 pour déclencher une cascade signalétique efficace, une béquille mitochondriale est mise en place par l'intermédiaire de Bid. Bid est une protéine de la famille de Bcl-2 (voir chap. suivant), dont la forme native est cytoplasmique. Sous l'action de la casp-8, une forme mature t-Bid est générée. t-Bid est alors transloqué vers la mitochondrie où son action pro-apoptotique va permettre d'amplifier le signal initial provenant du récepteur Fas⁽³⁵⁾ (voir chap. suivant et fig. 4).

Notons que des travaux récents remettent en question le modèle de trimérisation des récepteurs Fas et TNFR par leur ligand. Les récepteurs de mort possèdent en effet la faculté de former des trimères en l'absence de leur ligand, grâce à des domaines extracellulaires nommés PLAD (*preligand assembly domain*). Dans ces conditions, le mode d'action de leur ligand reste à définir⁽³⁶⁾. Enfin, de façon surprenante, des récepteurs de mort ont été impliqués dans la croissance et la différenciation de certains types cellulaires. C'est le cas notamment de Fas qui peut avoir une action stimulante sur la prolifération T, ou encore induire une différenciation accrue des cellules dendritiques (DCs). À l'inverse, certains récepteurs de la famille du TNF-R qui ne possèdent pas de domaines DD ont été impliqués dans l'induction de la mort cellulaire. Par exemple, le TNFR-II intervient dans l'élimination des lymphocytes T activés lors de la terminaison de la réponse immunitaire⁽³⁷⁾.

1.2.3.3. Les protéines de la famille Bcl-2

Outre la signalisation via les TNF-Rs (TNF-RII, CD40...), la survie des lymphocytes dépend de la présence de cytokines. Dans certaines conditions, l'absence de ces facteurs de survie entraîne la mort des lymphocytes par un processus qui fait intervenir des protéines de la famille Bcl-2 (Figure 3). Cette famille grandissante comprend des membres dont l'action protège de la mort cellulaire (Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1...), ou l'induit (Bax, Bad, Bim...). Un sous-classement en fonction du degré d'homologie avec des régions BH (*Bcl-2 Homology*) contenues dans Bcl-2 (BH1 à BH4) permet de distinguer les molécules à effet anti-apoptotique de celles à effets pro-apoptotiques du genre Bax ou ne contenant qu'un domaine BH3, comme Bad et Bid. Les protéines de cette grande famille partagent cependant la propriété de s'insérer dans les membranes grâce à leur domaine TM hydrophobe. On les

retrouve dans le réticulum endoplasmique, la membrane nucléaire externe et au niveau des mitochondries. Bad et Bid font exception, puisqu'ils ne possèdent pas de domaine hydrophobe TM (voir fig. 3). Sous leur forme inactive, ils sont séquestrés dans le cytoplasme. La forme active de Bid (t-Bid) possède cependant un site de myristillation qui lui permettrait de se fixer à la membrane mitochondriale. En règle générale, les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, etc...) antagonisent l'action protectrice des membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_i etc...) en formant avec eux des hétéro-multimères. Plus précisément, le ratio Protecteur/Tueur va être un des facteurs déterminant la vie ou la mort de la cellule. L'intégration de ces signaux s'effectue, à de rares exceptions près, dans les mitochondries. En modifiant la perméabilité de la membrane externe mitochondriale, les molécules de la famille Bcl-2 vont permettre ou empêcher la libération de facteurs protéiques contenus dans les mitochondries, tels le cytochrome *c*, Smac/Diablo qui contribuent à l'activation des caspases, des caspases elles mêmes (casp-2 et casp-9) ou d'AIF dont l'action est indépendante de celles-ci. La régulation de ces signaux est extrêmement complexe comme en témoigne la grande diversité de cette famille atypique. Elle peut s'exercer au niveau transcriptionnel, mais également au niveau post-transductionnel. Par exemple, dans les cellules recevant des signaux de survie dépendant de la PI3K (ex : IL-3), Bad est maintenu phosphorylé par la protéine tyrosine kinase AKT. Bad phosphorylé est séquestré dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 d'où il ne peut agir. Bim, quant à lui, est associé aux microtubules par la dynéine. En l'absence de signal de survie, Bad (qui n'est plus phosphorylé) et Bim migrent vers la mitochondrie où ils antagonisent l'action de Bcl-2 et Bcl-X_i respectivement. Ceci permet la libération de facteurs pro-apoptotiques et l'activation conséquentes de la caspase-9 par la

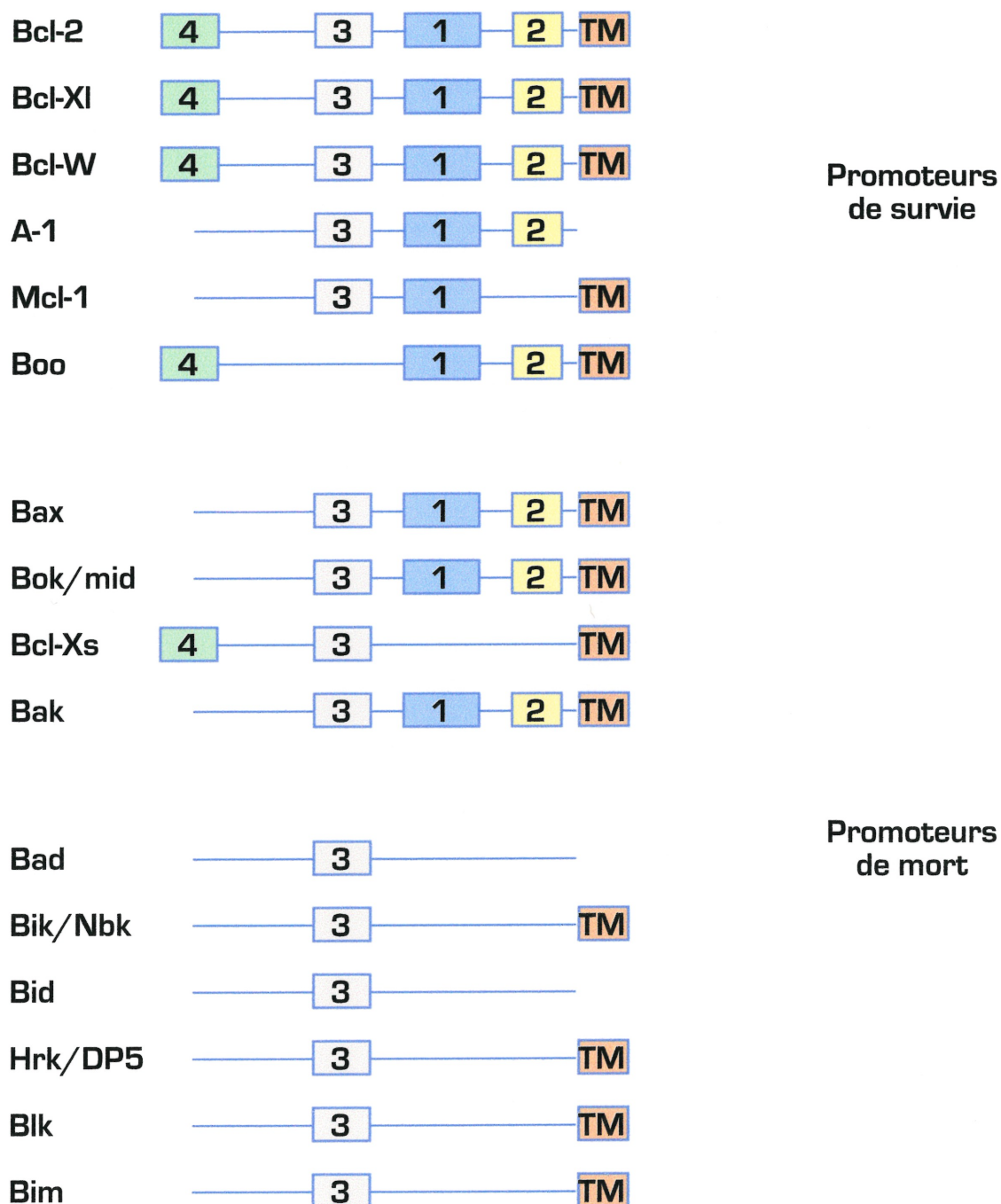


Figure 3: Représentation schématique des seize membres identifiés de la famille de Bcl-2. Les régions BH1 à BH4 (**B**cl-2 **h**omology) sont indiquées par leurs chiffres respectifs. Une sous classification permet de distinguer les molécules qui n'ont que la région BH3 parmi les promoteurs de mort cellulaire. TM: région hydrophobe C-terminale. Adaptée de Strasser et al. 2000. (Réf. 18)

formation de l'apoptosome^(38, 39) (voir figure 4). De plus, il a été montré que la calcineurine (phosphatase dépendante du calcium) induit l'apoptose en déphosphorylant Bad⁽⁴⁰⁾. Bid quant à lui nécessite l'action de la caspase-8 pour agir. Sa forme active (t-Bid) est le résultat d'un clivage protéolytique qui libère un site probable de myristilation. Plutôt que d'antagoniser un membre anti-apoptotique (Bcl-2) comme on l'a initialement suggéré, il semblerait en fait que t-Bid catalyse des changements conformationnels de son partenaire Bax, agissant ainsi en synergie avec ce dernier⁽³⁵⁾.

Les travaux sur les souris knock-out nous enseignent que la régulation de ces différents membres varie en fonction du stade de différenciation et du type cellulaire examiné. Par exemple, Bcl-2 est préférentiellement exprimé dans les lymphocytes T et B mature alors que son homologue Bcl-XI protège plutôt les thymocytes où Bcl-2 est quasiment absent⁽¹⁹⁾.

1.2.3.4. Mécanismes intrinsèques de contrôle de l'apoptose

Comme nous l'avons entrevu dans les chapitres précédents, certains acteurs de l'apoptose (ex : Fas) peuvent jouer un rôle opposé et favoriser la vie au lieu de l'enlever. À l'inverse, des facteurs de survie (ex : CD40) peuvent être impliqués dans la mort cellulaire⁽⁴¹⁾. Un degré de complexité supplémentaire dans le contrôle et la régulation de la mort cellulaire est apporté par la découverte de diverses molécules inhibitrices endogènes. Parmi celles-ci on compte des récepteurs leurres (ex : DcR1, DcR2, DcR3...) des caspases leurres (ex : c-FLIP...), les IAPs et SMAC/DIABLO.

Les récepteurs leurres (*decoy receptors; DcR*) sont des molécules homologues des récepteurs de mort, mais dépourvues d'activité mortelle. Ces récepteurs se présentent sous forme soluble ou membranaire. Ils inhibent la mort induite par

leurs homologues en rentrant en compétition pour leur liaison avec le ligand. Comme certains de ces récepteurs (ex : FDR) contiennent également les domaines extracellulaires PLAD (Cf. Chap. 1.2.3.2.), on pense qu'ils pourraient gêner la formation des trimères membranaires en formant des récepteurs mixtes Fas/FDR⁽⁴²⁾. Des cas de caspases leurres existent également. c-FLIP (*FADD-like ICE inhibitory protein*) est une isoforme de la casp-8 dont le site catalytique tronqué est non fonctionnel. c-FLIP rentre en compétition avec les caspases-8 et-10 dans la formation du DISC grâce à ses deux domaines DED (Cf. Chap. 1.1.3.2.). La casp-2 possède également une isoforme inhibitrice, casp-2s. Son implication dans la protection des motoneurones faciaux est avancée⁽³⁰⁾. Les IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*) sont des molécules qui ont toutes la particularité de contenir un ou plusieurs motifs BIR (*Baculovirus IAP-repeat*) nécessaires et suffisants à leur activité inhibitrice. Chez l'Homme, trois membres de cette famille (XIAP, cIAP-1 et cIAP-2) possèdent la capacité de bloquer l'activation (ou l'activité) des caspases en s'y fixant^(43, 44). De plus, XIAP contient un motif RING d'ubiquitination, ce qui pourrait conduire à la dégradation des caspases sur lesquelles elle est fixé. Enfin, ce système d'inhibition des caspases est levé par la fixation de la molécule mitochondriale SMAC/DIABLO sur les domaines BIR des IAP^(43, 44).

On voit par ces quelques exemples que la régulation de l'apoptose implique un niveau de complexité élevé. Les organismes multicellulaires supérieurs ont évolué de façon à ce que la régulation de l'homéostasie soit drastiquement contrôlée. Alors que chez les mammifères l'absence de mort cellulaire est létale, le développement et la vie de *C. elegans* ne sont pas affectés par les 131 cellules surnuméraires induites par l'absence de CED-3.

1.3. La nécrose

1.3.1. Implications physiologiques

La nécrose est une mort cellulaire accidentelle et non programmée, qui survient dans des conditions pathologiques, à la suite d'un stress intense de la cellule. Elle est engendrée par une anoxie brutale, ou une soudaine privation en nutriments [nécrose ischémique, infarctus, gangrènes...], ou des conditions physico-chimiques extrêmes [brûlures par la chaleur, les acides et les bases, les détergents; traumatismes mécaniques...]. Les conséquences qu'elle entraîne sont généralement préjudiciables à l'organisme. À l'inverse de l'apoptose, la nécrose touche souvent un grand nombre de cellules. Elle entraîne des réactions inflammatoires, qui peuvent ensuite donner lieu à une fibrose des tissus, et, dans les cas plus graves, à leur disparition, la dégénérescence des cellules étant plus rapide que leur renouvellement. Lors de petits traumatismes cependant, la réaction inflammatoire déclenchée a son utilité. En effet, ces signaux de stress permettent, d'une part, de recruter les cellules du système immunitaire au site de la lésion. Une réponse adaptée aux éventuels pathogènes qui auraient franchi la barrière de la peau, par exemple, peut alors être mise en place⁽⁴⁵⁾. D'autre part, les signaux de stress déclenchent le processus de cicatrisation.

Le terme nécrose est toutefois employé afin de décrire des morts cellulaires non accidentelles. En effet, des types de mort cellulaire programmée à morphologie nécrotique sont décrits. G. Majno et I. Joris proposent de ce fait le terme « oncose » pour désigner une mort non apoptotique, durant laquelle les cellules gonflent au lieu de rétrécir, le terme de nécrose décrivant le stade dégénératif de la mort cellulaire, que celle-ci soit programmée ou non. Pour eux la nécrose décrit un " cadavre " de cellule et non le processus qui l'a conduit à cet état⁽⁶⁾. Cependant, comme peu sont

ceux qui en font la distinction dans la littérature, nous continuerons à emprunter ce terme quelque peu abusif.

De plus en plus de travaux rapportent des exemples de « nécrose programmée »^(2, 5). Dans ces cas-là, les conséquences qu'elle entraîne sont moins désastreuses pour l'organisme, et entrent même dans un processus purement physiologique. Par exemple, lors de la formation des extrémités chez la Souris pendant le développement embryonnaire, la séparation des doigts fait suite à la perte des cellules de l'espace interdigitale. Cette perte cellulaire fait intervenir dans une part importante une mort cellulaire à morphologie nécrotique⁽⁴⁶⁾. Parallèlement chez le Poulet, l'analyse in vivo de la dynamique cellulaire instaurée lors de l'embryogenèse montre qu'une quantité très importante de phagocytes emplis de débris cellulaires se retrouvent dans ces espaces interdigitaux⁽⁸⁾, ce qui est un signe d'inflammation. La nature exacte des phagocytes n'est pas déterminée (peut-être des cellules parenchymateuses et des macrophages tissulaires) et il semble peu probable qu'à ce stade précoce du développement - le système immunitaire n'est pas complètement formé - une réponse inflammatoire « professionnelle » puisse exister. Cet exemple suggère que, dans des conditions précises, la mort nécrotique joue un rôle prépondérant dans l'organisme et participe activement à sa morphogenèse.

1.3.2. Signes distinctifs – Particularités

La nécrose se distingue de l'apoptose classique d'un point de vue morphologique et biochimique. Essentiellement, les cellules nécrotiques présentent un gonflement cytoplasmique et mitochondrial, ce qui exerce une forte pression sur la membrane plasmique et conduit finalement à l'éclatement de la cellule⁽⁸⁾. Les composantes cytoplasmiques sont alors dispersées dans le milieu extracellulaire. De ce fait, la nécrose s'accompagne toujours d'une réponse inflammatoire. Ensuite, les

caspases ne sont jamais activées lors de la nécrose. Il semble même que dans des conditions où l'inactivation des caspases est provoquée [inhibiteur tel z-VAD, génération d'espèces réactives à l'oxygène, *ROS*], la mort cellulaire apoptotique est déviée vers une forme nécrotique^[5, 47, 48]. Enfin, le noyau des cellules nécrotiques présente peu ou pas de changements morphologiques. Dans certains cas cependant, une condensation homogène légère et un clivage en hauts poids moléculaires de l'ADN peuvent être observés^[2, 49].

Au niveau mitochondrial, la distinction nécrose/apoptose est moins tranchée. En effet, une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) s'observe dans les deux cas. Toutefois, lors de la nécrose cette perturbation résulte de modifications bioénergétiques et osmotiques (catastrophe bioénergétique) qui conduisent finalement au gonflement de ces organelles^[6].

2. Rôle de la mort cellulaire dans le système immunitaire

2.1. Développement des lymphocytes B et T

Les lymphocytes B et T sont des cellules hautement spécialisées du système immunitaire adaptatif, qui, grâce à leurs récepteurs à l'antigène, respectivement le BCR (B-cell receptor) et le TCR (T-cell receptor), peuvent virtuellement reconnaître plus d'antigènes qu'il n'en existe dans la nature. Cette grande diversité forme un répertoire d'environ 10^9 récepteurs de spécificités différentes pour chaque type cellulaire. Le génome humain comprenant bien moins d'un million de gènes, le principe un gène/une protéine ne s'applique ici plus. Cette plasticité résulte en fait du réarrangement somatique d'un nombre limité de gènes : la recombinaison génique^[50].

Les récepteurs à l'antigène sont des complexes multi-caténaire formés de chaînes variables qui reconnaissent l'antigène, associées à des chaînes invariantes nécessaires à la transmission du signal. L'organisation génomique des gènes codant les immunoglobulines est comparable à celle des gènes codant les chaînes α et β du TCR (le répertoire $\gamma\delta$ étant plus restreint). Bien que différentes, les étapes du développement lymphocytaire B et T répondent aux mêmes exigences : former un répertoire fonctionnel, diversifié, tolérant et, en ce qui concerne les T, restreint aux antigènes du soi. Pour ce faire, des mécanismes de contrôle ont été mis en place tout au long du processus de différenciation des lymphocytes. Ces points de contrôles ou « checkpoints » permettent l'élimination par apoptose des cellules qui risquent d'exprimer un récepteur non fonctionnel, de celles potentiellement auto-réactives ou non restreintes au soi. A titre d'exemple, lors du développement B, le premier point de contrôle se situe après le réarrangement du locus de la chaîne lourde (H) des Ig. Les pro-B tardifs qui ne sont parvenus à réarranger aucun de leur deux locus H (un par chromosome), sont éliminés par apoptose. De façon similaire, les pré-B qui ne parviennent à exprimer aucune chaîne légère (quatre possibilités, 2 κ et 2 λ) meurent également. Finalement, les lymphocytes B immatures (mlg fonctionnelle) qui reconnaissent dans la moelle osseuse des antigènes du soi sont éliminés par apoptose ou rendus anergiques. Les B vont alors migrer en périphérie (dans la rate et les ganglions) où ils vont subir une dernière phase de sélection lors de leur première rencontre avec l'antigène. En effet, afin d'augmenter l'efficacité des anticorps, des mutations ponctuelles dans les régions qui interagissent avec l'antigène (CDR1, CDR2 et CDR3) des Ig vont avoir lieu. Ce phénomène de mutations somatiques étant aléatoire, des récepteurs de moins bonne affinité ou auto-réactifs vont être également produits. Les lymphocytes B qui les arboreront seront éliminés.

2.2. Réponse immunitaire

Le système immunitaire a développé des stratégies complexes et finement réglées pour lutter contre les pathogènes, vivre en harmonie avec son environnement et préserver l'intégrité du soi. La mort cellulaire joue un rôle prépondérant dans le maintien de cet équilibre. Lors d'une infection, des lymphocytes B et T périphériques spécifiques de l'antigène vont être activés et se multiplier pour permettre l'élimination ciblée de l'intrus. Dans le cas de pathogènes intracellulaires, les cellules infectées sont éliminées par des cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques. La cytotoxicité est obtenue d'une part, par la stimulation des récepteurs de mort de la cellule cible via le TNF- α et FasL de la cellule effectrice (voir chap 1.2.3.2.), et d'autre part par l'exocytose de granules cytotoxiques contenant essentiellement de la perforine et des granzymes. Le mode d'action de ces molécules est le suivant : la perforine se fixe à la membrane de la cellule cible et se multimérise pour former des pores qui vont permettre l'entrée des granzymes⁽⁵¹⁾. Les granzymes de type B sont des estérases à sérine qui ont en commun avec les caspases la capacité de cliver après un résidu aspartique. De ce fait, il a été montré que les granzymes B sont capables d'activer les caspases-3, -6, -7, -8, -9 et -10 *in vitro* et la caspase-8 *in vivo*. Par ailleurs, des cellules B lymphoblastiques issues de souris casp-2 knock-out présentent une résistance accrue à la mort induite par les granzymes B en présence de perforine⁽³²⁾. Enfin, les granzymes peuvent activer Bid et générer la forme clivée t-Bid. La cascade protéolytique déclenchée par l'entrée des granzymes B dans la cellule cible va donc conduire à une mort cellulaire de type apoptotique, en activant certaines caspases et en déclenchant la voie mitochondriale. Ainsi, l'apoptose déclenchée par les phénomènes de cytotoxicité permet d'enrayer l'infection tout en évitant la dissémination du pathogène, puisque la cellule apoptotique est phagocytée avant que son contenu ne se répande dans

l'organisme. Le phénomène de cytotoxicité permet également l'élimination (par les NK et NKT essentiellement) des cellules cancéreuses et intervient dans le rejet de greffes allogéniques.

Une fois l'infection circonscrite, les cellules effectrices devenues inutiles et potentiellement délétères doivent être éliminées. Cette élimination, communément nommée AICD (activation induced cell-death), découle de différentes voies d'induction de l'apoptose. La stimulation répétée du récepteur à l'antigène lors de l'expansion clonale induit l'expression transitoire de FasL sur les lymphocytes B et T, et la production de TNF- α par les lymphocytes T. Parallèlement, l'expression de la protéine inhibitrice c-FLIP, après avoir dans un premier temps augmenté, chute. Les lymphocytes activés deviennent de ce fait très sensibles à la mort dépendante des récepteurs Fas et TNFR1 et sont ainsi rapidement éliminés^[37, 52]. Cette élimination est autocrine (récepteur/ligand sur la même cellule) et paracrine (fratricide). Le TNFR1 est également impliqué dans l'AICD des lymphocytes T et prendrait le relais après le système Fas/FasL^[37].

De plus, lorsque l'infection décline, la disparition de l'antigène provoque une diminution de la stimulation antigénique, de l'inflammation et de la production de cytokines. Les lymphocytes B ne recevant plus de signal via leurs BCR vont mourir par un mécanisme impliquant également Fas. D'autre part, l'appauvrissement du milieu en cytokines affecte les lymphocyte T activés qui en sont fortement dépendants. Cette soudaine carence les conduit également à la mort cellulaire (voir chap. 1.2.3.3.).

Un autre aspect de l'importance de l'apoptose dans le système immunitaire est l'élimination des lymphocytes B et T périphériques auto réactifs ayant échappé à la sélection lors du développement. C'est la « délétion » clonale. Les lymphocytes T naïfs qui reconnaissent des antigènes du soi en l'absence de costimulation sont éliminés par apoptose^[53, 54]. De façon similaire, les lymphocytes B qui ne reçoivent plus d'aide

des lymphocytes T (rendus anergiques) sont également éliminés. Enfin certains tissus expriment FasL, repoussant ainsi l'attaque d'éventuels lymphocytes activés (qui expriment Fas). Cependant, il semble que la seule présence de FasL ne suffise pas à protéger ces sites privilégiés. Il est possible qu'un mécanisme anti-inflammatoire additionnel impliquant le TGF- β soit nécessaire⁽⁵⁵⁾.

Le rôle essentiel du système Fas/FasL dans l'homéostasie immunitaire a été mis en évidence grâce à l'identification de mutations affectant Fas ou son ligand chez l'Homme. Les personnes atteintes présentent des syndromes lymphoprolifératifs avec auto-immunité^(56, 57). Des déficiences en caspase-10 entraînent des symptômes analogues chez l'Homme⁽⁵⁸⁾. Parallèlement, les souris *lpr*, *lpr^{CG}* et *gld* dont les gènes *Fas* et *FasL* sont mutés développent des maladies lymphoprolifératives et auto-immunes comparables^(36, 37). Ces résultats indiquent que des défauts d'apoptose entraînent des désordres immuns importants. La régulation de la terminaison de la réponse immunitaire par la mort cellulaire programmée semble donc indispensable au maintien de l'intégrité de l'organisme.

Un dernier aspect du rôle de l'apoptose dans la régulation de la réponse immunitaire est illustré par les phénomènes de « cross-priming » et de « cross-tolerance », dont les mécanismes commencent à être compris. L'ingestion de cellules apoptotiques par des APCs professionnelles (essentiellement les DCs et les macrophages) permet, dans certains cas, la présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I⁽⁵⁹⁾. Ainsi, la phagocytose d'une cellule apoptotique par une cellule dendritique immature (iDC) en présence de signaux de maturation tels que des cytokines pro-inflammatoires, ou des constituants microbiens (l'ARN, LPS etc...), va permettre d'initier une réponse antigénique cytotoxique en activant des lymphocytes T CD8⁺. Par contre, en l'absence de signaux de maturation, une réponse tolérogénique envers ces mêmes antigènes va être mise en place⁽⁵⁹⁾. R.

Steinman émet de ce fait l'hypothèse que le maintien de la tolérance est un phénomène actif qui implique l'ingestion continue de cellules apoptotiques (résultant du renouvellement normal des tissus) et la présentation d'antigènes du soi par les DCs dans un contexte tolérogène^[60]. Une meilleure compréhension de ces phénomènes devrait permettre des manipulations du système immunitaire dans un but thérapeutique. On peut envisager l'élaboration de nouveaux vaccins anti-viraux, parasitaires et tumoraux^[61, 62], ou à l'inverse induire une tolérance active et durable vis-à-vis de greffons allogéniques^[63]. Enfin, on peut espérer pouvoir éviter ou dévier certaines manifestations auto-immunes^[64].

3. La leucémie lymphoïde chronique

3.1. Définition

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie de l'adulte la plus fréquente en occident. Elle se manifeste par l'accumulation clonale de petits lymphocytes B d'aspect normal, arrêtés au stade G0/G1 du cycle cellulaire. Les cellules B de LLC sont caractérisées par les marqueurs membranaires CD5 et CD23, et arborent les marqueurs pan B classiques (CD19, CD20, CD21, CD24, CD37 et HLA-DR). Phénotypiquement intermédiaires entre pre-B et B matures, les B de LLC expriment faiblement les immunoglobulines de surface (sIg) de types M et D, généralement monotypiques^[65]. Cliniquement, la LLC se définit par une lymphocytose sanguine supérieure à 5 000/mm³ et une lymphocytose médullaire supérieure à 30%. Deux classifications basées sur des observations cliniques et biochimiques sont utilisées conjointement pour définir les différents stades de la maladie. Il s'agit des classifications Binet^[66] et Rai^[67] du nom de leurs auteurs (voir tableau II).

L'étiologie exacte de la LLC n'est pas définie à ce jour. De plus en plus d'arguments tendent à démontrer que la LLC regroupe en fait plusieurs maladies différentes. En effet, les B de LLC présentent des disparités phénotypiques et une grande variété d'anomalies chromosomiques et génétiques, corrélées ou non aux stades et aux risques de progression de la maladie^[68-70]. Par exemple, des mutations somatiques du gène V des Ig sont retrouvées dans 50 % des cas^[71, 72], indiquant que certaines LLC seraient issues de lymphocytes B des centres germinatifs (phénotype mémoire). Ce phénotype est corrélé à un très bon pronostic (survie moyenne de 25 ans). À l'inverse, l'absence de mutations (phénotype naïf) est un mauvais pronostic. Parallèlement, la molécule CD38, un marqueur d'activation des lymphocytes B, est exprimée dans un peu moins de 30 % des LLC. Sa présence est un indicateur de mauvais pronostic. À ce sujet, une polémique s'est instaurée entre les équipes qui corrélaient CD38 à l'absence de mutations somatiques, et ceux qui en font deux facteurs pronostiques distincts^[73, 74]. On voit par ces exemples que la disparité des facteurs de risques rencontrés nécessite d'adapter les traitements au cas par cas. De plus, les recherches de drogues cytotoxiques nouvelles doivent s'orienter sur des agents à même de circonvenir la grande diversité de néoplasies que semble représenter la LLC.

3.2. Néoplasie typique d'un défaut d'apoptose

La LLC est l'archétype de la néoplasie engendrée par une faille dans le processus d'élimination des cellules par apoptose. En effet, les lymphocytes B de LLC prolifèrent peu et s'accumulent lentement en périphérie. Leur survie, anormalement longue, s'explique en partie par leur résistance à de nombreux stimuli apoptotiques. De plus, ces cellules sont ou deviennent insensibles aux drogues cytotoxiques employées en thérapie anticancéreuse. En effet, si les traitements parviennent en

premier lieu à diminuer considérablement la masse tumorale, ils ne sont pas pour autant curatifs. La LLC est une maladie très étudiée, mais, à ce jour, aucun oncogène n'a pu être rendu responsable de cette hémopathie, dont l'origine cellulaire reste incertaine.

3.2.1. Anomalies chromosomiques

Aucune anomalie chromosomique représentative de la LLC n'a été encore mise en évidence. Toutefois, de nombreuses altérations génétiques sont retrouvées à divers degrés dans cette néoplasie. La plus fréquente est la délétion 13q14 qui est retrouvée dans 40 à 50 % des cas selon les cohortes. Le ou les gènes atteints par cette mutation n'ont pas encore été identifiés; cependant l'hypothèse de gènes suppresseurs de tumeurs est avancée. La délétion 11q22-q23, moins fréquente (entre 15 et 20%), toucherait le gène ATM (Ataxia-telangiectasie mutated). La trisomie 12 est retrouvée dans 20 à 35% des cas. Associée à un mauvais pronostic et à une progression dans la maladie, on pense que cette anomalie touche un gène du cycle cellulaire. Enfin, le gène suppresseur de tumeurs p53 est muté dans 10 à 15% des cas. La fréquence de cette mutation augmente avec la progression de la maladie^(69, 75).

Nonobstant, les caractéristiques de la LLC ne peuvent s'expliquer par la seule présence de ces altérations.

3.2.2. Résistances multiples à l'apoptose

Les B de LLC sont pour la plupart résistantes à la mort induite via FasL et le TGF β . Aucune mutation dans Fas ou le TGF- β R n'est tenue responsable de ce défaut⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾. Très récemment la protéine Daxx a été impliquée dans la voie de signalisation apoptotique du TGF- β ⁽⁷⁹⁾. Or Daxx participe également à la

TABLEAU II. Système de classification Rai et Binet pour la leucémie lymphoïde chronique.

SYSTÈME DE CLASSIFICATION ET STADES	SURVIE MOYENNE	MANIFESTATIONS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES*
<u>Classification RAI :</u>		
Stade 0	> 10 ans	Lymphocytose sanguine et médullaire.
Stade I	9 ans	Adénopathies.
Stade II	7 ans	Splénomégalie et/ou hépatomégalie et/ou adénopathies.
Stade III	5 ans	Anémie (hémoglobine < 11 g/dl) avec ou sans organomégalie.
Stade IV	5 ans	Thrombopénie (plaquettes < 100 000/mm ³) avec ou sans organomégalie.
<u>Classification BINET :</u>		
Stade A'	Id non-malades (même âge, même sexe)	Moins de trois aires palpables [⊠] et hémoglobine ≥ 12 g/dl et lymphocytose < 30 000/mm ³ .
Stade A''	10 ans	Moins de trois aires palpables et hémoglobine ≥ 10 g/dl et < 12 g/dl et/ou lymphocytose ≥ 30 000/mm ³ .
Stade B	7 ans	Trois aires palpables ou plus et hémoglobine ≥ 10 g/dl.
Stade C	5 ans	Anémie (hémoglobine < 10 g/dl) et/ou thrombopénie (plaquettes < 100 000/mm ³).
<p>* La lymphocytose est présente à tous les stades de la maladie [⊠] Les ganglions cervicaux, axillaires et inguinaux, la rate et le foie.</p>		

signalisation de l'apoptose via Fas. Des recherches dans les voies communes de signalisation de Fas et du TGF- β R apporteront peut-être des éclaircissements sur ces résistances.

L'oncogène Bcl-2 est souvent impliqué dans les hémopathies à cellules B. La translocation t(14;18) retrouvée dans les lymphomes folliculaires en est l'exemple le plus caractéristique. Elle place le gène Bcl-2 sous le contrôle de l'enhancer* de la chaîne lourde des Igs. Les lymphocytes B de LLC expriment de façon accrue la protéine Bcl-2 - entre 1,7 et 25 fois plus que des B normaux. Dans 70 % des cas, ces niveaux d'expression atteignent ceux qui sont retrouvés dans des cellules contenant le réarrangement t(14;18). Pourtant cette mutation n'est retrouvée que dans 10 % des B de LLC. Une hypométhylation de la région promotrice du gène Bcl-2 est tenu responsable de cette forte expression.

L'abondance de Bcl-2 dans les B de LLC expliquerait en partie leur remarquable insensibilité à divers stimuli apoptotiques. L'échec des traitements en serait la triste conséquence⁽¹⁴⁾. Cependant, ici encore les avis divergent. Certaines études montrent une corrélation entre la sensibilité aux drogues et le ratio Bcl-2/Bax. D'autres ne trouvent aucun lien entre les niveaux de Bcl-2, le ratio Bcl-2/Bax et la résistance aux agents cytotoxiques⁽⁶⁹⁾.

3.2.3. Facteurs de survie de la cellule B de LLC

Un des grands paradoxes de la LLC est le fait que sa survie *in vitro* ne reflète pas le caractère de longévité qu'elle possède *in vivo*. En effet, les B de LLC rentrent spontanément en apoptose lorsqu'elles sont cultivées. Ce phénomène a permis de mettre en évidence l'existence de facteurs de survie de LLC. Notamment, les cytokines telles l'IL-4, l'IL-6 et l'IFN- γ ^(70, 77, 80-82) ainsi que la chimiokine SDF-1⁽⁸³⁾,

*La traduction de « enhancer » en « amplificateur » me semblait ambiguë. Voir note p.13

protègent *in vitro* les B de LLC de l'apoptose spontanée, et parfois même lorsque celle-ci est induite par les agents cytotoxiques employés en thérapeutique. Certaines protéines de la matrice extracellulaire et le contact avec des cellules stromales produisent des effets comparables^(69, 84, 85). L'étiologie de la LLC semble donc dépendre en grande partie de son environnement. *In vivo*, un certain nombre de données indiquent qu'un profond dérèglement du compartiment T chez les patients LLC contribuerait également à la survie de leurs cellules B leucémiques⁽⁸⁶⁾. Il a été démontré que les lymphocytes T de patients LLC (ratio CD4/CD8 ~0.5) exprimaient le mRNA codant pour l'IL-4⁽⁸⁷⁾. Une étude récente révèle à ce propos que 37 à 63 % des lymphocytes T CD8⁺ de patients atteints de LLC, (contre 5 à 10 % chez des donneurs sains) produisent de l'IL-4 sur une durée qui s'étend jusqu'à 48h *in vitro*. Parallèlement, 58 % en moyenne de leurs lymphocytes B produisent également de l'IL-4⁽⁸²⁾. Cependant, cette production est plus variable (de 1 à 99 %) et perdure peu*. Enfin, les auteurs démontrent que les surnageants des cellules T CD8⁺ de LLC protègent effectivement les lymphocytes B de LLC autologues de l'apoptose, de par l'IL-4 qu'ils contiennent⁽⁸²⁾. Ces études suggèrent fortement qu'un dérèglement de la production d'IL-4 par les T CD8⁺ et les B de LLC eux même permet la survie de ces derniers *in vivo*. Le mécanisme protecteur de l'IL-4 sur les B de LLC n'a pas été pour le moment caractérisé. Cependant, on sait que l'IL-4 a pour conséquence de stabiliser les niveaux de la protéine Bcl-2 dans ces cellules⁽⁸⁰⁾. Par ailleurs, l'IL-4 augmente l'expression du CD23, un des marqueurs LLC, à la surface des lymphocytes B de LLC⁽⁸⁸⁾.

*Il serait à ce sujet intéressant d'effectuer une étude comparative entre les quantités d'IL-4 produites par les B de LLC et leur pourcentage d'apoptose spontanée *in vitro*, d'autant que ce dernier est corrélé à la sensibilité aux agents cytotoxiques utilisé en thérapie.

3.3. Cas du CD23 dans la LLC

La molécule CD23 (ou récepteur de faible affinité pour les IgE, FcεRII) est une glycoprotéine membranaire de type II de 45 kDa. Son domaine extracellulaire est homologue aux lectines animales de type C, ce qui présuppose qu'elle puisse interagir avec plusieurs ligands. Molécule instable, le CD23 est libéré par auto-clivage en une protéine de 25 kDa qui comprend le domaine C-terminal lectine. Le CD23 est exprimé à la surface des lymphocytes B matures, des macrophages activés, des éosinophiles, des cellules dendritiques folliculaires et des plaquettes. Sous forme membranaire et soluble, le CD23 exerce des fonctions pléiotropes, qui dépendent ou non des IgE^(89, 90). Le CD23 membranaire existe sous deux isoformes (A et B) qui diffèrent par 5 acides aminés dans leurs portions cytoplasmiques. Ces isoformes sont issues de la transcription différentielle du même gène. La régulation de l'expression du CD23 est anormalement contrôlée dans les lymphocytes B de LLC. Contrairement aux cellules B normales qui n'expriment ordinairement que le CD23A, les B de LLC expriment les deux isoformes. L'IL-4 induit une forte expression du CD23B sur les B normaux alors qu'il n'a pas d'effet sur celui des B de LLC. Il induit cependant l'expression accrue du CD23A sur ces derniers. Or, le niveau d'expression de l'isoforme A du CD23 est reliée à la potentialité de survie de la B de LLC⁽⁹¹⁾. Parallèlement, le niveau de sCD23 dans le sérum des patients LLC est une valeur pronostique avérée, des niveaux élevés reflétant un risque de progression dans la maladie et un temps de survie réduit^(92, 93). Cette molécule semble donc être impliquée dans la physiopathologie de cette néoplasie^(68, 91, 92, 94). Récemment, un nouveau ligand fonctionnel du sCD23 a été identifié⁽⁹⁰⁾. Il s'agit du récepteur à la vitronectine (VnR), le complexe trimoléculaire $\alpha\text{v}\beta\text{3}/\text{CD47}$.

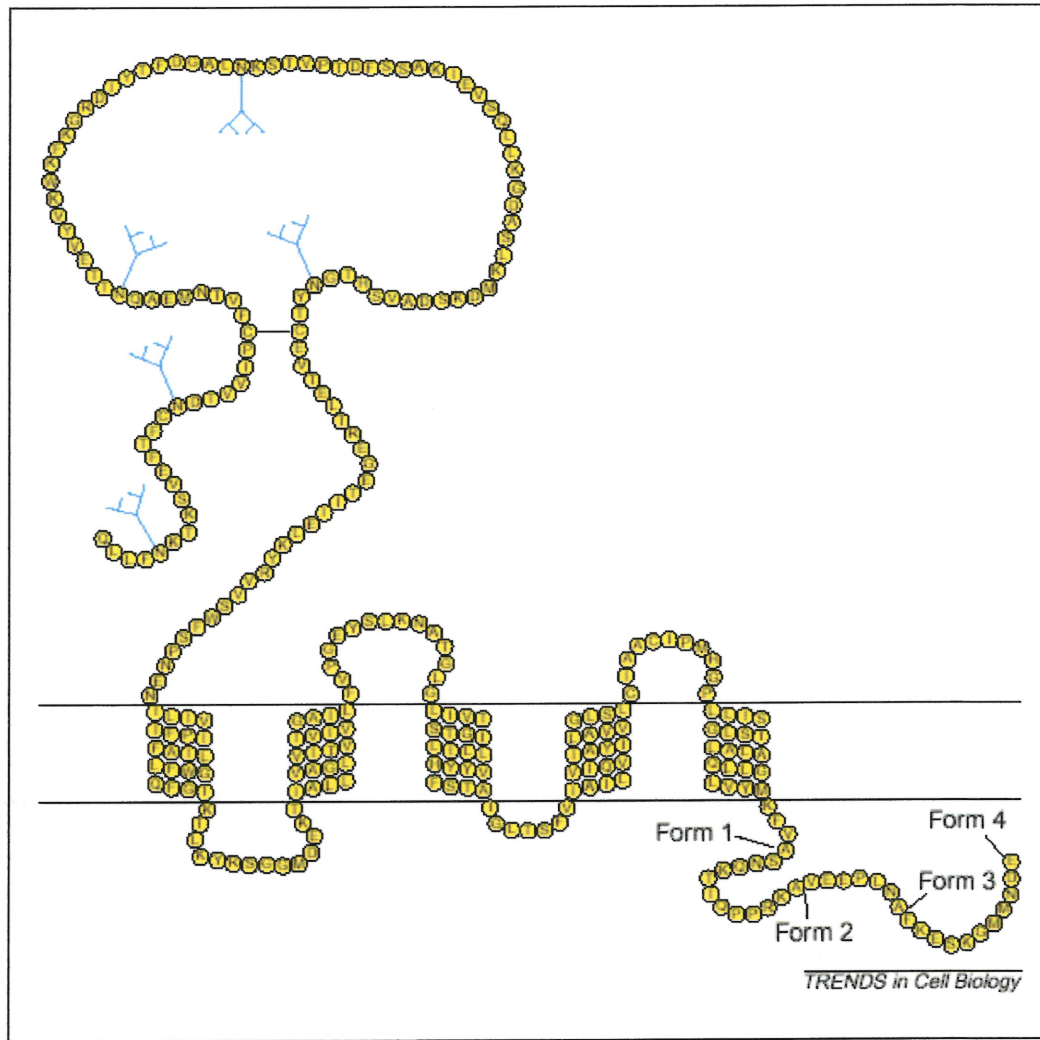
4. La molécule CD47

4.1. Description

L'antigène CD47 est une glycoprotéine membranaire de 50 kDa, exprimée de façon ubiquitaire. Son domaine extracellulaire C-terminal appartient à la super famille des immunoglobulines de type V (IgV). Son domaine transmembranaire, domaine 5TMS (TMS : *transmembrane-spanning*), possède la particularité de traverser cinq fois la membrane cytoplasmique. L'antigène CD47 est exprimé sous quatre isoformes résultant d'épissages alternatifs de son court domaine intracytoplasmique N-terminal (de 3 à 36 a.a.)^[95] (Figure 5). Ces différentes isoformes arborent des préférences tissulaires. La forme 2, majoritaire, est celle exprimée par les cellules de la lignée hématopoïétique^[96].

CD47, initialement identifiée comme IAP (*integrin associated protein*), est physiquement et fonctionnellement associée aux intégrines $\alpha\beta3$ (le VnR), $\alpha11\beta3$ (le récepteur plaquettaire au fibrinogène) et $\alpha2\beta1$ (le récepteur au collagène). Cependant, il est de plus en plus évident que CD47 exerce des fonctions indépendamment des intégrines. En effet, CD47 est exprimé à la surface de cellules qui n'expriment pas d'intégrines (comme les érythrocytes). D'autre part, il se lie indépendamment de son association avec les intégrines, à la thrombospondine (TSP) et au récepteur SIRP- α (*signal-regulatory protein-alpha*), qui sont ses deux ligands naturels identifiés à ce jour^[97, 98].

SIRP- α est une protéine membranaire qui appartient à une nouvelle famille de paire de récepteurs activateurs/inhibiteurs^[99]. Contrairement à son homologue activateur SIRP- β , SIRP- α contient deux motifs inhibiteurs ITIM (ITIM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) dans sa portion



[tiré de *TRENDS in Cell Biology* Vol.11 No.3 March 2001]

Figure 5: Structure de la molécule CD47. Le domaine extracellulaire, fortement glycosilé, est apparenté aux domaines variables des immunoglobulines (IgV). Le domaine transmembranaire traverse probablement cinq fois la membrane. Enfin le domaine cytoplasmique existe sous quatre formes issues d'épissages alternatifs. La forme la plus longue, l'isoforme 4, est représentée en entier.

intracytoplasmique. Exprimé majoritairement sur les cellules de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) et sur les neurones, SIRP- α est impliqué dans la régulation négative de signaux dépendants des protéines tyrosine kinase (PTK) et dans diverses fonctions adhésives. Le seul ligand de SIRP- α identifié à ce jour est CD47. Cependant l'existence de deux isoformes de SIRP- α et de grandes variations dans les procédés de glycosylations de cette molécule laissent supposer qu'elle puisse interagir avec d'autres ligands^[99, 100]. De façon étonnante, malgré la très grande homologie qui existe entre les domaines extracellulaires de SIRP- α et SIRP- β , il semble que CD47 ne lie pas (ou avec une affinité extrêmement faible) le SIRP- β ^[219]. L'autre ligand de CD47 est la TSP-1. Cette protéine de la matrice extracellulaire est un trimère qui existe également sous forme circulante, principalement sécrétée par les granules α des plaquettes et par certains endothéliums. Cette grosse molécule (145 kDa par chaîne peptidique) possède plusieurs ligands dont le TGF- β , le CD36 et les intégrines $\alpha\beta$ 3, α IIb β 3 et α 3 β 1. Ses fonctions sont diverses. Elle active le TGF- β , intervient dans les processus de coagulation sanguine et d'élimination des cellules apoptotiques et possède de nombreuses fonctions régulatrices de la prolifération cellulaire, de la cicatrisation et de l'angiogénèse. La TSP-1 se lie à CD47 par son domaine C-terminal CBD (CBD : *Cell binding domain*), et plus spécifiquement par la séquence peptidique RFYVMWK (peptide 4N1K). Chaque CBD contient deux régions renfermant ces séquences, ce qui implique que, puisque la TSP-1 est un homotrimère, elle peut en théorie lier six molécules de CD47^[95, 101].

4.2. Fonctions liées aux intégrines

La portion intracytoplasmique de CD47 ne contient aucun motif de signalisation connu. Son association avec les intégrines sur la même membrane (en *cis*) suggère

que puisse s'assembler un complexe multimoléculaire formant un récepteur *ad hoc* à sept domaines transmembranaires (7TMS), les 5TMS de CD47 s'associant avec le domaine transmembranaire d'une α -intégrine et celui d'une β -intégrine. Les travaux de E. Brown ont montré que ces complexes sont associés aux protéines G hétérotrimériques de type α_i (Gi)^(95, 102). Cette association dépend du domaine 5TMS de CD47 et nécessite la présence de cholestérol. Une grande partie de ces complexes pourrait se former dans des microdomaines membranaires riches en cholestérol tels que les DIGS/RAFT/GEM, puisque chaque partenaire moléculaire y est présent en grande quantité⁽¹⁰³⁾.

Les complexes intégrines/CD47 exercent des fonctions variées telles que l'adhésion, le spreading*, le chimiotactisme, la sécrétion de cytokines, l'activation et co-activation cellulaire, selon le type cellulaire examiné et les intégrines concernées. Les souris déficientes pour CD47 meurent rapidement d'une péritonite à *Escherichia coli* due à un défaut d'activation et de transmigration des granulocytes via l'intégrine $\beta 3$ ⁽¹⁰⁴⁾. Ces souris voient le nombre de leurs lymphocytes T spléniques diminué de moitié, ce qui laisse supposer qu'un défaut d'activation existe également dans ce compartiment⁽⁹⁵⁾. *In vitro*, l'engagement de CD47 sur les lymphocytes T peut avoir des effets co-stimulants⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾ ou inhibiteurs⁽¹⁰⁷⁾ en fonction de la manière dont il est engagé (par des anticorps co-immobilisé avec des anti-CD3, soluble ou agrégés). L'implication des intégrines n'a pas clairement été établie dans ces systèmes *in vitro*.

4.3. Autres fonctions

Des fonctions CD47 indépendantes des intégrines semblent exister. Par exemple, sur les érythrocytes de personnes atteintes de drépanocytose (anémie à hématies

* Cf. note p. 13. Le terme français serait « étalement ».

falciformes), l'engagement de CD47 par la TSP sérique induit l'adhésion active des globules rouges à la TSP matricielle, sous l'influence d'une force hémodynamique de type « shear stress ». Cette activation nécessite la participation de tyrosine-kinases et est sensible à la toxine pertussique, impliquant une signalisation via les protéines Gi/Go⁽¹⁰⁸⁾. Les érythrocytes n'expriment pas d'intégrines, ce qui implique que l'association de CD47 avec les protéines G peut se faire en l'absence d'intégrines. Il est possible que des partenaires moléculaires autres que les intégrines permettent cette association. À ce sujet, un travail récent de Erb *et al.* montre que CD47 s'associe physiquement et fonctionnellement au récepteur de nucléotides P2Y₂ (P2Y₂R) sur la lignée de leucémie érythrocytaire K562. Or P2Y₂R est un récepteur couplé à des protéines G de type Go/Gq, également inhibable par la toxine pertussique. Cependant, l'étude montre que le complexe CD47/P2Y₂R implique également la participation des intégrines $\alpha\beta 3$ ⁽¹⁰⁹⁾.

Enfin, CD47 est impliqué dans une anomalie rare des érythrocytes, le phénotype Rh nul. Les érythrocytes Rh nul expriment très faiblement CD47 (10 à 20 % de la normale), alors que dans les autres tissus cette expression est normale⁽¹¹⁰⁾. Ce défaut s'accompagne d'une anémie hémolytique qui pourrait s'expliquer par une destruction prématurée des érythrocytes CD47^{-/-} par phagocytose, via des macrophages. En effet, il a été récemment suggéré que CD47 est un marqueur du soi sur les globules rouges (qui n'expriment pas de CMH). Il délivrerait un signal négatif (de non-agression) aux macrophages via SIRP- α ⁽¹⁶¹⁾. De ce fait, des globules rouges issus de souris déficientes pour CD47 sont rapidement éliminés lorsque injectés à des souris syngéniques normales. Cette destruction est inhibée *in vitro* par des anticorps dirigés contre SIRP- α .

On voit par tout ce qui précède que CD47 exerce des fonctions variées à divers niveaux dans le système hématopoïétique. Nous discuterons ultérieurement des nouvelles implications de l'interaction de CD47 avec la TSP et SIRP- α dans la

régulation de la réponse immunitaire. Notamment, le rôle immunomodulateur de CD47 sera traité à la lumière des travaux présentés dans l'article III (voir Article III, et Discussion, Chap. 3.4.), auxquels j'ai contribué. Cependant, de par son expression ubiquitaire, les fonctions de CD47 ne se limitent pas aux seules cellules du système hématopoïétique. Depuis la découverte de sa liaison avec SIRP- α , son implication dans le système neuronal commence à être explorée. Récemment, la participation de CD47 dans la formation de la mémoire chez le rat a été avancée⁽¹¹¹⁾.

De nombreuses fonctions insoupçonnées de cette molécule versatile restent probablement encore à découvrir. Le travail présenté dans cette thèse contribue modestement à ce dévoilement, en ajoutant un morceau supplémentaire au puzzle CD47, dont le nombre de pièces n'est pas précisé !

L'initiation du projet de recherche qui a aboutit à ce travail de doctorat part de l'observation suivante : en cherchant à étudier le rôle que pouvait jouer le récepteur $\alpha\beta 3/CD47$ dans la survie des lymphocytes B issus de patients atteints de LLC, nous avons observé que l'engagement de la molécule CD47 par des anticorps monoclonaux immobilisés induisait une diminution de l'expression du CD23 sur les B de LLC⁽¹¹²⁾. Cette diminution s'accompagnait d'une baisse de viabilité de ces cellules (voir article I). La caractérisation et l'analyse des phénomènes accompagnant cette baisse de viabilité constituent l'essentiel de mon travail de doctorat.

RÉSULTATS

1. Article I

Nous avons vu précédemment que la molécule CD23 joue un rôle important dans la physiopathologie de la LLC. Suite à l'identification du récepteur à la vitronectine comme étant également un récepteur fonctionnel du CD23 par un de mes collègues, nous avons cherché à étudier le rôle du complexe $\alpha\beta3/CD47$ dans les B de LLC. Le travail qui suit en découle.

Nous avons observé que l'engagement de CD47 par des anticorps immobilisés induisait une diminution de l'expression membranaire du CD23, corrélée à une baisse de viabilité des B de LLC. Nous avons caractérisé cette mort cellulaire et démontré qu'elle se définit par les événements exclusivement cytoplasmiques de l'apoptose, comme l'ecto-exposition des phosphatidylsérines, la diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et la chute du potentiel membranaire mitochondrial. Cette mort cellulaire est particulière dans le sens où elle a lieu en l'absence d'activation des caspases et sans aucun des événements nucléaires de l'apoptose détectable. D'autre part, nous avons pu induire cette mort cellulaire dans tous les B de LLC que nous avons testé (42/42), alors que notre cohorte contenait des patients dont les cellules présentaient une résistance *in vitro* à la mort induite par l'hydrocortisone. Enfin, la mort cellulaire induite par l'engagement de CD47 a lieu malgré la présence des facteurs de survie connus pour inhiber l'apoptose spontanée et induite par les drogues cytotoxiques employées en thérapie LLC. Nous proposons que cette nouvelle forme de mort cellulaire puisse aboutir à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la LLC, considérée à ce jour comme incurable.

Ma contribution représente 95% du travail expérimental.

**CD47 LIGATION INDUCES CASPASE-INDEPENDENT CELL DEATH IN CHRONIC
LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA**

V. Mateo^{*}, L. Lagneaux[†], D. Bron[†], G. Biron[§], M. Armant[‡], G. Delespesse^{*}, and M. Sarfati^{*}.

Nature Medecine vol. 5(11), 1999, p. 1277-1284

^{*} Laboratoire d'allergie, Centre de Recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal, Canada.

[§] Département d'hématologie, CHUM, Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal, Canada.

[†] Département d'hématologie, Institut Bordet, Bruxelles, Belgique.

[‡] Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

Address for correspondence:

Dr. M. Sarfati

Université de Montréal

Laboratoire d'allergie (M4211-K)

Centre de Recherche du CHUM

Hôpital Notre-Dame

1560 rue Sherbrooke Est

Montréal, Quebec

H2L 4M1, Canada

TEL: (514)281-6000 Ext. 6632

FAX: (514)896-4753

e-mail:sarfatm@poste.umontreal.ca

SUMMARY

Thrombospondin forms a "molecular bridge" between phagocytic and apoptotic cells through interaction with $\alpha v\beta 3/CD36$. We report that engagement of CD47, a newly described thrombospondin receptor, by immobilized monoclonal antibody against CD47 or by thrombospondine induced in all B-cell chronic lymphocytic leukemia clones the cytoplasmic features of apoptosis (cell shrinkage, decrease in mitochondrial transmembrane potential and phosphatidylserine externalization) without the nuclear features (chromatin condensation, appearance of single-stranded DNA, DNA fragmentation and cleavage of poly ADP-ribose polymerase). These cytoplasmic events of apoptosis were not prevented by the addition of caspase inhibitor z-VAD-fmk, nor by the presence of survival factors (such as IL-4 and gamma interferon) or cell activation. Morphological studies confirmed the integrity of the nucleus and showed swelling of the mitochondria. This caspase-independent death pathway may be relevant to the development of alternate therapeutic strategies in chronic lymphocytic leukemia, which remains an incurable disease.

INTRODUCTION

B-cell chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is the most common haematological malignancy in Western countries¹. CLL is characterised by the in vivo accumulation of long-lived and slow-dividing monoclonal B-cells arrested at the G₀/G₁ phase of the cell cycle, typically co-expressing CD5, CD20 and CD23 molecules. Clinical staging (Rai and Binet classification), bone marrow biopsy and measurement of soluble CD23 (a cleavage product of membrane CD23)¹² are independent prognostic factors that may predict the outcome of the disease with a median survival of 1.5 years for high risk group patients.

Despite the development of new chemotherapeutic agents such as fludarabine and 2-chlorodeoxyadenosine which induce apoptosis of the malignant cells, CLL is not considered to be curable. The response rates to therapy vary widely among studies^{3,4} and chemoresistance is perhaps attributable to a defect in programmed cell death (PCD) of CLL lymphocytes. Several biological or cellular factors, including IL-4, IFN γ and contact with stromal cells, protect B-CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptotic cell death^{5,7}, and may as such be responsible for the in vivo prolonged half-life of the malignant lymphocytes.

Apoptosis or PCD is a physiological cell death that leads to maintenance of homeostasis^{8,9}. In its classic form, apoptosis is characterised by well-defined ultrastructural changes, including cell shrinkage, exposure of phosphatidylserine (PS) at the outer leaflet of the cytoplasmic membrane, changes in mitochondrial permeability, membrane blebbing, chromatin condensation and ultimately DNA degradation. Activation of a family of cysteine proteases, collectively termed caspases, is a central event in the execution phase of apoptosis that leads to DNA degradation¹⁰. Caspases cleave key cellular and nuclear factors, including ICAD (inhibitor for caspase-activated DNase), PARP (poly ADP-ribose polymerase), lamins and histones (H1 and H2). In most instances, specific caspase inhibitors block the

cytoplasmic and nuclear events of apoptosis. Nevertheless, several studies reported the occurrence cell death in the presence of broad caspase inhibitors, z-VAD-fmk or BD-fmk¹¹⁻¹⁸. For example, the pro-apoptotic Bax protein provoked early fall in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and induces cell death in the presence of z-VAD-fmk¹⁸, strongly suggesting the existence of caspase-independent cell death pathways.

Apoptotic cells, marked for disposal by the exposure of PS, are readily engulfed by phagocytes, like macrophages and dendritic cells, using not fully characterised receptors¹⁹. Recent studies suggested the involvement of PS receptor (perhaps CD14), TSP receptors ($\alpha\beta3$, CD36), $\alpha\beta5$ and scavenger receptors in the apoptotic cells uptake²⁰. The precise role of TSP in this recognition process is not defined, except that it "bridges" phagocytic and apoptotic cells via unidentified moieties expressed on the dying cells²¹.

The CD47 Ag, a multispan transmembrane glycoprotein, is a newly described TSP receptor which is physically and functionally associated with the vitronectin receptor, $\alpha\beta3$ [CD51/CD61]²²⁻²⁴. However, CD47 is abundantly expressed in cells displaying low levels of integrins, such as normal and leukaemic B-cells as well as T cells²⁵.

Here, we demonstrate that engagement of CD47, by monoclonal antibody against CD47 or its natural ligand TSP, induces a caspase-independent cell death in B-CLL cells. As CD47-mediated apoptosis is observed in all 42 CLL patients examined, despite the presence of IL-4, IFN γ or cell activation, this cell death pathway opens avenues for new therapeutic strategies in CLL disease.

RESULTS

1. CD47 ligation induces apoptosis in B-CLL patients.

Besides their CD5 and CD23 expression, B-cells from CLL patients expressed CD47, a newly described TSP receptor, as well as its associated integrin receptor CD51/CD61 (fig. 1a). We first observed that engagement of CD47 by immobilised, but not soluble monoclonal antibody against CD47, significantly reduced CD23 but not CD5 expression (Fig. 1b), and provoked a strong attachment of the B-CLL cells to the plastic-coated wells. Adherent B-CLL cells displayed a reduced cell viability as measured by trypan blue dye exclusion ($p < 0.0001$, $n = 12$) (Table I). Because immobilised monoclonal antibody against CD5 also induced B-CLL cells to firmly attach to the wells without altering cell viability, we subsequently used it as an irrelevant cell-binding control monoclonal antibody. Glucocorticoids-induced apoptosis in B-CLL cells is associated with CD23 down-regulation⁶, whereas B-CLL proliferation correlated with CD23 overexpression²⁶. Moreover, hyper-crosslinking of CD20, CD19, HLA-DR and surface IgM reportedly induced apoptosis of tumour B-cells²⁷⁻³⁰. Therefore, we next determined whether reduced cell viability by CD47 engagement was correlated with induction of apoptosis

CD47 ligation by immobilised monoclonal antibody against CD47 or by its natural ligand TSP induced, after 18 hours, typical features of apoptosis: cell shrinkage (reduction in FSC and SSC), exposure of phosphatidylserine (PS) as demonstrated by the increased binding of Annexin-V FITC, and loss in mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$) as measured by decrease in DiOC₆(3) staining (Fig. 2a and not shown). Monoclonal antibody against CD47 induced cell death in 42 out of 42 B-CLL clones examined ($p = 0.0001$) (Fig. 2b), including 2 out of 21 patients resistant to glucocorticoids-induced apoptosis. Although spontaneous apoptosis reportedly correlated with in vitro drug sensitivity³¹, our data failed to demonstrate

such a correlation ($p = 0.3$; $n = 42$, V. Mateo, unpublished observations). Kinetic studies indicated that attachment of B-CLL cells and increase in the number of Annexin-V positive cells occurred as early as 30 minutes after CD47 ligation, and was not reversible (Fig. 2c). In cell preparations treated with monoclonal antibody against CD47, apoptotic cells (PS^+/PI^-) displayed a decrease in cell size (FSC/SSC) similar to that observed in HC-treated cells, while heat-induced necrotic cells (PS^+/PI^+) were rapidly swollen. After 18 h, the level of spontaneous apoptosis (PS^+/PI^-) and late necrosis (PS^+/PI^+) was similar in B-CLL cells untreated and treated with monoclonal antibody against CD5; the latter were strongly attached to the plastic-coated wells, indicating that PS exposure did not result from the detachment procedure. As predicted from the kinetics, the induction of cell death did not require *de novo* transcription since it was still observed in the presence of actinomycin D (not shown).

Finally, the induction of apoptosis was CD47 but not Fc-mediated, and absolutely required cross-linking of CD47 : (i) CD47 ligation by two monoclonal antibodies of different isotype specificity (such as IgG1 and IgG2a) efficiently induced apoptosis (Fig. 3a). The cell death induced by monoclonal antibody against CD47 was completely abrogated by preincubation of the monoclonal antibody with the CD47-Fc protein, made by the fusion of the extracellular domain of CD47 and Fc fragment of IgG (Fig. 3b). Immobilised divalent or monovalent fragments of monoclonal antibody against CD47 displayed pro-cell death activity (Fig. 3c). Moreover, as TSP binds to CD51/CD61 in addition to CD47, we demonstrated that TSP-mediated killing occurred via CD47 by using 4N1K, a peptide corresponding to the cell-binding domain of TSP, selectively bidding CD47. 4NGG, a control mutant peptide, had no effect (Fig.3d). Cross-linking of monoclonal antibody against CD47 by immobilized goat monoclonal antibody against mouse induced a level of apoptosis similar to that induced by immobilizes monoclonal antibody against CD47 (Fig. 3e).

These results demonstrated that all B-CLL clones can be induced to die by apoptosis after CD47 engagement by cross-linked monoclonal antibody or by its natural ligand, TSP.

2. CD47 mAb-induced cell death is not prevented by Bcl-2 overexpression, survival factors or cell activation.

The proto-oncogene Bcl-2 was found to be overexpressed in CLL^{32,33}. Reduction of cell viability during in vitro culture or following treatment with cytotoxic agents was correlated with down-regulation of Bcl-2 expression^{32,34}. We found a sustained and elevated level of Bcl-2 expression in B-CLL cells treated with monoclonal antibody against CD47, using Western blot and intracytoplasmic staining techniques [V. Mateo, unpublished observations].

We⁵ and others³⁵ previously reported that spontaneous or drug-induced apoptosis can be prevented by supplementing the culture medium with survival factors such as IL-4 or IFN γ . In addition to these cytokines, cell-cell or cell-matrix interactions³⁶ or contact with stromal cells⁷ protected the malignant cells from apoptosis. Here, neither IL-4 or IFN γ , nor contact with L fibroblasts or autologous bone marrow stromal cells was capable of rescuing B-CLL cells from apoptosis induced by monoclonal antibody against CD47 (Fig. 4), while both cytokines prevented spontaneous apoptosis (not shown). Cell activation by phorbol esters (such as phorbol myristate acetate) or CD40 ligand (CD40L) are also commonly used to prevent B-CLL cells from apoptosis^{37,38}. In contrast, apoptosis mediated by monoclonal antibody against CD47 still occurs after ligation of CD40 in the presence of IL-4 or phorbol myristate acetate stimulation (Fig. 4 and not shown).

These data indicated that cell death mediated by monoclonal antibody against CD47 was still occurring in the presence of exogenous rescuing cytokines (i.e. IL-4 or IFN γ), stromal cells or cell activation.

3. CD47-mediated cell death is caspase-independent.

We next investigated the mechanisms underlying cell death mediated by monoclonal antibody against CD47. Although B-cells isolated from CLL donors expressed Fas³⁸ and FasL³⁹ (and personal observations) and endogenously produced TGF β , the malignant cells reportedly displayed an *in vitro* resistance to Fas and TGF β -R-mediated cell killing^{38,40}. The failure of neutralising anti-FasL and anti-TGF β monoclonal antibodies to prevent apoptosis induced by monoclonal antibody against CD47, largely excluded the involvement of Fas-FasL interactions or endogenous TGF β in this cell death (data not shown).

In most published instances, glucocorticoids and chemotherapeutic agents used clinically, like chlorambucil, 2-chloro-2' deoxyadenosine and fludarabine, as well as other drugs like aspirin and flavopiridol induced apoptosis in CLL lymphocytes through activation of cysteine-proteases of the CED3/ICE family, termed caspases⁴¹⁻⁴⁶. Inhibition of these caspases usually blocked apoptosis triggered by these different stimuli. We here observed that up to 200 μ M of z-VAD-fmk, a broad caspase inhibitor, did prevent glucocorticoids but not phosphatidylserine exposure and cell shrinkage induced by monoclonal antibody against CD47 in 12 out of 12 B-CLL clones examined (Fig. 5a and not shown), indicating that cell death mediated by monoclonal antibody against CD47 may occur in the absence of caspase activation.

Caspases, by cleavage of key cellular proteins, induced typical nuclear features of apoptosis like chromatin condensation and fragmentation^{9,10}. The cell death induced by monoclonal antibody against CD47 was not associated with DNA cleavage [appearance of subG1 DNA (Fig. 5b), detection of single stranded DNA (Fig.

5c), and poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP) cleavage (Fig. 5d). Moreover, we failed to evidence internucleosomal DNA laddering [data not shown]. All the above mentioned typical nuclear features of apoptosis were observed following glucocorticoids treatment of B-CLL cells and were completely inhibited by the presence of z-VAD-fmk (Fig. 5), indicating that caspase-dependent events may be induced in the same CLL lymphocytes. Furthermore, caspases-3, -7, -8 and -9 remained as precursors forms in CD47-treated cells demonstrating the absence of caspase activation in this particular cell death [V. Mateo, unpublished data].

4. CD47 ligation induces morphological changes.

To further confirm that CD47 ligation exclusively induced cytoplasmic events of apoptosis, we performed some morphological studies (Fig. 6). First, we observed that CD47 ligation by immobilised but not soluble monoclonal antibody against CD47 induced elongation and spreading of the cells (Fig. a, panel d). Direct staining with Annexin-V FITC of non-detached B-CLL cells showed increased number of brightly stained positive cells when cultured on immobilized monoclonal antibody against CD47, compared with untreated cells, or cells treated with soluble monoclonal antibody against CD47 or immobilized monoclonal antibody against CD5 (Fig 6, panels e-h), further excluding the possibility that the PS exposure may have result from the detachment procedure. Nuclear staining (i.e. DAPI) showed equal low number of apoptotic cells (chromatin condensation) in the four cell preparations (Fig. 6 panels i), which correlated with the level of spontaneous apoptosis assessed by Annexin-V staining. Electron micrographs (Fig. 7) confirmed that B-CLL cells immobilized on plates coated with monoclonal antibody against CD47 had apparently intact nucleus (Fig. 7e and f). In contrast, there was chromatin condensation in hydrocortisone-treated B-CLL cells (Fig. 7h). Necrotic cells showed typical morphological changes (Fig. 7d), and untreated cell (Fig. 7a), or cells treated

with soluble monoclonal antibody against CD47 (Fig. 7b), or immobilised monoclonal antibody against CD5 (Fig. 7c) showed the morphology of intact cells. CD47-mediated cell death was associated with various degrees of intracristal swelling of the mitochondria (Fig. 7g) supporting our unpublished observations that CD47 ligation induced a decrease in $\Delta\Psi_m$ measured by in DiOC₆(3) staining (V.M. *et al.* unpublished observations).

DISCUSSION

CD47 ligation on B-CLL cells by monoclonal antibody or TSP triggers caspase-independent cell death in all 42 patients examined. This CD47-mediated death is characterised by the presence of typical cytoplasmic features of apoptosis including cell shrinkage, exposure of phosphatidylserine and decrease of membrane mitochondria potential, in the absence of caspase activation and caspase-induced nuclear events. The extranuclear events of CD47 mAb-induced apoptosis occur very rapidly (less than 1 h), are not blocked by the presence of caspase inhibitors, z-VAD-fmk and DEVD-fmk (Fig. 5 and not shown) and are associated with various degrees of mitochondrial swelling (Fig. 7).

Recent studies have demonstrated the uncoupling of nuclear and extranuclear events of apoptosis¹¹⁻¹⁸. Caspase inhibitors inhibited all the apoptosis-related nuclear but not cytoplasmic changes triggered by various factors, including adenovirus E4orf4¹³, CD2¹⁵ or CD95 (Fas) ligation^{11,12}, ubiquitin degradation¹⁷ and overexpression of Bax¹⁸ underlying the coexistence of caspase-dependent and independent death pathways. In the CD95 system, CD95 ligation on myeloid cell lines triggered caspase-mediated apoptosis and accumulation of GD3 gangliosides, which in turn altered mitochondrial function and promoted cell death, in a caspase-independent manner¹². Also, CD95 ligation in caspase-8 deficient Jurkat T cell line, resulted in a killing process which did not involve DNA degradation but was accompanied by the swelling rather than shrinkage of the cells, similar to that seen in necrosis¹¹.

Here, CD47 ligation provokes cell shrinkage and killing of the B-CLL cells in the absence of *de novo* transcription and caspase activation. This previously unknown cell death pathway is unique with the exception of that induced by CD45 cross-linking in immature thymocytes¹⁴ and by the overexpression of PML, a nuclear-matrix associated protein, in rat fibroblasts¹⁶. In the latter case, PML expression

rapidly triggered cytoplasmic features of apoptosis in the absence of typical nuclear events, except for a moderate appearance of subG1 DNA (TUNEL positivity).

Electron micrographs of CD47 mAb-treated B-CLL cells further confirm the apparent integrity of the nucleus and reveal important swelling of the mitochondria, which is indicative of an increase in permeability of the mitochondrial membrane. Mitochondria are implicated in the effector phase of apoptosis through the release of several apoptogenic proteins including cytochrome c, AIF, and caspases. Interestingly, AIF, like CD47 ligation, caused mitochondria to markedly swell ; however, AIF also induced chromatin condensation in isolated nuclei ; none of this events were prevented by z-VAD-fmk⁴⁷. The proteins of the Bcl-2 family regulate the effector phase of apoptosis by controlling the opening of mitochondrial permeability transition pores⁴⁸. Bcl-2 inhibited the mitochondrial release of AIF⁴⁷ ; in contrast, the high expression levels of Bcl-2 in B-CLL cells did not affect CD47 mAb-induced killing.

Externalisation of phosphatidylserine is a characteristic of early apoptotic cells^{8,49} that is required for their engulfment by professional phagocytes (macrophages and dendritic cells). Blockade of phosphatidylserine exposure by antimycin A and oligomycin without preventing DNA degradation in the dying cells inhibited their phagocytosis⁵⁰. The vitronectin receptors, $\alpha v \beta 3$ and/or $\alpha v \beta 5$, are participating to the recognition or phagocyte process, which are both inhibited by vitronectin or RGD peptides^{51,52}. In contrast, TSP, the natural ligand of CD47, facilitates the elimination of apoptotic cells by interaction with $\alpha v \beta 3 / CD36$ on the phagocytes and an unidentified structure on the dying cells²¹. Increased number of TSP binding sites²⁰ and up-regulation of CD47 expression were reported in cells dying by apoptosis⁵³. However, B-CLL cells are likely not to be in contact with immobilised TSP in the secondary lymphoid organs since TSP is absent from the mantle zone, the predominant site of B-CLL accumulation *in vivo*.

The CD47 antigen, or integrin associated protein (IAP) reportedly participated to the function of vitronectin receptor, $\alpha v\beta 3$ in neutrophils and monocytes^{22,23}. *Ex-vivo* isolated B-CLL cells expressed CD47, CD23 and $\alpha v\beta 3$; CD23 and $\alpha v\beta 3$ expression significantly increased upon cell activation^{26,54}. Nevertheless, unlike CD47 ligation, engagement of $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ or CD23 by their respective immobilized monoclonal antibodies, or contact with fibronectin (an extracellular matrix-protein that binds $\alpha v\beta 3$ but not CD47), failed to induce apoptosis in resting or CD40L-activated B-CLL cells (data not shown). In contrast, fibronectin interaction with $\alpha 4\beta 1$ prevented apoptosis in B-CLL⁵⁵.

CD47-mediated cell death is a caspase-independent process that occurred in all B-CLL clones tested and was not circumvented by conventional protective cytokines (such as IL-4 and IFN γ). In contrast, the biochemical mechanisms underlying drug-induced apoptosis in B-CLL are caspase-mediated; they are reversible by exogenous IL-4, not restricted to malignant B-cells and 25% of CLL patients are chemoresistant³⁴. Our preliminary data indicate that CD47 ligation may affect survival of other cell-types (V.M. *et al.*, manuscript in preparation).

In conclusion, CD47 may signal cell death through a previously unknown caspase-independent pathway. This may open avenues to the development of alternate therapeutic strategies in CLL, which is as present an incurable disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the department of Pathology (Notre-Dame Hospital) for the electron microscopy data. This work was supported by MRC grant # MT 13311 and # MT 14432.

Table 1 Reduced B-CLL-viability on immobilised CD47 mAb

Patient number	% of viable-cells			
	Medium	Soluble CD47 mAb	Immobilized CD47 mAb*	Immobilized CD5 mAb
2	-	-	42	71
8	76	76	55 (1.5)	77 (3.0)
12	97	96	74 (2.6)	97 (4.5)
13	97	96	79 (2.7)	98 (4.0)
15	-	-	71	84
21	100	100	83 (2.3)	99 (3.4)
25	94	95	80 (2.3)	96 (3.6)
30	-	-	78	92
34	98	99	69 (1.8)	93 (3.6)
35	84	93	61 (1.9)	88 (3.6)
36	91	91	76 (2.2)	92 (4.1)
38	94	95	77 (2.1)	93 (3.2)

B-CLL cells ($4 \cdot 10^6$ /ml) were cultured overnight as indicated. Cell viability was assessed by trypan blue exculsion dye (%). Recovery of viable cells are indicated in parenthesis. * p = 0.0001, n = 12 (immobilised CD47 vs CD5

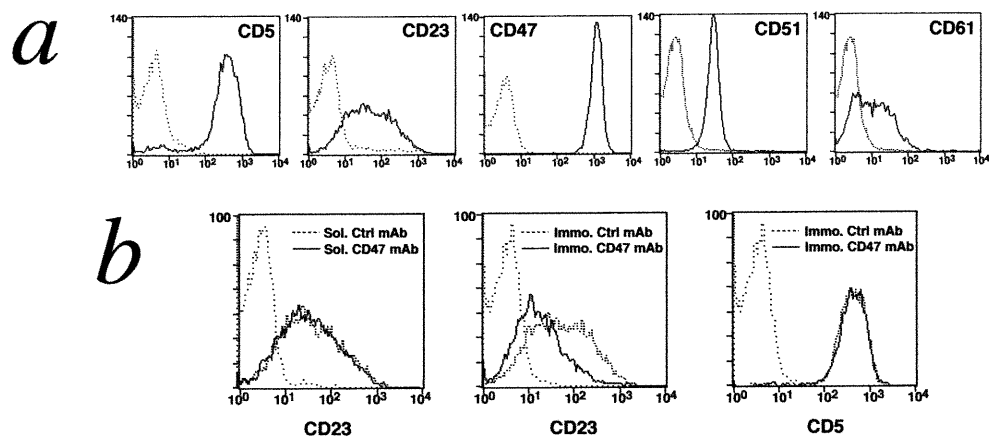


Fig. 1: CD5 and CD23 expression on B-CLL lymphocytes after CD47 mAb treatment. a) Freshly isolated B-CLL cells were stained for CD5, CD23, CD47, CD51 and CD61 expression and analysed by flow cytometry: (—) positive mAb ; (.....) isotype-ctrl matched mAb.**b)** B-CLL cells were cultured with soluble or immobilised ctrl or CD47 mAbs (10 µg/ml). After overnight incubation, cells were collected and analysed by flow cytometry for CD23 and CD5 expression. Dotted lines histograms show staining with corresponding isotype-matched ctrl mAb. One representative experiment out of 6.

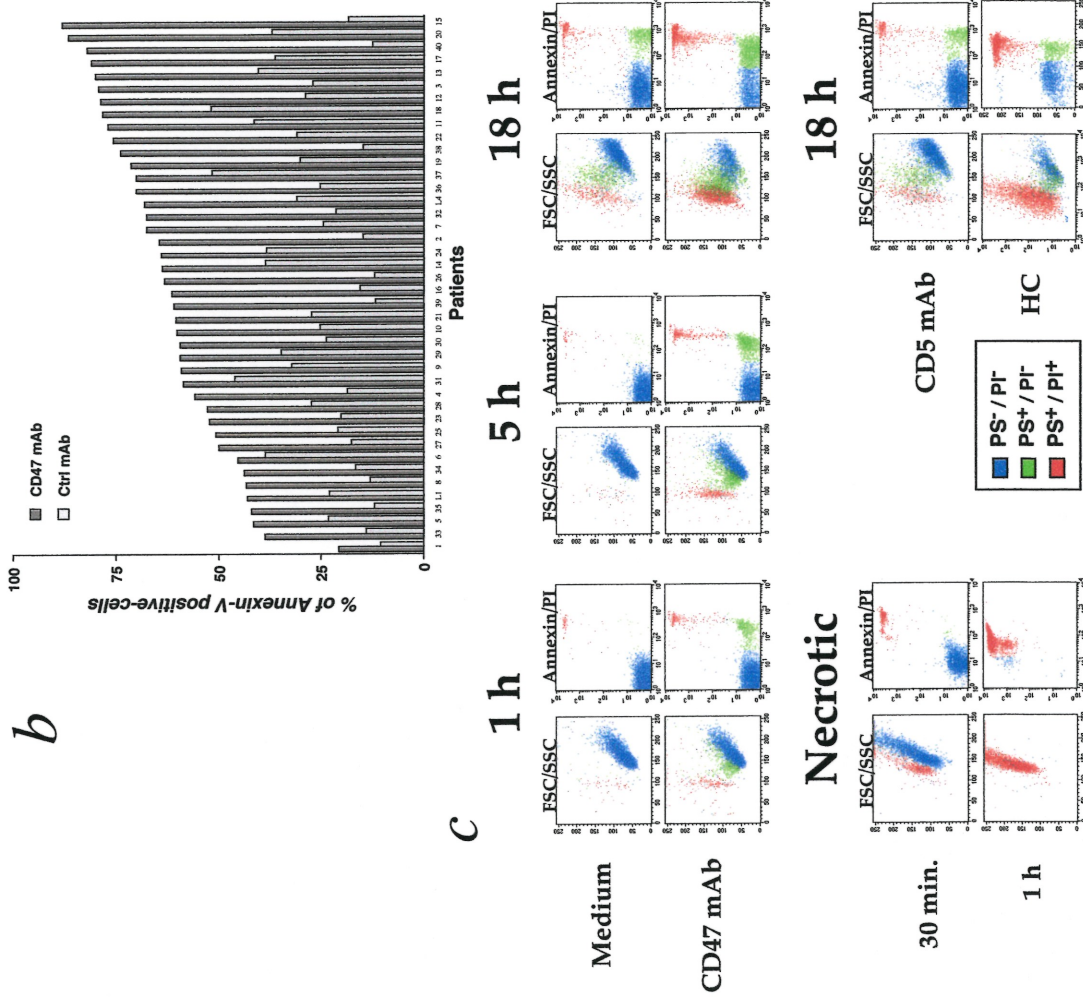


Fig. 2 CD47 ligation by immobilised CD47 mAb or thrombospondin (TSP) induces apoptosis in B-CLL cells. a) Cells were cultured overnight in the absence or presence of soluble or immobilised CD47 mAb, or TSP; after 18 h cells were double-stained with FITC-labelled Annexin-V and PI, and analysed by flow cytometry. One representative experiment out of 6. b) B-CLL cells isolated from 42 patients were cultured overnight in presence of immobilised CD47 or ctrl (CD5) mAbs and analysed as in panel a: % Annexin-V positive cells represents % Annexin⁺/PI⁻ + % Annexin⁺/PI⁺ cells. c) B-CLL cells were left untreated (medium), or cultured on immobilised CD47 or CD5 mAbs at the indicated times. Some cells were treated with HC at 5.10⁻⁴M, or heated at 56 °C. Flow cytometry was performed as in panel a.

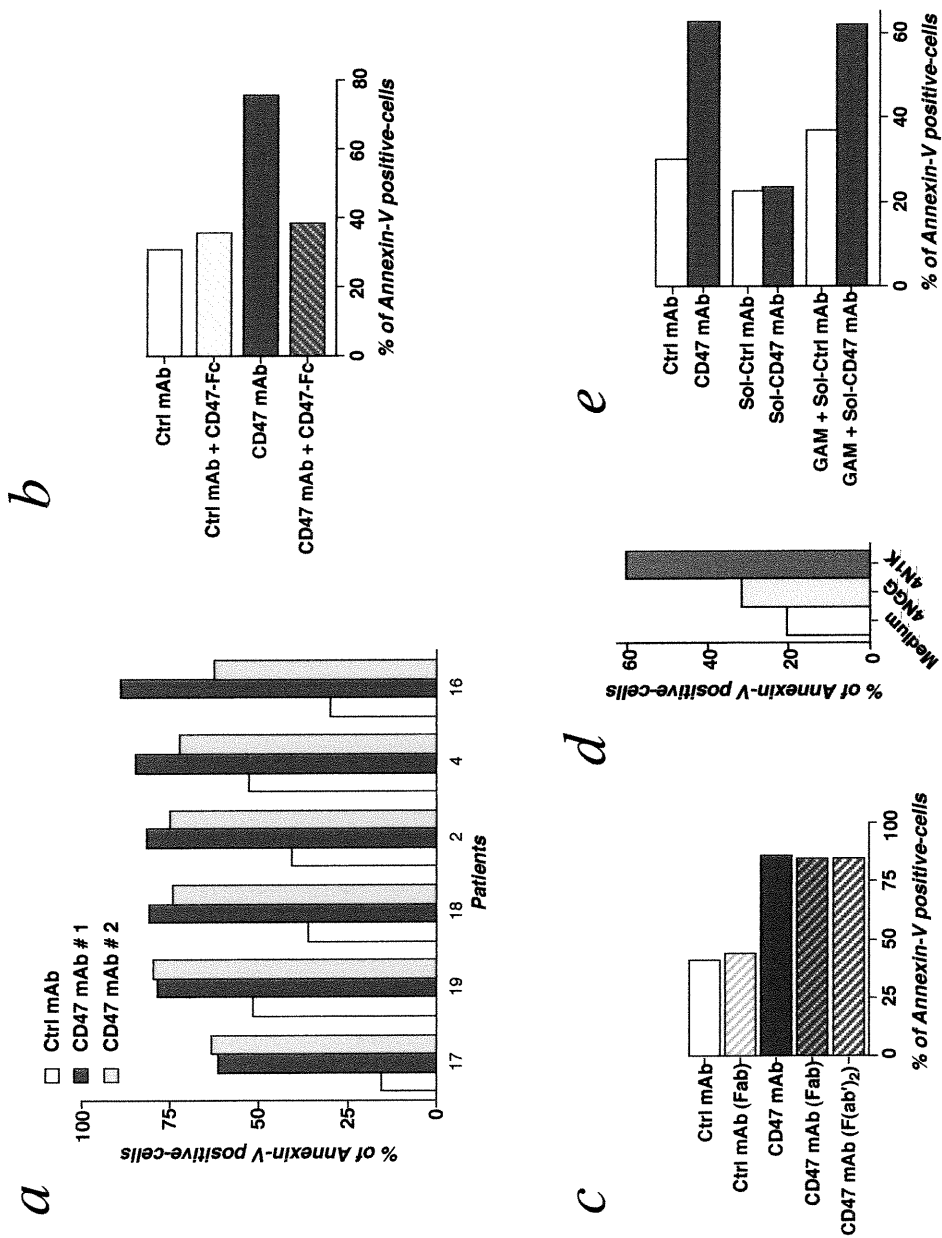


Fig. 3 Induction of apoptosis by CD47 mAb is CD47 but not Fc-mediated and requires CD47 cross-linking. a) B-CLL cells were cultured on immobilised ctrl or two different CD47 mAbs (#1 : B6H12 ; #2 : BRIC126). **b)** mAbs coated-plates were supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CD47-Fc protein when indicated before culture. **c)** B-CLL cells were cultured on immobilised intact (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or Fab fragment (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of ctrl mAb, intact (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Fab or F(ab')₂ fragments of CD47 mAbs (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). **d)** B-CLL cells were cultured on immobilised CD47-binding peptide 4N1K or the corresponding mutant peptid 4NKG. **e)** B-CLL cells were cultured with soluble or plastic-coated CD47 or ctrl mAb, or with pre-coated goat anti-mouse antibodies [GAM] in the presence of soluble mAbs. Analysis were performed as in Fig. 2. One representative experiment out of 4.

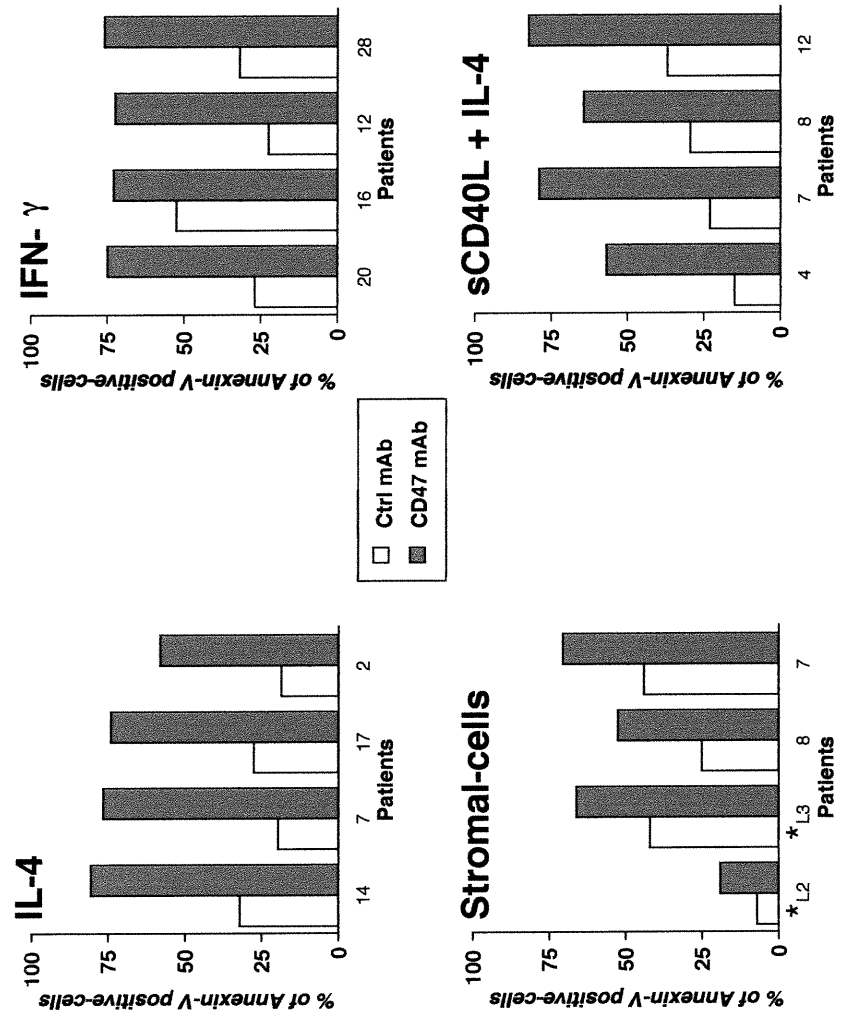


Fig. 4: Apoptosis induced by monoclonal antibody against CD47 is not prevented by survival factors or cell activation. B-CLL cells were cultured or immobilized monoclonal antibody against CD5 (white) or CD47 (grey) in the presence of 10 ng/ml IL-4 (a), 500 U/ml IFN-γ (b), or 5 μg/ml soluble CD40L and IL-4 (d), or were co-cultured with L-fibroblast cells (patients 8 and 7) or with autologous stromal cells (L2 and L3) (c). After culture, cells were double-stained with FITC-labeled annexin-V and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry.

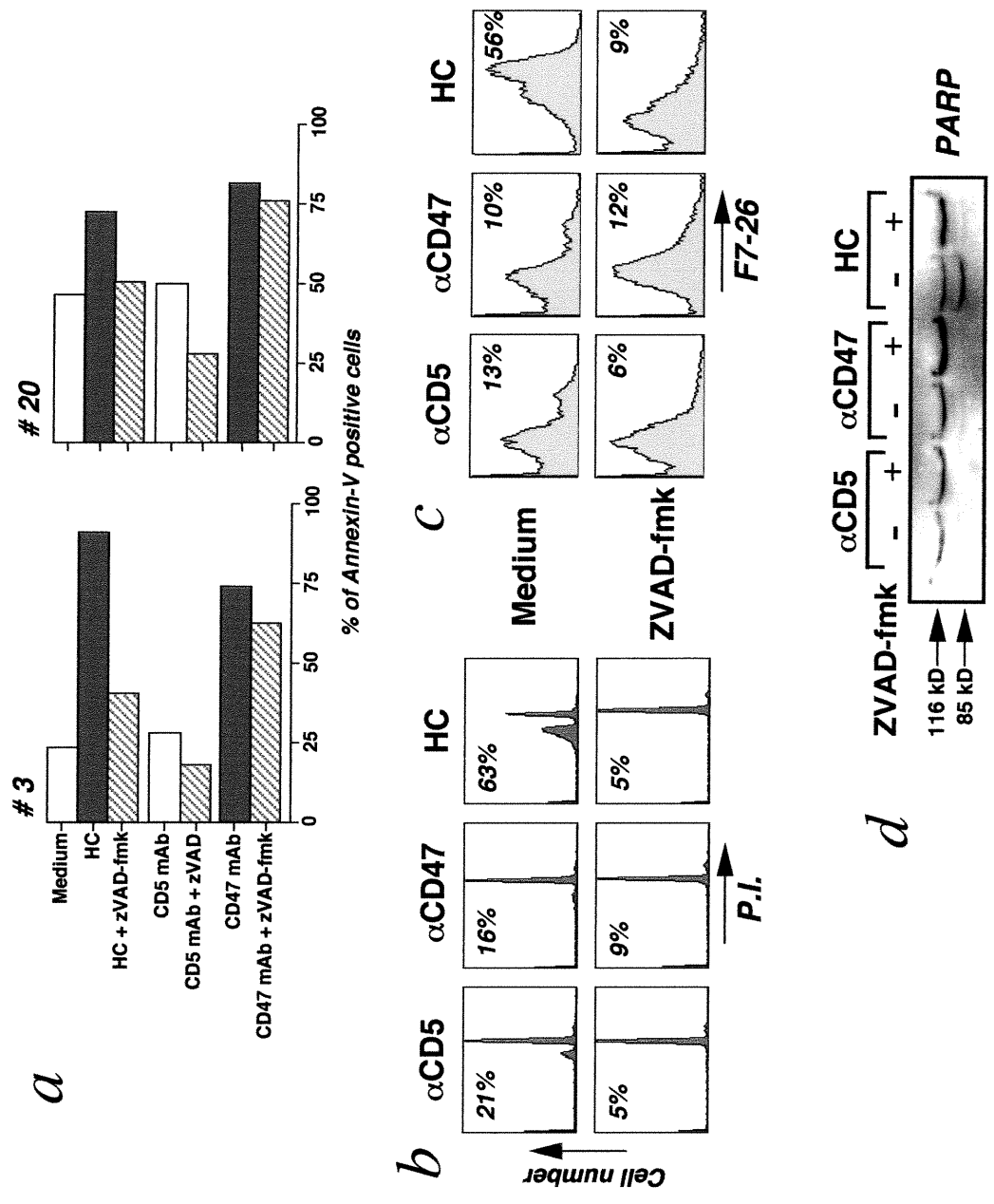


Fig. 5: CD47 ligation induces caspase-independent cell death. B-CLL cells were analyzed after 6 h of culture on immobilised monoclonal antibody against CD5 or CD47, or with 0.5mM of hydrocortisone (HC) in the presence or absence of caspase inhibitor z-VAD fmk (200 μM). **a)** Cells were stained with Annexin-V/propidium iodide and analysed by flow cytometry. Data represent two experiments of twelve. **b)** Cells were fixed and permeabilized, stained with propidium iodide and analyzed for DNA content %, of sub-G1 DNA-positive cells. **c)** Cells were fixed, heated and stained with monoclonal antibody F7-26 and analyzed for single-stranded DNA content. %, F7-26-positive cells. **d)** Cell lysates were assessed by western blot analysis to detect PARP cleavage. *b-d*, Data represent one experiment of 5.

Fig. 6: Morphology B-CLL cells treated with monoclonal antibody against CD47.

B-CLL cells were plated on in the absence (*a, e, i*) or presence (*b, f, j*) of soluble monoclonal antibody against CD47. Chambers were pre-coated with monoclonal antibody against CD5 (*c, g, k*) or monoclonal antibody against CD47 (*d, h, l*). After overnight culture, cells were visualised by light microscopy (*a-d*); or were directly stained with FITC-labelled Annexin-V on slides and fixed (*e-h*); or fixed on slides and stained with DAPI (*i-l*), and viewed by fluorescent microscopy.

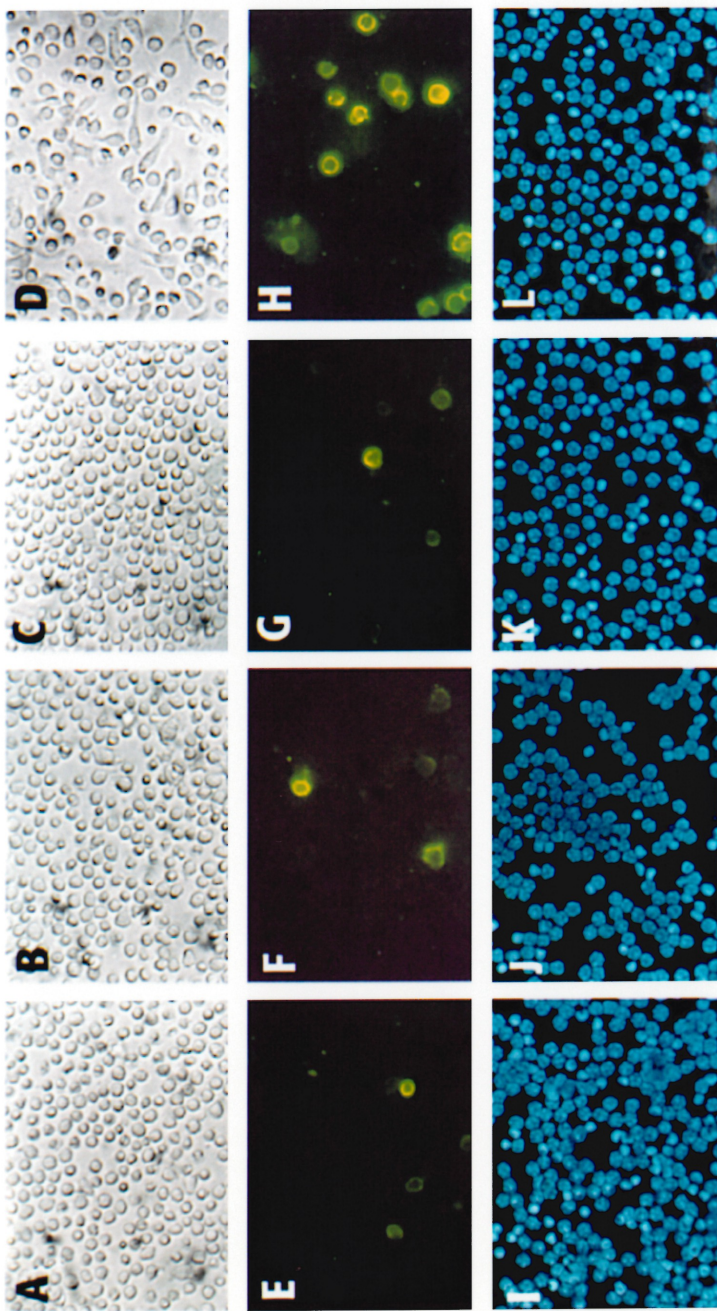
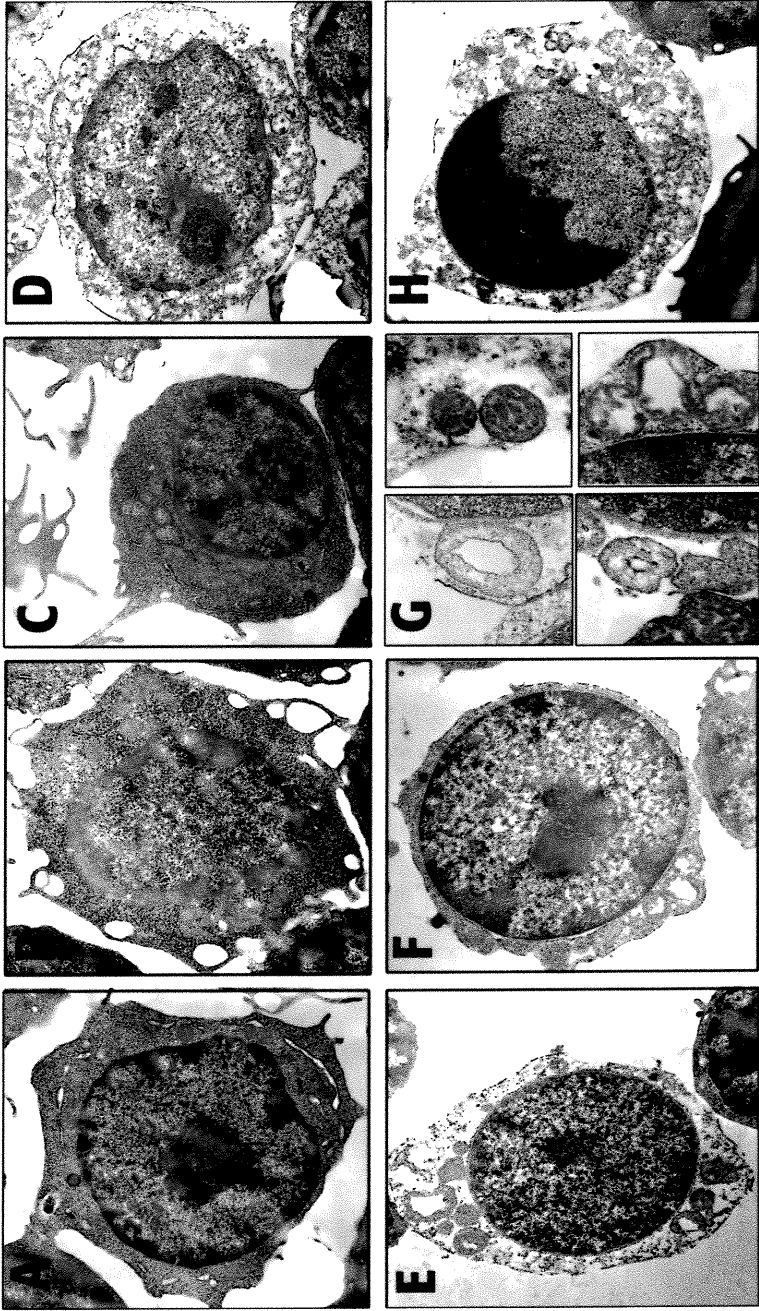


Fig. 7: Electron micrographs of B-CLL cells.

a, Untreated cells. **b** and **c**, Cells cultures for 16 h with soluble monoclonal antibody against CD47 (**b**) or immobilized monoclonal antibody against CD5 (**c**). **d**, Cells Heated at 56 °C for 1 h. **e-g**, Cells cultured for 16 h with immobilized monoclonal antibody against CD47. **h**, Cells treated for 16 h with 0.5 mM hydrocortisone. After fixation, cells were viewed by transmission electron microscopy.



MATERIALS AND METHODS

Patients

Forty-two B-CLL patients, with a median age of 65 [range from 50 to 86] years were included in this study. Diagnosis was based on clinical examination and peripheral blood count. CLL was defined as $> 5000/\mu\text{l}$ lymphocytes expressing CD5, CD20 and CD23. Twenty-two patients were Binet stage A, nine were stage B and eleven were stage C. Twenty-seven patients were untreated and fifteen received conventional therapy.

Reagents

The antibodies and other reagents used in this study were purchased from manufacturers as indicated below. Monoclonal antibody against CD47 (clones B6H12 and BRIC126): Bioscience (Camarillo, California) and Serotec (Raleigh, North Carolina), respectively. Monoclonal antibody against CD5 and $\beta 3$ (AP3): American Type Culture Collection (Rockville, Maryland). Monoclonal antibody against $\alpha\beta 3$ and polyclonal antibody against caspase-8: Upstate Biotechnology (Lake Placid, New York). Monoclonal antibody against PARP, and TGF β and polyclonal antibody against caspase-9: Pharmingen (San Diego, California). Monoclonal antibody against Bcl-2: ID Labs (London, Ontario). Monoclonal antibody against caspase-7: Transduction Laboratories (Lexington, Kentucky). Soluble trimeric CD40L (sCD40L), Monoclonal antibody against Fas and FasL and recombinant IL-4: Immunex (Seattle, Washington). Recombinant IFN γ : Genzyme (Cambridge, Massachusetts). Caspase inhibitors z-VAD-fmk: KAMIYA Biochemical Company (Seattle, Washington). DEVD-fmk: Biomol (Plymouth Meeting, Pennsylvania). Hydrocortisone: Sigma. Thrombospondin: Calbiochem (La Jolla, California). 4N1K (KRFYVMMWKK) and 4NGG (KRFYGGMMWWKK) peptides: Genosys Biotechnologies²⁴ (The Woodlands, Texas). Monoclonal antibody against CD23 (clone 135) was prepared in our laboratory. Polyclonal antibody against caspase-3 was provided by Dr. Sekaly.

Cell preparation and culture conditions

B-cells from CLL patients were isolated by density gradient centrifugation of heparinized blood followed by one cycle of 'rosetting' with sheep red blood cells treated with S-(2-aminoethyl)isothiourium bromide (Aldrich) to deplete T cells. B-cell purity was shown to be greater than 98% by flow cytometry (FACSsort, Becton Dickinson). Highly purified B-CLL cells were cultured at $4 \cdot 10^6$ /ml in 100 μ l of HB101 serum free synthetic medium (Irvine Scientific) in flat-bottomed 96-well plates (Nunc, Copenhagen, Denmark) in the presence of soluble or immobilised monoclonal antibodies. Plates were pre-coated overnight at 4 °C with 10 μ g/ml monoclonal antibody against CD47 or control monoclonal antibody, or with 20 μ g/ml TSP or fibronectin in 100 μ l 0.01M NaHCO₃ pH 9, then washed and blocked with HB101 medium. Where indicated, cells were cultured in wells pre-coated with 10 μ g/ml goat antibodies against mouse (Biosource, Camarillo, California) in the presence of 10 μ g/ml soluble monoclonal antibody CD47 or control monoclonal antibody. For 4N1K and 4NGG assays, 250 μ g/ml peptides were coated on Immulon-2 plates (Dyna, Skøyen, Oslo, Norway) as described²⁸. Antibodies against CD23, α v/ β 3 and α v/ β 5 were coated at a concentration of 10 μ g/ml.

Flow cytometry analysis

CD5, CD23 and CD47 expression was assessed using two-step procedure. B-CLL cells were incubated for 1 h at 4 °C with biotinylated specific or isotype-matched control monoclonal antibodies, washed, stained for 1h at 4 °C with phycoerythrin (PE)-streptavidin (ID-Labs, London, Ontario, Canada) and analysed by flow cytometry (FACSsort; Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey). For Bcl-2 intracytoplasmic staining, cells were fixed and permeabilized before staining (1% formaldehyde and 0.1% saponin).

Assay for apoptosis

Phosphatidylserine exposure, decrease in $\Delta\Psi_m$, cellular DNA content and single-stranded DNA detection were performed by flow cytometry analysis using a FACSort (Lysys II Software; Becton Dickinson). For phosphatidylserine exposure, cells were double-stained with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-labelled Annexin-V (Bioscience) and propidium iodide [Sigma]¹⁴. For figure 6, cells were plated on Permax® chamber slides (Lab-Tek, Naperville: Illinois) and directly stained for 15 min with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-labelled Annexin-V, then fixed in binding buffer (10 mM HEPES, NaOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 3.7% formaldehyde) for 10 min and visualized. The decrease in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was assessed using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide [DiOC₆ (3)] (Molecular Probes, Eugene, Oregon)¹⁴. Nuclear morphology was analysed by DNA staining with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), and electron microscopy was done exactly as described⁹ using JEOL (Japanese electron optical light) 10-10 microscope. Cellular DNA content was detected by propidium iodide (PI) staining of cells fixed with 70% ethanol. Single-stranded DNA was detected using monoclonal antibody F7-26, according to the manufacturer's instructions (Apostain, Miami, Florida). PARP, caspase-3, -7 and -9 cleavage, caspase-8 and Bcl-2 expression were determined by Western blot analysis. Cells ($5 \cdot 10^5$) were directly lysed in hot sample buffer containing 10% of β -mercaptoethanol. Samples were then boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Bedford, Massachusetts). Membranes were probed with indicated antibodies, and immunoreactive products were revealed using ECL (Amersham).

Statistical analysis : Paired Student's t test.

REFERENCES

1. Cheson, B.D. et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. **87**, 4990-4997 (1996).
2. Sarfati, M. et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **88**, 4259-4264 (1996).
3. Dighiero, G. et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. **338**, 1506-1514 (1998).
4. Keating, M.J. et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. **92**, 1165-1171 (1998).
5. Dancescu, M., et al. Interleukin-4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J.Exp.Med.* **176**, 1319-1327 (1992).
6. Fournier, S., Yang, L.Y., Delespesse, G., Rubio, M., Biron, G. & Sarfati, M. The two CD23 isoforms display differential regulation in chronic lymphocytic leukaemia. *British J.Haematolo.* **89**, 373-379 (1995).
7. Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C. & Stryckmans, P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. **91**, 2387-2396 (1998).
8. Depraetere, V. & Golstein, P. Dismantling in cell death: Molecular mechanisms and relationship to caspase activation. *Scand.J.Immunol.* **47**, 523-531 (1998).
9. Yang, E. & Korsmeyer, S.J. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*. **88**, 386-401 (1996).
10. Thornberry, N.A. & Lazebnik. Caspases: Enemies within. *Science*. **281**, 1312-1316 (1998).
11. Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y. & Nagata, S. Caspase-independent cell killing by fas-associated protein with death domain. *J.Cell Biol.* **143**, 1353-1360 (1998).
12. De Maria, R. et al. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science*. **277**, 1652-1655 (1997).
13. Lavoie, J.N., Nguyen, M., Marcellus, R.C., Branton, P.E. & Shore, G.C. E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk. *J.Cell Biol.* **140**, 637-645 (1998).
14. Lesage, S. et al. CD4⁺ CD8⁺ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J.Immunol.* **159**, 4762-4771 (1997).
15. Déas, D. et al. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J.Immunol.* **161**, 3375-3383 (1998).
16. Quignon, F. et al. PML induces a novel caspase-independent death process. *Nature Genetics*. **20**, 259-265 (1998).
17. Monney, L. et al. Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J.Biol.Chem.* **273**, 6121-6131 (1998).
18. Xiang, J., Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. Bax-induced cell death may not require interleukin-1 β -converting enzyme-like proteases. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **93**, 14559-14563 (1996).
19. Platt, N., da Silva, R.P. & Gordon, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends in Cell Biol.* **8**, 365-372 (1998).

20. Savill, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Brit.Med.Bull.* **53**, 491-508 [1997].
21. Savill, J., Hogg, N., Ren, Y. & Hasslet, C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J.Clin.Invest.* **90**, 1513-1522 [1992].
22. Lindberg, F.P., Gresham, H.D., Schwarz, E. & Brown, E.J. Molecular cloning of integrin-associated protein: An immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -dependent ligand binding. *J.Cell Biol.* **123**, 485-496 [1993].
23. Zhou, M.-J. & Brown, E.J. Leukocyte response integrin and integrin associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J.Exp.Med.* **178**, 1165-1174 [1993].
24. Gao, A. et al. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **271**, 21-24 [1996].
25. Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Kersh, G.J., Allen, P.M. & Brown, E.J. Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein [CD47] is an adhesion-dependent CD28-independent signaling pathway. *J.Exp.Med.* **185**, 1-11 [1997].
26. Fournier, S., Delespesse, G., Rubio, M., Biron, G. & Sarfati, M. CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J.Clin.Invest.* **89**, 1312-1321 [1992].
27. Shan, D., Ledbetter, J.A. & Press, O.W. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood.* **91**, 1644-1652 [1998].
28. Ghetie, M-A., et al. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **94**, 7509-7514 [1997].
29. Truman, J-P. et al. HLA class II-mediated death is induced via Fas/Fas ligand interactions in human splenic B lymphocytes. *Blood.* **89**, 1996-2007 [1997].
30. Chaouchi, N., Vazquez, A., Galanaud, P. & Leprince, C. B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J.Immunol.* **154**, 3096-3104 [1995].
31. Kitada, S. et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: Correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood.* **91**, 3379-3389 [1998].
32. McConkey, D.J. et al. Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of Bcl-2 and Bax. *J.Immunol.* **156**, 2624-2630 [1996].
33. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmayer, E. & Reed, J.C. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **82**, 1820-1828 [1993].
34. Thomas, A., et al. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: Relationship of p53 gene mutation, Bcl-2/Bax proteins in drug resistance. *Oncogene.* **12**, 1055-1062 [1996].
35. Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Jabbar, S. & Hoffbrand, V. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the Bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br.J.Haematol.* **85**, 439-445 [1993].
36. Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L. & Hoffbrand, A.V. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Brit.J.Haematol.* **92**, 97-103 [1996].
37. Romano, M.F. et al. Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* **92**, 990-995, [1998].

38. Wang, D., Freeman, G.J., Levine, H., Ritz, J. & Robertson, M.J. Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Brit.J.Haematol.* **97**, 409-417 (1997).
39. Tinhofer, I. et al. Differential sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand⁺ tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **91**, 4273-4281 (1998).
40. Douglas, R.S., Capocasale, R.J., Lamb, R.J., Nowell, P.C. & Moore, J.S. Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor- β . *Blood.* **89**, 941-947 (1997).
41. Chandra, J. et al. Protease activation is required for glucocorticoid-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood.* **90**, 3673-3681 (1997).
42. Robertson, L.E. et al. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood.* **81**, 143-150 (1993).
43. Consoli, U. et al. Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **91**, 1742-1748 (1998).
44. Bellosillo, B. et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* **92**, 1406-1414 (1998).
45. Byrd, J.C. et al. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of Bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood.* **92**, 3804-3816 (1998).
46. Bellosillo, B., Dalmau, M., Colomer, D. & Gil, J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* **89**, 3378-3384 (1997).
47. Susin, S.A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* **397**, 441-446 (1999).
48. Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A. & Kroemer, G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene.* **16**, 2265-2282 (1998).
49. Mower, Jr., D.A. et al. Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J.Immunol.* **152**, 4832-4842 (1994).
50. Zhuang, J. et al. Dissociation of phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis from other features of the apoptotic program. *J.Biol.Chem.* **273**, 15628-15632 (1998).
51. Albert, M.L. et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via α v β 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* **188**, 1359-1368 (1998).
52. Savill, J. Phagocytic docking without shocking. *Nature.* **392**, 442-443 (1998).
53. Guo, K. et al. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biology of Reproduction.* **58**, 739-746 (1998).
54. Cantwell, M.J., Sharma, S., Friedmann, T. & Kipps, T.J. Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* **88**, 4676-4683 (1996).
55. Fuente, Mt., Casanova, B., Garcia, G.M., Silva, A. & Garcia, P.A. Fibronectin interaction with α 4 β 1 integrin prevents apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia.* **13**, 266-274 (1999).

2. Article II

Le travail présenté dans cet article fait directement suite au précédent et le complète. Afin de documenter plus avant les effets de CD47 dans une éventuelle utilisation thérapeutique, nous avons étendu notre étude aux cellules normales du sang. Nous montrons que les cellules souches hématopoïétiques, nécessaires au renouvellement du pool lymphocytaire et myéloïde, et que les cellules dendritiques immatures, principales cellules chargées de la phagocytose des cellules en apoptose et initiateur de la réponse immunitaire, sont résistantes à la mort induite par l'engagement de CD47. Les lymphocytes B et T normaux sont tués par CD47, mais les B de LLC restent les cellules les plus sensibles. Enfin, la phagocytose des B de LLC tués par l'hydrocortisone ou par CD47 est comparable, indiquant que les événements déclenchés lors de cette mort particulière suffisent à entraîner le processus d'élimination par des cellules dendritiques immatures.

Nous avons ensuite entrepris une étude structure/fonction de CD47 qui nous a permis de déterminer que les domaines extracellulaire et transmembranaire de CD47 sont nécessaires et suffisant à signaler la mort. L'exposition des phosphatidylsérines et la diminution du volume cellulaire observées dépendent en partie de l'établissement d'un efflux potassique et sont totalement inhibées par l'antimycine A, une toxine qui bloque la chaîne respiratoire. Enfin, la mort induite par CD47 nécessite un cytosquelette fonctionnel puisqu'elle est totalement inhibée par la cytochalasine D, un agent qui empêche la polymérisation de l'actine, et qu'elle n'a plus lieu dans des PBMC issues de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich qui présentent des dysfonctionnements majeurs du cytosquelette.

Ma contribution représente 85 % du travail expérimental.

**MECHANISMS OF CD47-INDUCED CASPASE-INDEPENDENT CELL DEATH IN
NORMAL AND LEUKEMIC CELLS: LINK BETWEEN PS EXPOSURE AND
CYTOSKELETON ORGANIZATION.**

**Véronique Mateo, Eric J. Brown, Guy Biron, Manuel Rubio, Alain Fischer,
Françoise Le Deist and Marika Sarfati.**

Submitted for publication

ABSTRACT

Dying cells, apoptotic or necrotic, are swiftly eliminated by professional phagocytes. We previously reported that CD47 engagement by CD47 mAb or thrombospondin induced caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemic B cells (B-CLL). Here we show that human immature dendritic cells (DCs) phagocytosed the CD47 mAb-killed leukemic cells in the absence of caspase 3, 7, 8 and 9 activation in the malignant lymphocytes. Yet, the dead cells displayed the cytoplasmic features of apoptosis including cell shrinkage, phosphatidylserine exposure and decreased mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). CD47 mAb-induced cell death also occurred in normal resting and activated lymphocytes, with B-CLL cells demonstrating the highest susceptibility. Importantly, immature DCs and CD34+ progenitors cells were quite resistant. Structure-function studies in cell lines transfected with various CD47 chimera demonstrated that killing exclusively required the extracellular and transmembrane domains of the CD47 molecule. Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization and antimycin A, an inhibitor of mitochondrial electron transfer, completely suppressed CD47-induced PS exposure. Interestingly, CD47 ligation failed to induce cell death in PBMC isolated from Wiskott-Aldrich syndrome patients suggesting the involvement of Cdc42/WASP signaling pathway. We propose that CD47-induced caspase-independent cell death is mediated by cytoskeletal reorganization. This form of cell death may be relevant to maintenance of homeostasis and as such might be explored for the development of future therapeutic approaches in lymphoid malignancies.

INTRODUCTION

Apoptosis is a non-inflammatory self-destruction process, which is essential to the regulation of immune system and homeostasis^{1,2}. It provides molecular basis for T and B cell development³, induction of immune tolerance and termination of normal immune response⁴. By contrast, necrosis is perceived by the immune system as a danger signal that triggers inflammatory response and acquired immunity. Classically, the activation and function of a set of proteinases, the caspases, is the key event in apoptosis, with mitochondria playing a central role^{5,6}. A critical event, beside the execution phase of apoptosis, is the engulfment of dying cells by professional APC before the dead cells discharge their toxic materials in the surrounding milieu⁷.

In the past recent years, cell death other than necrosis reportedly occurred in the absence of caspase activation in hematopoietic cells; it included glucocorticoid-induced death of thymocytes, Bax-mediated cell death and death of cell lines induced by growth factor withdrawal⁸⁻¹⁰. A growing number of surface Ags were involved in the induction of this non-classical caspase-independent cell death. Engagement of CD2, CD45, CD47, CD99 and MHC class I and II activated this death process¹¹⁻¹⁷. Caspase-independent cell death induced by CD47 ligation in B chronic lymphocytic leukemic (B-CLL) cells was characterized by cell shrinkage, exposure of phosphatidylserine (PS), mitochondrial matrix swelling in complete absence of nuclear degradation¹⁸.

CD47 antigen is ubiquitously expressed on hematopoietic and non hematopoietic cells¹⁸. It serves as a receptor for thrombospondin (TSP) and as a ligand for transmembrane signal regulatory protein (SIRP- α), mainly expressed on myeloid and neuronal cells^{19,20}. Through its association with integrins of β 1, β 2 and β 3 families, it initiated heterotrimeric G protein signaling and thus modulated cell motility, leukocyte adhesion and migration, phagocytosis and platelet activation²¹. On immune

cells, CD47 ligation by soluble mAb inhibited cytokine production by APC and IL-12 responsiveness by neonatal and adult T cells^{22,25}. When immobilized, CD47 mAb costimulated TCR-activated T cells^{26,27}. Thus, the biological consequences of CD47 activation seemingly vary according to : (i) the way the molecule is engaged (ii) the surface molecules it interacts with and, (iii) its conformation and membrane localization, which all depend on the cell type on which CD47 is expressed^{28,29}.

The molecular basis for caspase-independent cell death remains elusive. Apoptosis-inducing factor (AIF), released by mitochondria, induced caspase-independent nuclear degradation³⁰. In most of the studies, sole PS externalization in the presence of the broad caspase inhibitor Z-VAD fmK, was used to define caspase-independent cell death pathway. However, coexistence of caspase-dependent and independent pathways occurred in various systems including CD2, and CD95 ligation^{11,24,35}. For instance, in CD2-mediated apoptosis of T lymphocytes, the mitochondrial release of AIF preceded the dissipation of transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), the release of cytochrome C (Cyt c) and the caspase-dependent execution phase of apoptosis³⁶.

Our present findings confirmed and extended to other cell populations our previous observations that CD47 ligation exclusively induced the cytoplasmic events of apoptosis in B-CLL cells. We show that dendritic cells recognized and eliminated these dead cells and present evidence that cytoskeleton rearrangement is a triggering event in $\Delta\Psi_m$ loss and PS exposure after CD47 ligation on human cells.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Diagnosis of B-CLL patients included in this study was based on clinical examination and peripheral blood count. CLL was defined as $> 5000/\text{ml}$ lymphocytes expressing CD5, CD20 and CD23. All patients with WAS exhibited a severe clinical phenotype. Patient "1" contains a A insertion at position 147 in exon 2. Patient "2" and "3" contains a C to T missense mutation at nucleotide 631 in exon 7 and 155 in exon 1, respectively.

Cell-lines and transfectants

RAJ1 is a Burkitt lymphoma, RPMI 8226 and RPMI 8866 are B lymphocytic cell line, Jurkat a T cell hybridoma, KU812 is a granulocytic cell-line, U937 and THP-1 are monocytic cell-lines, K-562 a chronic myelogenous leukemia cell, OV10 is an ovarian carcinoma transfected with CD47 cDNA⁹⁷ and JimB8 a CD47-negative Jurkat cell-line⁹⁸. The different cDNAs and constructs used in this study were previously described⁹⁸. Transfected Jurkat, JimB8 and U937 cells were sorted for high transgene expression on a FACSort (Lysys II Software, Becton Dickinson).

Reagents

Recombinant human IL-4, soluble CD40 ligand, and GM-CSF were kindly provided by Immunex Corporation (Seattle, WA) and Dr. D. Bron (Institut Bordet, Brussels, Belgium) respectively. Dr. R-P Sekaly (U of Montreal) kindly provided polyclonal anti-caspase-3. Anti-human CD3 (UCH-T1) was provided by P.Beverley, University College and Middlesex School of Medicine, London, UK. Isotype-matched negative control mAb (mouse IgG1) was prepared in our laboratory.

The other antibodies and reagents used in this study were purchased from manufacturers as indicated below. Anti-CD47 mAbs (clone B6H12): Bioscience

[Camarillo, California]. Polyclonal anti-caspase-8: Upstate Biotechnology [Lake Placid, New York]. Polyclonal antibody against caspase-9 and anti-mouse CD8- α (clone 53-6.7): Pharmingen [San Diego, California]. Anti-caspase-7 mAb: Transduction Laboratories [Lexington, Kentucky].

Cell preparation and culture conditions

B-cells were isolated from Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) patients or from tonsils by density gradient centrifugation of heparinized blood or cell-suspension respectively, using Lymphoprep [Nycomed, Oslo, Norway] followed by one cycle of rosetting with S-(2 aminoethyl) isothiuronium bromide [Aldrich, Milwaukee]-treated sheep red blood cells to deplete T cells. B cell purity was shown to be > 98% by flow cytometry [FACSsort, Becton Dickinson]. Highly purified T cells were obtained from monocyte-depleted PBMC from healthy volunteers by rosetting with AET-treated SRBC, followed by treatment of rosette-forming cells with Lympho-Kwik T [One Lambda, Los Angeles, CA] following manufacturer's recommendations. Cell purity was assessed by flow cytometry using PE-conjugated anti-CD3, anti-CD4 or anti-CD8 mAbs [Ancell] and was shown to be > 98%. Stem cells were obtained from heparinized cord-blood using the "DynaL CD34 progenitor cell selection system" according to the manufacturer's instructions [DynaL Skøyen, Oslo, Norway]. Human monocyte-derived immature dendritic cells were prepared exactly as described²⁸.

Highly purified lymphocytes were cultured at $4 \cdot 10^6$ /ml, iDC, cell-lines and transfectants at $2 \cdot 10^6$ /ml in 100 μ l of HB101 serum free synthetic medium [Irvine Scientific] or in special medium when indicated, on flat-bottomed 96-well plates [Nunc] in the presence of soluble or immobilized mAbs. Plates were pre-coated with anti-CD47 or anti-CD8- α mAbs at 10 μ g/ml, in 100 μ l 0.01M NaHCO₃ pH 9 overnight at 4 °C, then washed and blocked with medium. The following inhibitors were added 15 min before plating cells when indicated. Only Cytochalasin-D treated

cells were washed before plating. antimycine A (30 μ M) (Sigma). Pertussis Toxin (25-100 ng/ml), Cytochalasin-D (20 μ M) and Rottlerine (5-20 μ M) (Calbiochem). Cyclosporine A (5 μ M), Aristolochic acid (50 μ M) and Bongkreic acid (50 μ M) (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA).

For potassium efflux experiments, cells were cultured in 1% FCS Na^+K^+ -free RPMI medium, supplemented with normal or inverted $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio as described³⁸

Phagocytosis assay

Freshly purified B-CLL cells were stained with PKH26 red fluorescent cell linker (Sigma) according to the manufacturer's instructions before induction of apoptosis by culture for 16 h on immobilized CD47 mAb, hydrocortisone (5×10^{-4} M), or soluble CD47 mAb as negative control. Cells were washed and given to iDCs (2×10^5 /ml) as a phagocytic meal (10 apoptotic cells per one iDC) for 3 h at 37°C. Endocytosis of PKH26-stained B cells was determined by FACS after gating on live iDCs.

Flow cytometry analysis

CD47 and constructs expression was assessed using two-step procedure. Briefly, cells were incubated for 1 h at 4 °C with biotinylated CD47 mAb (B6H12) or unconjugated anti-CD8- α (53-6.7) or isotype-matched ctrl mAbs (5 μ g/ml). After washing, cells were incubated with PE-labeled streptavidin or FITC-conjugated anti-rat mAb (Ancell, London, ON, Canada) and analyzed by flow cytometry (FACSort, Becton Dickinson).

Assay for apoptosis

Detection of PS exposure and decrease in $\Delta\Psi_m$ were performed by flow cytometry using a FACSort (Lysys II Software, Becton Dickinson). *PS exposure*: cells were double-stained with FITC-labeled Annexin-V (R&D system) and propidium iodide (PI) at

2 $\mu\text{g/ml}$ [Sigma]. Decrease of $\Delta\Psi\text{m}$ was assessed using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6 (3)), [Molecular Probes]. Caspase-3, -7 and -9 cleavage and caspase-8 expression were analyzed by Western blotting. Briefly, $5 \cdot 10^6$ cells were directly lysed in hot sample buffer containing 10% of β -mercaptoethanol. Samples were then boiled for 5 min, electrophorezed on 10% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes [Millipore]. Membranes were probed with indicated antibodies, and immunoreactive products were revealed using ECL [Amersham]. CD47-induced cell death was calculated as follow :

$$\frac{[\% \text{ of live-cells in control}] - [\% \text{ of live-cells on CD47 mAb}]}{[\% \text{ of live cells in control}]} \times 100$$

Statistical analysis

The paired Student t'-test was used for statistical Analysis. *, $p < 0.05$.

RESULTS

1. Engulfing by professional phagocytes of CD47 mAb-treated B-CLL cells dying in the absence of caspase activation.

We previously reported that CD47 ligation by immobilized anti-CD47 monoclonal antibodies (CD47 mAb) or its natural ligand, TSP¹⁹ induced caspase-independent cell death in B-CLL cells. This cell death was characterized by the cytoplasmic features of apoptosis. They include cell shrinking, exposure of phosphatidylserine (PS) to the outer leaflet membrane and as shown in Fig.1 A, a drop in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) demonstrated by decreased 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6) staining. This cell death was considered to be caspase-independent since the nucleus of the leukemic dead cells remained intact and PS exposure was not prevented by the presence of the broad caspase inhibitor z-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluoromethylketone [z-VAD-fmk]²⁰. To formally demonstrate that the caspase remained inactive during this process, we performed Western blot analysis (Fig.1 B) to look for the cleavage-products of caspases in CD47 mAb-killed leukemic cells. We failed to detect any cleavage products of caspases-3, 7 and 9 and similar amounts of procaspase-8 were found in immobilized CD47 mAb and control mAb-treated B-CLL cells. Note that B-CLL cells with low level of spontaneous apoptosis were selected for these experiments.

Both caspase activation and PS exposure have been generally considered as prerequisites for recognition and phagocytosis of cells dying by apoptosis^{39,40}. It was therefore important to determine whether CD47 mAb-killed B-CLL cells could signal their death to phagocytes and be eliminated. To test this hypothesis, we performed the following phagocytosis assay using human monocyte-derived immature dendritic cells as professional phagocytes⁴¹. B-CLL cells were stained by PKH26, a non-toxic red fluorescent cell-linker, and exposed for 6 h to immobilized CD47 mAb or hydrocortisone (HC), a drug which induced classical caspase-dependent apoptosis in

the leukemic cells⁴². Soluble CD47 mAb did not induce cell death¹³ nor Fc-mediated phagocytosis²³ and was used as negative control. Treated samples were co-cultured with immature DCs for 3 h. Phagocytosis was assessed by flow cytometry analysis by quantifying FL-2 fluorescence after gating on immature DCs (by size side scatter). Results indicated that B-CLL killed by immobilized CD47 mAb were phagocytosed as efficiently as HC-treated cells (39% vs. 46% FL2 positive cells) (Fig.1 C). Note that each cell preparation was stained separately with FITC-labeled Annexin-V to evaluate their percentage of Annexin-V-positive cells (39%, 75% and 83% for soluble, immobilized CD47 mAb and HC, respectively).

Taken together, these results indicate that the caspase-independent death-signal delivered by CD47 ligation to B-CLL cells is at least sufficient to allow their elimination by immature DCs.

2. Blood-cells susceptibility to CD47-induced cell death.

Since CD47 Ag is ubiquitously expressed on hematopoietic cells, we assessed the *in vitro* sensitivity of normal blood cells to CD47-induced cell death. In the perspective of a potential therapeutic use of this mAb, we first examined CD34-positive cells as they represent the pool of hematopoietic progenitors^{43,44}. As depicted in Fig.2 A, stem cells remained totally insensitive to CD47 mAb-induced killing (0% of cell-death induction, n=6), despite their high level of CD47 expression. Immature DCs are major players in the clearance of apoptotic cells and may participate to anti-tumor immune response^{41,45}. Similarly to stem cells, they were resistant to CD47-induced cell-death (0%, n=4) (Fig.2 A).

We next observed a differential induction of cell death in normal resting and activated B and T-lymphocytes. The percentage of CD47-induced cell death in normal resting B and T-cells was 36% (n=7) and 49% (n=14), respectively (Fig.2 B). Yet, B-CLL cells displayed the highest susceptibility (64% [n=10]). Unexpectedly, anti-

CD3-stimulated T-lymphocytes became almost insensitive to CD47 mAb-killing, whereas T-cell dependent activation of B-lymphocytes (sCD40L + IL-4) significantly increased the level of death induction. Activation did not modulate CD47 expression as detected by CD47 mAb [clone B6H12] (data not shown).

Human cell-lines represent the malignant counterpart of lymphoid and myeloid cells at different stage of maturation. In this context, we examined four lymphoid cell-lines, (RAJI, RPMI-8226, -8866 and Jurkat), three myeloid cell-lines (U937, THP-1 and K-562), a granulocytic cell-line (KU812) as well as the ovarian carcinoma cell line, OV10⁹⁷, transfected with CD47 cDNA. As shown in Fig. 3, the cell lines displayed a differential sensitivity to CD47 mAb, with no correlation, as in non-transformed cells, with the level of CD47 expression. Moreover, the level of CD47-induced cell death induction did not discriminate between specific cell lineage, RAJI and THP-1 and K562 being quite resistant. Of interest, OV10 CD47 transfectants were efficiently killed by CD47 mAb (44% of death induction, n=5) indicating the CD47 transgene was sufficient to confer cell death susceptibility in a cell which did not primarily express the CD47 molecule.

From this data, we conclude that normal as well as transformed cells display differential susceptibility to CD47-induced cell death. Stem cells and immature DCs are resistant while cell activation differentially modulates the intensity of the response, regardless of the level of CD47 expression.

3. CD47 extracellular and multiply membrane spanning (MMS) domains are necessary to signal cell-death.

As indicated above, Jurkat and U937 cell lines were sensitive to CD47-induced cell-death. These cell lines were therefore suitable to perform structure-function studies to determine which portion(s) of the CD47 molecule was dispensable to mediate the cell-death signaling. CD47 molecule is made of an extracellular immunoglobulin-like

domain (IgV), a five membrane spanning domain (MMS for multiply membrane spanning), and a cytoplasmic tail displaying four alternatively spliced isoforms (form 1 to 4 in order of increasing length)^{18,46}. Form 2 of CD47 is the predominant isoform present in the hematopoietic lineage, while the nearly tail-less form 1 (only three amino acids) is expressed in keratinocytes and endothelial cells.

We first examined whether the cytoplasmic tail of CD47 was required. We used JimB8 cells, a CD47-negative Jurkat cell line⁴⁷, transfected with either of the two native splice forms (hIAP-form 1 and 2) or a chimera, CD8C2, made of the extracellular membrane domain of mouse CD8_ fused to the cytoplasmic tail of CD47 form 2. Some experiments were performed on U937 cell line transfected with CD8C2 cDNA. Since we observed that Jurkat sensitivity to CD47-induced cell death was greatly augmented by pretreatment with PMA for 24 h, we used PMA-activated cells in the following experiments. The results in Fig 4B indicated that the cytoplasmic tail of CD47 was merely not required to signal cell-death. First, engagement of hIAP-form 1 and 2 molecules, equally expressed on JimB8, by immobilized CD47 mAb induced similar level of cell-death (29% vs. 21% death induction). Secondly, as predicted from these data, ligation of the chimera CD8C2 by CD8 mAb did not mediate cell-death, either in JimB8, U937 or Jurkat (Fig.4 B and data not shown). Of interest, PMA-activated Jurkat-CD8C2 cells did spread when endogenous CD47 or CD8C2 chimera was engaged by immobilized CD47 or anti-CD8 mAb respectively (Fig.4 C), indicating that the failure to induce cell-death was not due to inappropriate chimera ligation.

Previous studies on CD47 molecule have demonstrated that IgV and MMS domains are generally necessary for CD47 signaling^{26,27,47,48}. We therefore explored the requirement of the IgV or the MMS domains in CD47 induced-cell-death. To this end, we used two constructs: IAP/CD7, made of the CD47 IgV domain fused to the membrane and cytoplasmic domains of human CD7 and CD8MC2, made of the

extracellular domain of mouse CD8_L fused to the MMS and cytoplasmic tail of CD47 form 2 (Fig.4 A). The following data indicated that sole the CD47 IgV or MMS domain was not sufficient to mediate cell-death signaling. Engagement of CD8MC2 chimera by immobilized anti-CD8 on either U937 or PMA-activated Jurkat transfectants or ligation of IAP/CD7 chimera by CD47 mAb on Jimb8 transfectants did not trigger cell-death (0%, n=4 and 2%, n=6 respectively).

Taken all, we conclude that CD47 cell-death signaling requires both the IgV and MMS domains of the molecule and that the cytoplasmic tail is not required.

4. PS externalization in CD47-induced cell-death is down regulated by K⁺ efflux and antimycine A.

Cell shrinkage, PS externalization and drop in $\Delta\Psi_m$ are major hallmarks of apoptosis. Cell volume loss has been demonstrated to result in potassium (K⁺) and sodium (Na⁺) efflux³⁸⁻⁴⁹. Furthermore, K⁺ efflux and drop in $\Delta\Psi_m$ are tightly coupled^{50,51}. To examine whether CD47 induced cell-death was dependent on K⁺ efflux, we performed the cell culture in RPMI medium in which Na⁺/K⁺ concentrations have been inverted, resulting in K⁺ efflux impairment by osmotic forces³⁸. Under these conditions, CD47-induced PS externalization together with cell-shrinkage were delayed following CD47 ligation in B-CLL cells and U937 cell line when compared to that observed in cultures with medium reconstituted with normal Na⁺/K⁺ ratio (Fig.5 A and not shown). $\Delta\Psi_m$ was also slightly decreased [V.Mateo and M.Sarfati, personal observations]

PS exposure was classically reported to be dependent on caspase activation and PS externalization can be blocked by antimycin A, an inhibitor of the mitochondrial respiratory chain. As depicted in Fig 5B, antimycin A totally prevented PS exposure in CD47-treated cells while it had no effect on decreased $\Delta\Psi_m$ strongly suggesting that these two events may be uncoupled. Mechanisms involved in PS exposure are

rather complex and not entirely understood. For example, in some models of apoptosis long-term PS exposure has been shown to be the net result of increased scramblase [which has no selectivity for the direction of bilayer lipids movement] and decreased translocase activity [which selectively transports PS from the outer leaflet back to the inner leaflet] activity. PKC- δ reportedly activated scramblase in apoptotic cells⁵². We observed CD47-induced cell death in the presence of rottlerin, an inhibitor of PKC isoforms with a better selectivity for PKC- δ (Fig. 5C). These data largely exclude a role for PKC- δ without ruling out the involvement of other PKC isoforms. Indeed, immobilized CD47 mAb activated PKC- θ in T cells²⁷.

These results support the hypothesis that CD47-induced cell-death involves cell volume dysregulation, which is partly mediated by K⁺ efflux, and that PS exposure is intimately linked to cell shrinkage but may be uncoupled to decreased $\Delta\Psi_m$ and is independent of PKC- δ activation.

5. CD47-induced cell-death involves cytoskeletal rearrangement.

It was previously reported that T and B cell lines^{47,53} as well as B-CLL cells¹³ attached to and spread on CD47 mAb-coated surfaces suggesting that CD47 ligation induced a change in cytoskeleton organization. Moreover, immobilized CD47 mAb reportedly induced F-actin polymerization in activated T cells²⁷. To test this hypothesis, we examined the effect of cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, on CD47-induced cell death. Treatment with cytochalasin D prevented both PS exposure and $\Delta\Psi_m$ loss in CD47 mAb-treated U937 and B-CLL cells (Fig 6A). These data confirmed and extended a previous report showing that cytochalasin D inhibited CD47-induced caspase-independent cell death in normal TCR-activated T cells.

B cell lines motility on CD47 mAb-coated surfaces operated through Cdc42 pathway⁵³. Since Cdc42/WASP pathway is defective in patients suffering of Wiskott-

Aldrich syndrome (WAS), we examined the effect of CD47 ligation in PBMC isolated from WAS patients. We tested PBMC of three patients characterized with different point mutations, all leading to impaired WASP expression. As depicted in Fig 6B and D, we consistently failed to observe PS exposure and $\Delta\Psi_m$ loss following CD47 ligation in WAS PBMC, strongly suggesting without demonstrating a role for Cdc42/WASP signaling pathway in CD47-induced cell death.

Taken all, our data indicate that cytoskeleton rearrangement is a key event in the triggering of CD47-mediated PS externalization and $\Delta\Psi_m$ loss.

DISCUSSION

Our findings indicate that caspase-independent cell death induced by CD47 stimulation is sufficient to trigger a signal for phagocytosis in human dendritic cells. The CD47-induced cell death involves PS exposure, disruption of mitochondrial function and cytoskeleton rearrangement that might be linked to Cdc42/WASP signaling pathway. This observation challenges the concept that both caspase activation and PS exposure triggered by caspases are the prerequisites for phagocytosis. Exposure of PS is a critical event to allow engulfment of dead cells by phagocytic cells⁵⁴. A phosphatidylserine receptor was recently identified and cloned and anti-PS receptor mAb inhibited elimination of apoptotic⁵⁵ cells. However, blocking PS exposure without suppression of mitochondrial collapse and nuclear degradation also prevented phagocytosis⁵⁶. Cells dying by delayed necrosis upon exposure by staurosporine and z-VAD-fmk were also eliminated without exposure of their PS, underlying the potential role of other candidates for recognition and elimination of dead cells by APC⁵⁷.

Caspases play a central role in the execution of cell death; these enzymes are recruited and activated by either receptors of TNFR family or by apoptogenic molecules released from the intermembrane space of the mitochondria⁵⁸. Nevertheless, apart from CD47, stimulation of several surface antigens resulted in the activation of caspase-independent cell death in human cells. This includes CD2, MHC class I and class II^{11,16,17}. However, ligation of these antigens may induce either caspase-dependent or independent death according to the epitope triggered. So far, CD47 ligation by soluble, immobilized or cross-linked mAb recognizing at least three different epitopes exclusively induced caspase-independent cell death (Ref. 14, and data not shown).

During apoptosis, mitochondrial changes result in the dissipation of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). The loss of $\Delta\Psi_m$ is generally mediated by opening of the mitochondrial permeability transition pores (PT) and as a consequence, the release of apoptogenic molecules such as AIF and cyt. c^{50} with subsequent caspase-independent or dependent nuclear degradation. The engagement of CD47 results in cell shrinkage and $\Delta\Psi_m$ loss and this occurs in the absence of caspase activation and DNA degradation excluding without ruling out the involvement of AIF and cyt.c. Indeed, AIF release ultimately lead to caspase-independent DNA degradation⁶⁰ and cyt.c to caspase activation⁶¹. However, inactivation of cyt.c by at least HSP27 binding prevented apoptosome formation and caspase activation⁶². We therefore postulate that either cyt.c may be inactivated and translocation of AIF to the nucleus impaired or that there is no release of apoptogenic molecules during CD47 stimulation. Our unpublished observations indicated that inhibitors of PTPC opening failed to prevent CD47-induced cell death. They include cyclosporin A in combination with aristolochic acid (which act on cyclophilin D and PLA2 respectively), bongkreikic acid (inhibitor of ANT) and Ca^{++} chelators⁵⁹. In support to the latter hypothesis, BCR-mediated apoptosis of immature B cell line resulted in $\Delta\Psi_m$ loss but did not induce cyt.c release and caspase activation⁶³. Interestingly, cyt.c release may occur in the absence of $\Delta\Psi_m$ loss by direct effect of the proapoptotic molecule BID/BIK⁶⁴.

We also provide evidence that CD47-induced PS exposure may be dissociated from $\Delta\Psi_m$ loss but is intimately linked to cell shrinkage (Fig. 5). Cell volume decrease during apoptosis is an active mechanism which was shown to be dependent on K^+ channels [reviewed in ^{49,65}]. Maeno et al⁶⁶ observed apoptotic volume decrease in the presence of z-VAD-fmk, suggesting that K^+ efflux may be caspase-independent. Furthermore, it was demonstrated that this phenomenon may occur upstream of caspase activation. In the present study, mitochondrial inhibitors such as antimycin

A, inhibited CD47-induced PS exposure but not dissipation of $\Delta\Psi_m$. Similar observations were made by Zhuang et al., in ectoposide or TPCK-induced apoptosis of THP-1 monocyte cell line⁵⁶. Of interest, antimycin A alone induced $\Delta\Psi_m$ in B-CLL and U937 cell lines [Fig 5B]. In that regard, antimycin A mimicked BH3 cell-death domain and induced mitochondrial swelling and $\Delta\Psi_m$ loss⁵⁷. Taken together, these results strongly suggest that factors other than *cyt.c* released by the mitochondria and caspases may directly or indirectly affect PS exposure in CD47-induced cell death.

As described for CD47-mediated cell spreading in T cell lines, both extracellular and multispan transmembrane domains of CD47 molecule were required to induce killing. The short cytoplasmic domain was dispensable. In T cells, ~ 65% of the CD47 molecule is localized in membrane raft where it regulates TCR-dependent and independent T cell activation. Immobilized CD47 mAb reportedly controlled the activation of heterotrimeric G proteins, triggered F-actin polymerization, and protein kinase θ translocation. However, CD47 mAb-induced killing was observed in the presence of G proteins inhibitor (i.e., Pertussis toxin) [V. Mateo and M. Sarfati not shown] or new PKC family (δ , ϵ , η , θ and μ) inhibitor (i. e. rottlerin) (Fig. 5C). PKC θ expression was low in B cell lines largely excluding its involvement in CD47-induced cell death. However, PKC activation by PMA pretreatment of human cell lines enhanced CD47-mediated cell death [Fig 3].

Yoshida et al. previously reported that CD47 regulated human B cell mobility through Cdc42⁵⁸ and we observed that engagement of CD47 induced spreading in B-CLL cells. Cdc42 belongs to the small Rho GTPases family, which includes Rho and RAC, known to regulate formation of actin structures in many cell types⁵⁸. Among others, Cdc42 appears to have a unique role in actin remodeling during T cell activation and endocytosis of immature DC. WASP, uniquely expressed on hematopoietic cells⁵⁹, is the specific effector of Cdc42. WASP binds Cdc42 and

controls actin polymerization by distinct domains⁷⁰. WAS-immunodeficiency syndrome is characterized by abnormalities in cytoskeletal function resulting in abnormal chemotaxis, phagocytosis and T cell responses⁶⁹.

Two observations strongly suggest a direct role of cytoskeleton rearrangement in CD47-induced cell death : 1) inhibition of both PS exposure and $\Delta\Psi_m$ loss by cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization and 2) absence of CD47-induced death in PBMC of WAS patients. We propose that CD47 ligation induces killing by two non-mutually exclusive pathways. The initial and common event would be the triggering of actin polymerization, perhaps via Cdc42/WASP pathway. This will lead to either mitochondrial changes including matrix swelling and $\Delta\Psi_m$ loss, followed by PS exposure (pathway #1) and/or to a direct effect on PS externalization bypassing mitochondria (pathway #2).

When blood cells susceptibility was examined, immature DC, activated T cells and CD34+ precursors appeared to be much less sensitive and virtually resistant to CD47-induced killing. Similar differences in APC susceptibility has been reported in HLA-DR-induced caspase-independent cell death⁷¹. Pettersen *et al.* reported that CD47 mAb preferentially induces killing in normal activated but not resting T cells and this was inhibited by cytochalasin D. We failed to induce cell death in anti-CD3-activated T cells (Fig 2C). The use of different mAb in the two studies and the regulation of CD47 conformation during T cell activation (M. Sarfati and V. Mateo, unpublished data) may provide one explanation for this discrepancy.

The role of CD47-induced killing in the regulation of immune response remains poorly understood. One may envision that it at least participates to the maintenance of homeostasis. Indeed, apoptosis is a self-destruction process which, in contrast to necrosis, does not lead to inflammatory response and may be involved in the induction of tolerance. Thrombospondin, the natural ligand of CD47, established a

molecular bridge between apoptotic cells and the APC, facilitating phagocytosis of apoptotic cells⁷². We reported that TSP, like CD47 mAb, induced caspase-independent cell death via CD47 binding, but also acted on APC to down-regulate the production of the pro-inflammatory molecule IL-12 and prevent DC maturation²³. It is important to mention that additional mechanisms inhibited inflammation during phagocytosis of apoptotic cells. They include induction of TGF- β production by apoptotic cells themselves⁷³ and by APC upon their interaction with apoptotic cells⁷⁴. Also, TSP was found to be the main activator of TGF- β ⁷⁵.

CD47 was recently reported to be a marker of self in rodents which prevented clearance of intact red blood cells and lymphoid cells by CD47+ APC through the engagement of its counterstructure SIRP- α , selectively expressed on APC⁷⁵. Also, CD47/SIRP- α interactions negatively regulated APC functions²⁸. However, apoptotic cells highly expressing CD47⁷⁶, are known to be efficiently cleared by APC and this was not inhibited by CD47 mAb^{23,77}. Whether CD47 expressed on apoptotic cells has a particular conformation to not deliver a negative signal for phagocytosis to APC via SIRP- α and conversely whether SIRP- α /CD47 interactions can induce cell death remain open questions.

Taken together, we propose that TSP-induced/enhanced PS exposure via CD47 on lymphoid cells, followed by their elimination by professional phagocytes, represent a process that continuously takes place in peripheral tissues to ensure the maintenance of tissue and host homeostasis. Additionally, the anti-inflammatory activity of TSP combined with its ability to facilitate the clearance of apoptotic cells may further contribute to homeostasis and induction of tolerance by avoiding inappropriate immune response to self-antigens.

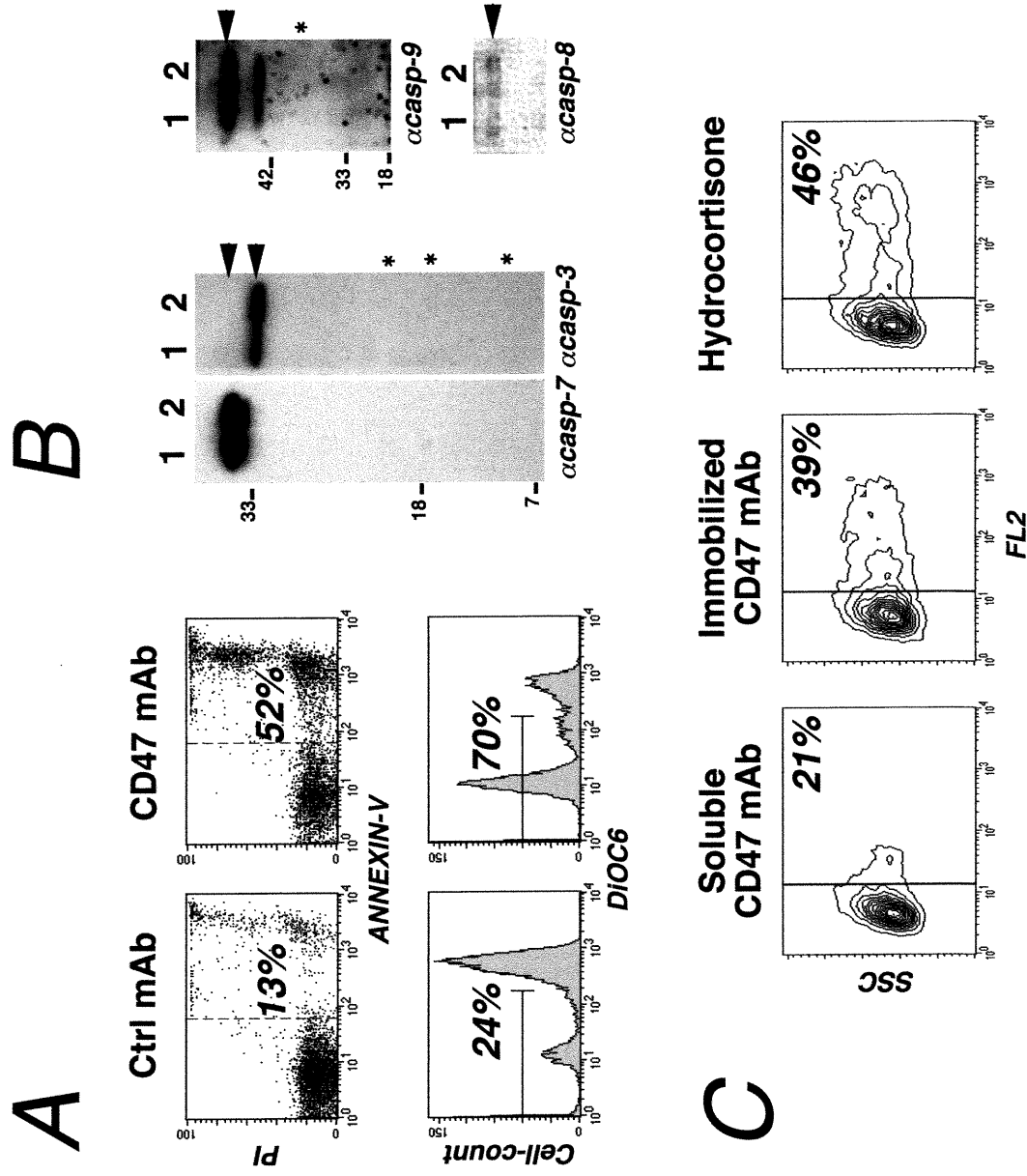


Figure 1. Immature dendritic cells efficiently phagocytosed B-CLL cells killed by CD47-induced caspase-independent cell pathway.

Freshly isolated B-CLL cells were cultured overnight in the presence of soluble or immobilized CD47 mAb (10 µg/ml), control mAb (10 µg/ml) or hydrocortisone (5.10⁻⁴ M). Panel A: cells were double-stained with FITC-labeled Annexin-V and PI (upper panel) or with DiOC₆ (lower panel), and analyzed by flow cytometry. Shown is % of dead cells (Annexin-V⁺ or DiOC₆^{low}). Panel B: soluble [lane1] or immobilized [lane2] CD47 mAb-treated cells were lysed and western blot analysis was performed for detection of caspases 3, 7, 8 and 9 cleavage products (as indicated by *). Panel C: Overnight soluble or immobilized CD47 mAb-treated or HC-treated red-stained B-CLL cells (PKH26 linker) were co-cultured for 3 h with immature dendritic cells (iDC) at 10/1 ratio. The mixture was then analyzed by flow cytometry for red fluorescence (FL2) after gating on live iDC. Shown are percent of iDC that have phagocytosed red dead cells. One representative experiment out of three.

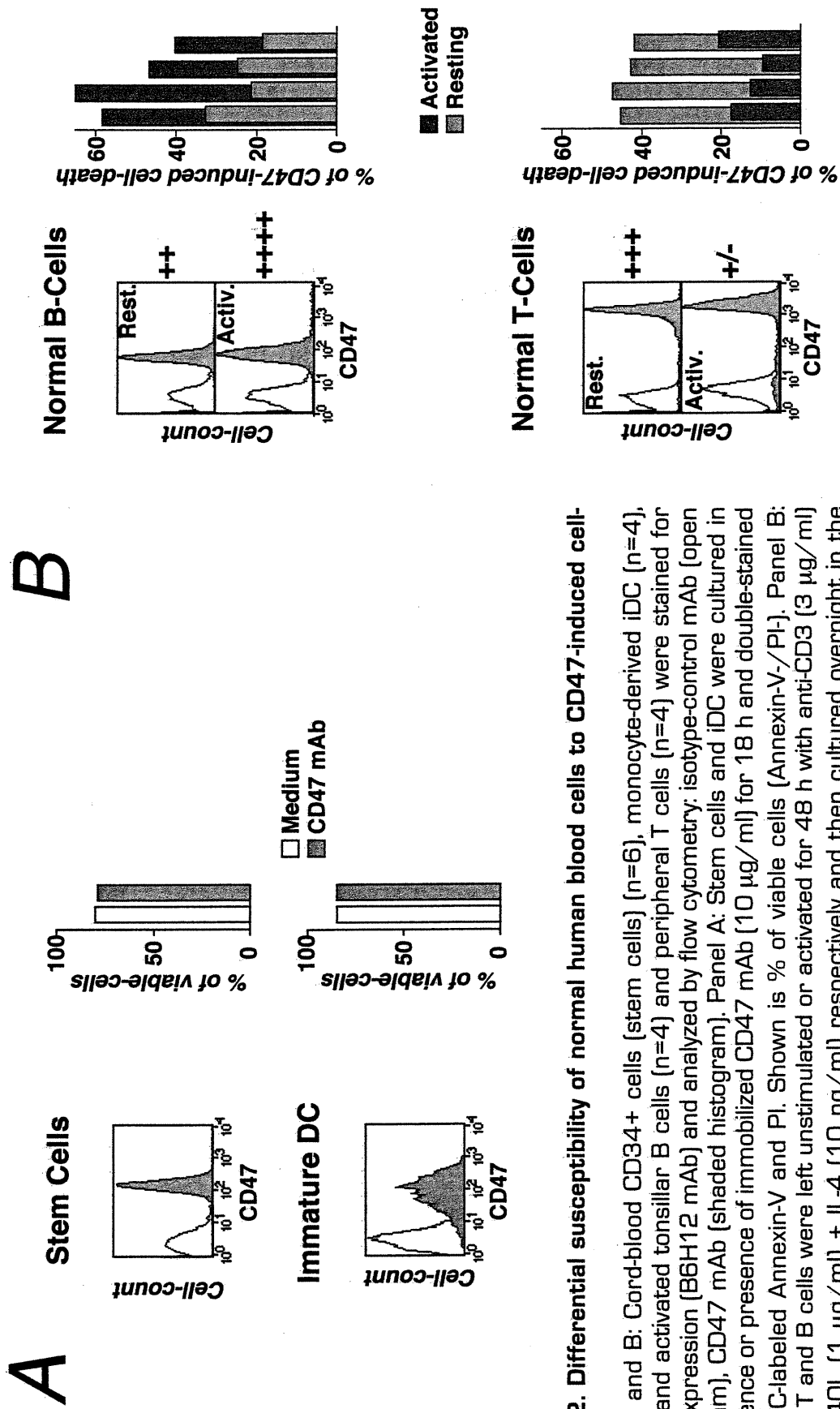


Figure 2. Differential susceptibility of normal human blood cells to CD47-induced cell death. Panel A and B: Cord-blood CD34+ cells (stem cells) (n=6), monocyte-derived iDC (n=4), resting and activated tonsillar B cells (n=4) and peripheral T cells (n=4) were stained for CD47 expression (B6H12 mAb) and analyzed by flow cytometry: isotype-control mAb (open histogram), CD47 mAb (shaded histogram). Panel A: Stem cells and iDC were cultured in the absence or presence of immobilized CD47 mAb (10 μ g/ml) for 18 h and double-stained with FITC-labeled Annexin-V and PI. Shown is % of viable cells (Annexin-V-/PI-). Panel B: Resting T and B cells were left unstimulated or activated for 48 h with anti-CD3 (3 μ g/ml) or sCD40L (1 μ g/ml) + IL-4 (10 ng/ml) respectively and then cultured overnight in the absence or presence of immobilized CD47 mAb. The % of CD47-induced cell-death was calculated as indicated in materials and methods: (++++) >50%; (+++) 40% to 50%; (++) 30% to 40%; (+) 20% to 30%; (+/-) 10% to 20%; (-) <10%

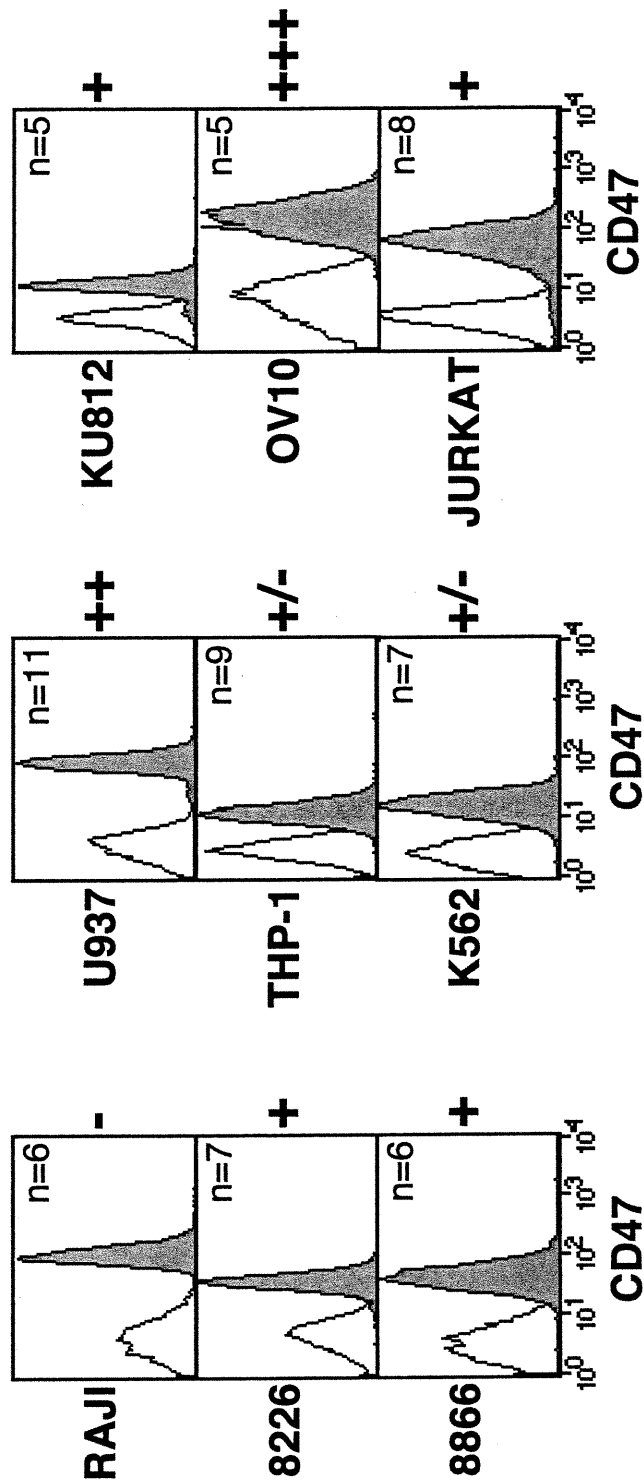
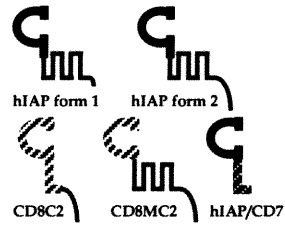


Figure 3. Susceptibility of human cell lines to CD47-induced cell-death: Lack of correlation between CD47 expression and CD47-induced cell death. Various cell-lines were stained for CD47 expression using B6H12 mAb: isotype-control mAb (open histogram) and CD47 mAb (shaded histogram). Cells were cultured overnight on soluble or immobilized CD47 mAb and analyzed by flow cytometry. CD47-induced cell-death was calculated as indicated in materials and methods and legend to figure 2.

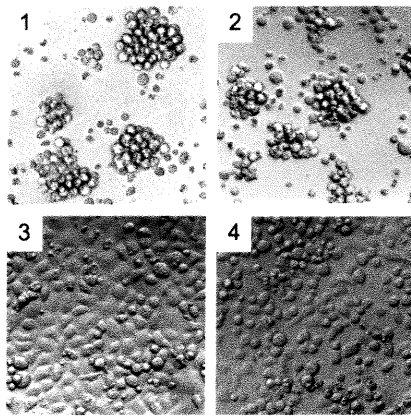
Figure 4. Requirement of both extracellular and transmembrane domains for CD47-induced cell-death.

Panel A: Various constructs or/and chimeras of the CD47 molecule (described in "materials and methods") were transfected into U937, Jurkat or JimB8 (CD47^{-/-}) cell lines. Panel B: Expression of the CD47 products (black histograms) was determined by staining with B6H12 mAb (for hIAP form 1 and 2, IAP/CD7) or anti-mouse CD8 α mAb (for CD8-MC2 and CD8-C2). Expression of endogenous CD47 (grey histograms) Cells were cultured overnight on immobilized anti-mouse CD8 α or CD47 mAb (10 μ g/ml). * Jurkat and JimB8 transfectants were pretreated with PMA for 24h (2 ng/ml) before killing. CD47-induced cell death was calculated as described in legend to figure 2. Panel C: Light microscopy of PMA-activated Jurkat cells transfected with CD8-C2 construct. Untreated cells (panel 1), cells cultured for 18h with soluble (panel 2) , immobilized (panel 3) CD47 mAb or immobilized anti-mouse CD8 α mAb (panel 4). Panel B and C: one representative experiment out of three.

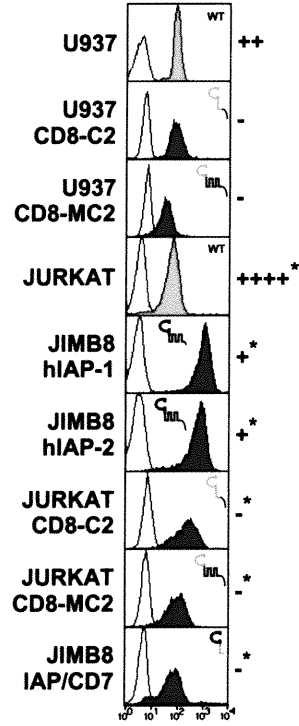
a



c



b



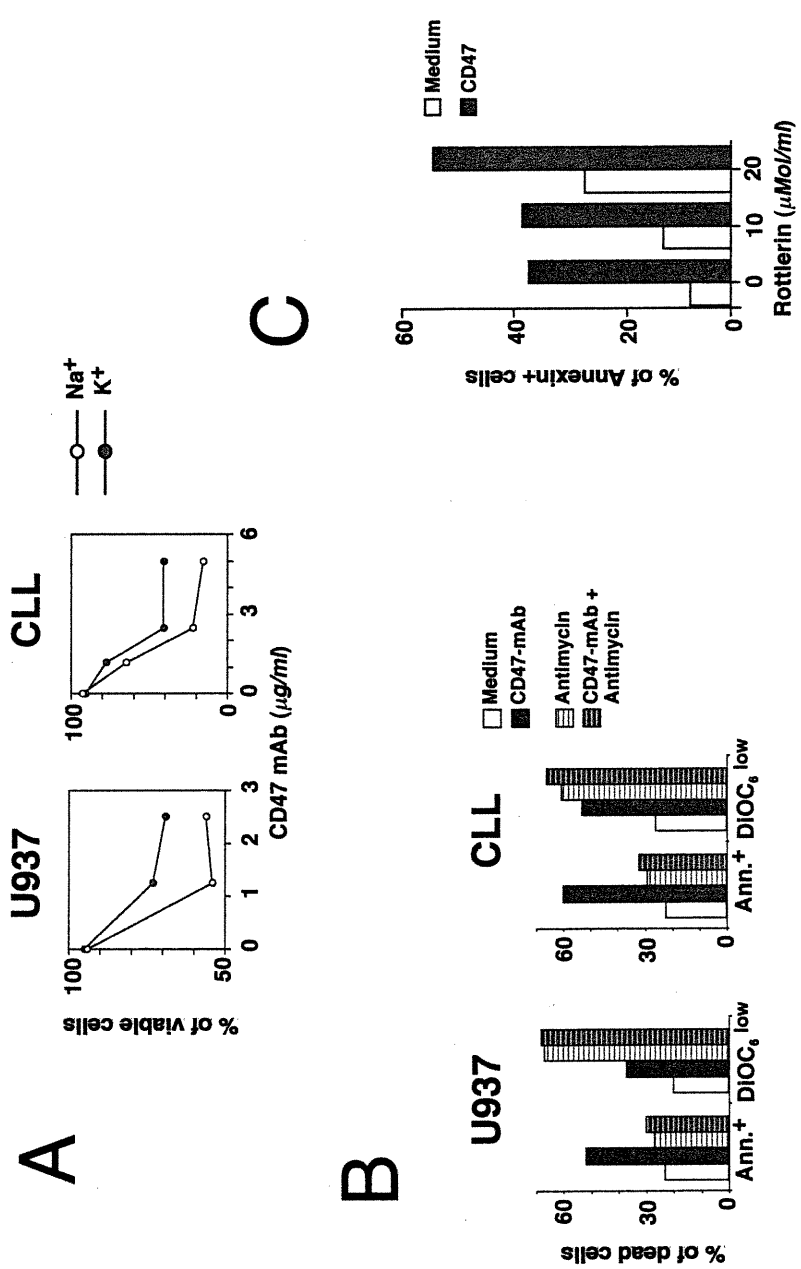


Figure 5. Down-regulation of CD47-induced PS-exposure by K⁺ efflux or Antimycine A treatment: lack of effect of PKC inhibitor Rottlerin. Freshly isolated B-CLL cells and U937 cell line were cultured with or without immobilized CD47 mAb. Panel A: Cultures were performed in RPMI medium (Na⁺) or in RPMI with inverted Na⁺/K⁺ ratios (K⁺). Shown is % of viable cells (Annexin-V-/PI-). Panel B and C: Cells were cultured in the presence or absence of immobilized CD47 mAb with or without Antimycine A (30 μM) or increasing concentrations of Rottlerin. Shown are the % of dead cells (Annexin-V+ or DiOC₆low cells). One representative experiment out of 4.

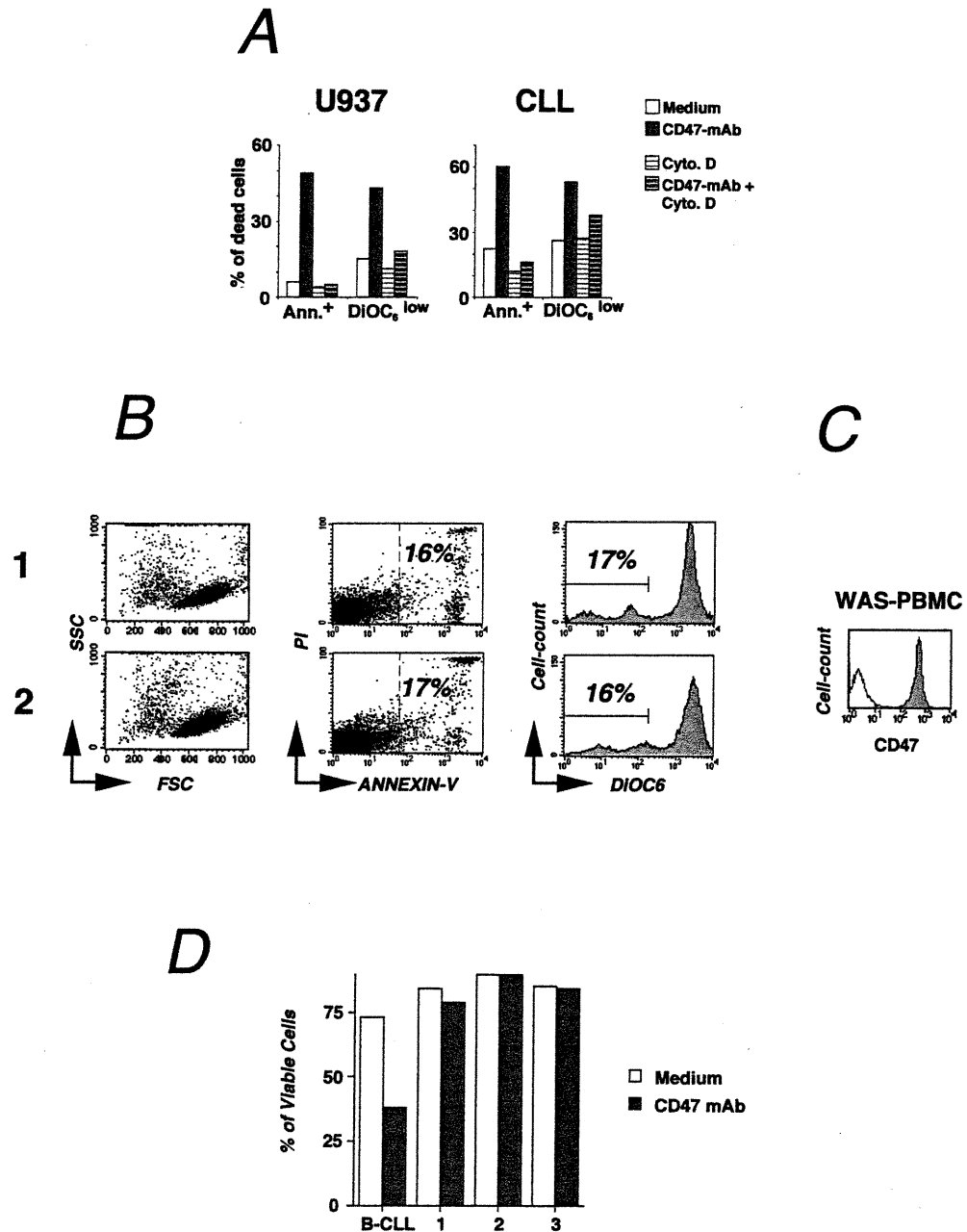


Figure 6. Link between CD47-induced PS exposure and cytoskeleton rearrangement. Panel A: Cytochalasin D (20 μ M) treated-B-CLL cells or U937 cell line were cultured for 3 h in the presence or absence of immobilized CD47 mAb. Shown are % of dead cells [Annexin-V+ or of DiOC6low cells]. One representative experiment out of 4. Panel B-D: PBMC were isolated from 3 WAS-patients and cultured in the absence or presence of immobilized CD47 mAb. Patient #1: Annexin V/PI and DiOC6 staining (B), CD47 expression of PBMC from patient #1 (C) and % viable cells [Annexin V-/PI-] for 3 WAS and one B-CLL patients (D).

REFERENCES

1. Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:781-828.
2. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. [Review] [98 refs]. *Cell.* 1999;96:245-254
3. Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Peter ME. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 1999;11:277-285.
4. Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 2001;22:141-148.
5. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:217-245.
6. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulation in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:619-642
7. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407:784-788.
8. Sarin A, Wu ML, Henkart PA. Different interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) family protease requirements for the apoptotic death of T lymphocytes triggered by diverse stimuli. *J Exp Med.* 1996;184:2445-2450.
9. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14559-14563.
10. Kim K, Lee C, Sayers TJ, Muegge K, Durum SK. The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol.* 1998;160:5735-5741
11. Deas O, Dumont C, MacFarlane M, Rouleau M, Hebib C, Harper F, Hirsch F, Charpentier B, Cohen GM, Senik A. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol.* 1998;161:3375-3383.
12. Lesage S, Steff AM, Philippoussis F, Page M, Trop S, Mateo V, Hugo P. CD4+ CD8+ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *J Immunol.* 1997;159:4762-4771.
13. Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 1999;5:1277-1284.
14. Pettersen RD, Hestdal K, Olafsen MK, Lie SO, Lindberg FP. CD47 signals T cell death. *J Immunol.* 1999;162:7031-7040.
15. Pettersen RD, Bernard G, Olafsen MK, Pourtejn M, Lie SO. Cd99 signals caspase-independent t cell death. *J Immunol.* 2001;166:4931-4942.
16. Skov S, Klausen P, Claesson MH. Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 1997;139:1523-1531.
17. Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA. A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J Immunol.* 1999;163:4115-4124.
18. Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci.* 1995;108:3419-3425.
19. Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem.* 1996;271:21-24.
20. Vernon-Wilson EF, Kee WJ, Willis AC, Barclay AN, Simmons DL, Brown MH. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1. *Eur J Immunol.* 2000;30:2130-2137.
21. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol.* 2001;11:130-135.
22. Armant M, Avice MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J Exp Med.* 1999;190:1175-1182.
23. Demeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164:2193-2199.

24. Avice MN, Rubio M, Sergerie M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol.* 2000;165:4624-4631.
25. Avice MN, Rubio M, Sergerie M, Delespesse G, Sarfati M. Role of cd47 in the induction of human naive t cell anergy. *J Immunol.* 2001;167:2459-2468.
26. Reinhold MI, Lindberg FP, Kersh GJ, Allen PM, Brown EJ. Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein [CD47] is an adhesion-dependent, CD28-independent signaling pathway. *J Exp Med.* 1997;185:1-11.
27. Rebres RA, Green JM, Reinhold MI, Ticchioni M, Brown EJ. Membrane Raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and PKC{theta} translocation in T cells. *J Biol Chem.* 2000;15:2
28. Latour S, Tanaka H, Demeure C, Mateo V, Rubio M, Brown EJ, Maliszewski C, Lindberg FP, Oldenborg A, Ullrich A, Delespesse G, Sarfati M. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol.* 2001;167:2547-2554.
29. Ticchioni M, Deckert M, Mary F, Bernard G, Brown EJ, Bernard A. Integrin-associated protein [CD47] is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *J Immunol.* 1997;158:677-684.
30. Wacławiczek M, Majdic O, Stulnig T, Berger M, Baumruker T, Knapp W, Pickl WF. T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4. *J Immunol.* 1997;159:5345-5354.
31. Green JM, Zhelesnyak A, Chung J, Lindberg FP, Sarfati M, Frazier WA, Brown EJ. Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein [CD47], and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol.* 1999;146:673-682.
32. Zhou M, Brown EJ. Leukocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J Exp Med.* 1993;178:1165-1174.
33. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 2000;192:571-580.
34. Kawahara A, Ohsawa Y, Matsumura H, Uchiyama Y, Nagata S. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol.* 1998;143:1353-1360.
35. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, J-L B, Schneider P, Seed B, Tschoop J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using th kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000;1:489-495
36. Dumont C, Durrbach A, Bidere N, Rouleau M, Kroemer G, Bernard G, Hirsch F, Charpentier B, Susin SA, Senik A. Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood.* 2000;96:1030-1038.
37. Blystone SD, Lindberg FP, Williams MP, McHugh KP, Brown EJ. Inducible tyrosine phosphorylation of the beta3 integrin requires the alphaV integrin cytoplasmic tail. *J Biol Chem.* 1996;271:31458-31462.
38. Bortner CD, Hughes FM, Cidlowski JA. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:32436-32442.
39. Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.* 1999;6:495-496.
40. Krahlting S, Callahan MK, Williamson P, Schlegel RA. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death & Differentiation.* 1999;6:183-189
41. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine.* 1998;188:1359-1368
42. Chandra J, Gilbreath J, Freireich EJ, Kliche KO, Andreeff M, Keating M, McConkey DJ. Protease activation is required for glucocorticoid-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood.* 1997;90:3673-3681.
43. Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34⁺ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev.* 1994;8:113-124.
44. Messner HA. Assessment and characterization of hemopoietic stem cells. *Stem Cells.* 1995;13 Suppl 3:13-18.
45. Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med.* 1999;50:507-529.
46. Lindberg FP, Gresham HD, Schwarz E, Brown EJ. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol.* 1993;123:485-496.

47. Reinhold MI, Green JM, Lindberg FP, Ticchioni M, Brown EJ. Cell spreading distinguishes the mechanism of augmentation of T cell activation by integrin-associated protein/CD47 and CD28. *Int Immunol.* 1999;11:707-718.
48. Lindberg FP, Gresham HD, Reinhold MI, Brown EJ. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *J Cell Biol.* 1996;134:1313-1322.
49. Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301:33-42.
50. Dallaporta B, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Larochette N, Brenner C, Marzo I, Kroemer G. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. *J Immunol.* 1998;160:5605-5615.
51. Bortner CD, Cidlowski JA. Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:21953-21962.
52. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem.* 2000;275:23065-23073.
53. Yoshida H, Tomiyama Y, Ishikawa J, Oritani K, Matsumura I, Shiraga M, Yokota T, Okajima Y, Ogawa M, Miyagawa J, Nishiura T, Matsuzawa Y. Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42. *Blood.* 2000;96:234-241.
54. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276:1071-1077.
55. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000;405:85-90.
56. Zhuang J, Ren Y, Snowden RT, Zhu H, Gogvadze V, Savill JS, Cohen GM. Dissociation of phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis from other features of the apoptotic program. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273:15628-15632.
57. Hirt UA, Gantner F, Leist M. Phagocytosis of nonapoptotic cells dying by caspase-independent mechanisms. *J Immunol.* 2000;164:6520-6529.
58. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. [Review] [50 refs]. *Science.* 1998;281:1312-1316.
59. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000;6:513-519.
60. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J.* 2000;14:729-739.
61. Reed JC. Cytochrome c: can't live with it—can't live without it. *Cell.* 1997;91:559-562.
62. Bruey J-M, Ducasset C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo A-P, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 2000;2:645-652.
63. Katz E, Deehan MR, Seatter S, Lord C, Sturrock RD, Harnett MM. B cell receptor-stimulated mitochondrial phospholipase A2 activation and resultant disruption of mitochondrial membrane potential correlate with the induction of apoptosis in WEHI-231 B cells. *J Immunol.* 2001;166:137-147.
64. Shimizu S, Tsujimoto Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:577-582.
65. Yu SP, Choi DW. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:9360-9362.
66. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:9487-9492.
67. Tzung SP, Kim KM, Basanez G, Giedt CD, Simon J, Zimmerberg J, Zhang KY, Hockenbery DM. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol.* 2001;3:183-191.
68. Erickson JW, Cerione RA. Multiple roles for Cdc42 in cell regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:153-157.
69. Thrasher AJ, Burns S, Lorenzi R, Jones GE. The Wiskott-Aldrich syndrome: disordered actin dynamics in haematopoietic cells. *Immunol Rev.* 2000;178:118-128.
70. Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* 1998;8:1347-1356.
71. Bertho N, Drenou B, Laupeze B, Le Berre C, Amiot L, Grosset J, Fardel O, Charron DJ, Mooney NA, Fauchet R. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J Immunol.* 2000;164:2379-2385.

72. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull.* 1997;53:491-508.
73. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity.* 2001;14:715-725.
74. Henson PM, Bratton DL, Fadok V. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nature Reviews/ molecular cell biology.* 2001;2:627-633
75. Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science.* 2000;288:2051-2054.
76. Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S, Friis R. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod.* 1998;58:739-746.
77. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 1990;343:170-173.
78. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell.* 1998;93:1159-1170.

3. Article III

Dans le laboratoire où j'ai effectué mon travail de doctorat, plusieurs de mes collègues ont étudié le rôle de CD47 dans la régulation de la réponse immunitaire.

Il a été montré par M. Armant que l'engagement de CD47 par son ligand naturel, la TSP, ou par le peptide 4N1K qui mime le domaine de la TSP qui lie CD47, inhibe la production d'IL-12 par les monocytes humains. Le travail présenté ici, initié par C. Demeure, y fait écho et rapporte les effets immuno-modulateurs de CD47 lors de la maturation des cellules dendritiques suite à une stimulation bactérienne. Il est montré que l'engagement de CD47 par des anticorps solubles ou le peptide 4N1K inhibe la sécrétion des cytokines IL-12, TNF- α , GM-CSF et IL-6 par des cellules dendritiques en cours de maturation. Les cellules dendritiques qui ont été mises en présence de CD47 tout au long de leur maturation sont phénotypiquement et fonctionnellement immatures. Ma contribution à ce travail a été de montrer que les cellules ainsi traitées ont gardé leur capacité à endocytoser des particules (comme montré par l'ingestion de BSA), tout comme celle de phagocyter des cellules apoptotiques (figure 8 de cet article). Ces deux fonctions sont normalement perdues par les cellules dendritiques matures.

**CD47 ENGAGEMENT INHIBITS CYTOKINE PRODUCTION AND
MATURATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS.¹**

C.E. Demeure, H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse and M. Sarfati.²

The Journal of Immunology vol.164, 2000, p. 2193-2199.

Laboratoire Allergie, Centre Recherche du CHUM, Campus Notre-Dame, Université
de Montréal, Canada.

Running title: Functional expression of CD47 on human DCs

Keywords: CD47, thrombospondin, dendritic cells, IL-12

ABSTRACT

Upon encounter with bacterial products, immature dendritic cells (iDCs) release pro-inflammatory cytokines and develop into highly stimulatory mature DCs. In the present study, we show that human monocyte-derived DCs functionally express the CD47 Ag, a thrombospondin receptor. Intact or F(ab)₂ fragments of CD47 mAb suppress bacteria-induced production of IL-12, TNF- α , GM-CSF and IL-6 by iDCs. 4N1K, a peptide derived from the CD47-binding site of thrombospondin, also inhibits cytokine release. The inhibition of IL-12 and TNF- α is IL-10-independent inasmuch as IL-10 production is down-modulated by CD47 mAb and blocking IL-10 mAb fails to restore cytokine levels. CD47 ligation counteracts the phenotypic and functional maturation of iDCs, in that it prevents the up-regulation of co-stimulatory molecules, the loss of endocytic activity and the acquisition of an increased capacity to stimulate T cell proliferation and IFN- γ production. Interestingly, regardless of CD47 mAb treatment during DC maturation, mature DC restimulated by sCD40-L and IFN- γ , to mimic DC/T interaction, produce less IL-12 and more IL-18 than iDCs. Finally, CD47 ligation on iDCs does not impair their capacity to phagocytose apoptotic cells. We conclude that following exposure to micro-organisms, CD47 ligation may limit the intensity and duration of the inflammatory response by preventing inflammatory cytokine production by iDCs and favoring their maintenance in an immature state.

INTRODUCTION

Dendritic cells, the most potent antigen-presenting cells of the immune system play an essential role at the onset of the innate and adaptive immune response against pathogens [1,2]. Under resting conditions, DCs are found in most tissues in an immature form which is characterized by a very high ability to capture and process soluble and particulate Ags [3]. Upon inflammatory stimulation, they undergo maturational changes which involve down-regulation of their endocytic capacity, up-regulation of surface immunogenic MHC-peptide complexes and increased expression of costimulatory molecules, thus becoming very efficient stimulators of naive T cells [4]. As part of this process, they adapt their adhesion and chemokine receptors to migrate out of the inflamed tissue and reach secondary lymphoid organs where they meet T cells [5]. Bacterial products additionally stimulate DCs to release several cytokines that participate to the inflammatory response, and chemokines that contribute to attract more DCs and other cell types [6]. Among these cytokines, IL-12 plays a central role by inducing IFN- γ production by T cells and NK cells, enhancing NK cell cytotoxicity and promoting the development of cytotoxic T cells [7]. Due to their capacity to produce IL-12, it is generally accepted that DCs are critically positioned to initiate the Th1 immune response required for the clearance of several pathogens [8].

Because of its potentially deleterious effects, the inflammatory response must be coordinated with mobilization of anti-inflammatory mechanisms that will allow the return to the steady state. These may down-regulate IL-12 production and / or inhibit the maturation of iDCs into potent T cell stimulators. Inhibitors of IL-12 include IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , PGE2, glucocorticoids, as well as phagocytic receptors CR3, Fc γ R and scavenger receptors [1, 9-15]. IL-10, produced by various cell types including DCs themselves, may inhibit DCs maturation [16]; moreover, IL-10-treated DCs were found to induce tolerance in naive T cells [17] or to bias their

development into Th2 effectors [18,19]. TGF- β and glucocorticoids have also been recently found to alter the maturation of DCs in response to stimulation by bacterial products [20,21].

CD47 Ag, also known as Integrin Associated Protein (IAP), is a widely expressed multispan transmembrane protein, which is physically and functionally associated with $\alpha\beta3$ integrin, the vitronectin receptor [22]. Indeed, CD47⁻ cell lines expressing $\alpha\beta3$ do not bind vitronectin-coated beads [23] and CD47 deficient mice rapidly die of *Escherishia coli* peritonitis, a phenomenon directly associated with a reduction in leukocyte activation in response to $\beta3$, but not $\beta2$ integrin ligation [24]. CD47 has also been implicated in leukocyte transendothelial migration [25,26].

In this report we show that CD47 is functionally expressed on human DCs. Ligation of CD47 by mAb or a synthetic peptide derived from its natural ligand, i.e. thrombospondin [27-29], inhibits cytokine production and the maturation of iDCs in response to bacterial stimulation.

RESULTS

1. CD47 expression by immature and mature DCs.

We first demonstrated CD47 expression on human monocyte-derived iDCs and bacteria-stimulated mature DCs (mDCs). As previously reported, all monocytes co-expressed CD14 and CD47 [33]. CD14 expression was drastically reduced during the process of monocyte differentiation into iDCs in the presence of GM-CSF and IL-4, while CD83 was slightly induced [Fig.1]. As shown in this figure, CD47 remained highly expressed on iDCs and was not modulated following *Staphylococcus aureus* (SAC)-induced maturation. Mature DCs became CD14⁻, CD47⁺ and CD83^{bright}.

2. CD47 ligation suppressed cytokine release by maturing DCs.

We next evaluated the effect of CD47 ligation by soluble mAb on cytokine production by maturing DCs. iDCs stimulated for 24 h with SAC produced large amounts of pro-inflammatory cytokines [Fig. 2]. As seen, CD47 engagement potently suppressed IL-12 (n=13, p<0.0001), TNF- α (n=13, p<0.0001), IL-6 (n=8, p<0.05) and GM-CSF (n=6, p<0.04) production. CD47 ligation did not inhibit the production of IL-8 nor alter the viability of DCs which was greater than 80%, as revealed by trypan blue staining. Note that spontaneous release of TGF- β was not affected by SAC stimulation regardless of the presence of CD47 mAb.

CD47 mAb-mediated inhibition of IL-12 and TNF- α production was dose-dependent and significant suppression was seen with as little as 0.5 μ g/ml of 2D3 or B6H12 mAbs directed against different CD47 epitopes [34] [Fig. 3a]. Since Fc γ R ligation reportedly suppresses IL-12 production by monocytes [15], we excluded this mechanism by showing that F(ab)'₂ fragments still inhibited cytokine release by maturing DCs [Fig. 3b]. Finally, because TSP is a reported ligand of CD47, we examined the effect of 4N1K, a peptide corresponding to the CD47 binding region of TSP [27] on IL-12 and TNF- α production. As depicted in Fig. 3c, 4N1K inhibited SAC-

induced cytokine release by maturing DCs, whereas the control mutant peptide 4NGG remained inactive.

Together, these results indicated that CD47 ligation by soluble mAb or its natural ligand suppressed the production of pro-inflammatory cytokines by maturing DCs without inducing a generalized dysfunction of the cells.

3. Inhibition of cytokine production by CD47 ligation was IL-10-independent and not overcome by IFN- γ .

Among the products released by macrophages and DCs following stimulation by bacterial products, IL-10 is known to be an autocrine inhibitor of pro-inflammatory cytokine production [9,16]. We therefore determined whether CD47 mAb-mediated suppression of cytokines during DC maturation resulted from increased endogenous IL-10 production. We found that CD47 ligation suppressed by 72% (n=7, p<0.03) IL-10 release by SAC-stimulated iDCs (Fig. 4a). To further exclude a possible role for IL-10 in CD47 mAb inhibitory effects, a neutralizing anti-IL-10 mAb was added to SAC-stimulated cultures. In agreement with the suppression of IL-10 release by CD47 ligation, blocking of IL-10 failed to restore IL-12 and TNF- α production in these cultures (Fig. 4 b).

IFN- γ has been reported to provide an efficient co-signal for IL-12 p70 production by DCs stimulated by CD40L or bacterial products such as SAC or LPS [35]. Therefore, we examined whether IFN- γ could restore cytokine release in CD47 mAb-treated maturing DCs. As shown in Table I, CD47 engagement significantly suppressed IL-12, TNF- α and IL-10 in the presence of a high dose of IFN- γ (500 U/ml), whereas IL-8 secretion still remained unaltered.

4. CD47 ligation impaired DC phenotypic and functional maturation.

Upon stimulation with bacterial products, iDCs undergo several phenotypic and functional changes, a process known as DC maturation and leading to the development of fully competent Ag-presenting and co-stimulatory cells [1,2]. We found that CD47 ligation during SAC stimulation of iDCs significantly altered their maturation (Fig.5 and 6). The SAC-induced down-regulation of the monocyte marker CD14 and up-regulation of the DC marker CD83 were impaired in CD47 mAb-treated cells (Fig.5). CD47 mAb also inhibited the up-regulation of HLA-DR and of the co-stimulatory molecules CD40, CD54, CD80 and CD86. Functionally, DC maturation is associated with a marked reduction of the endocytic capacity. As seen, CD47 mAb-treated DCs retained a higher capacity to uptake FITC-conjugated BSA. Similar results were observed by using 4NIK peptide [C. Demeure and M. Sarfati, personal observations]

The functional immaturity of CD47-treated DCs was further revealed by examining their ability to stimulate allogeneic T cell proliferation and cytokine production (Fig.6). DCs that had matured in the presence of control Ab were strikingly better than iDCs at inducing T cell proliferation (10-fold better) and IFN- γ or IL-13 production. In contrast, DCs that had been incubated with anti-CD47 mAb together with SAC were much less efficient to initiate T cell proliferation (3-fold less than mDCs) and not better than iDCs to induce IFN- γ and IL-13 production. Note that IL-4 and IL-5, two typical Th2 cytokines, could not be detected under these experimental conditions (data not shown).

The following results suggested that the reduced capacity of CD47 mAb-treated DCs to stimulate IFN- γ production may not entirely result from decreased IL-12 production during DC maturation. Indeed, regardless of CD47 ligation during DC maturation, mDCs produced about 10 times less IL-12 than iDCs after restimulation with soluble CD40L and IFN- γ (used to mimic T cell / DCs interaction),

(Fig.7). In contrast, we found that mDCs produced about twice more IL-18 than iDCs, and this was also not modulated by anti-CD47 treatment.

5. CD47 ligation did not impair immature DC phagocytic function.

Immature DCs, as opposed to mDCs, are reported to be professional phagocytes which efficiently eliminate apoptotic and necrotic cells during early step of inflammatory process [36]. Since our data indicated that CD47 ligation during bacterial stimulation of iDCs inhibited cytokine secretion and prevented their acquisition of a mature functional phenotype, we determined whether CD47 mAb treatment would inhibit the phagocytic activity of iDCs. As shown in Fig.8, CD47 mAb-treated iDCs phagocytosed apoptotic B cells as efficiently as untreated DCs, extending and confirming previous reports that CD47 mAb failed to interfere with the phagocytosis of aged neutrophils by macrophages [37].

DISCUSSION

The present results indicate that CD47 is functionally expressed on human monocyte-derived DCs and that it may regulate their maturation induced by the pathogenic bacteria *Staphylococcus Aureus*. Ligation of CD47 by either mAbs or a synthetic peptide corresponding to the binding region of its natural ligand, TSP, has two major effects on the response of iDCs to SAC. First, it suppresses the production of the pro-inflammatory cytokines IL-12, TNF- α , IL-6 and GM-CSF by maturing DCs, without affecting that of IL-8 and TGF- β . Second, it prevents the phenotypic and functional changes associated with DC maturation, including the up-regulation of MHC class II Ags, co-stimulatory molecules and the acquisition of a potent T cell stimulatory activity. IL-10 and TGF- β were reported to exert similar effects on the maturation of DCs induced by bacterial products [16,20]. It is unlikely that anti-CD47 mAb acts by increasing the endogenous production of these

inhibitory cytokines. Indeed, their production is either suppressed (IL-10) or unaffected (TGF- β) and inclusion of neutralizing Abs to IL-10 (fig.4) or TGF- β (data not shown) does not restore the cytokine production of anti-CD47-treated cells. Cytokine production by maturing DCs is also known to be suppressed by PGE2 (38) or by pre-treatment of iDCs with low doses of LPS (39,40). Similar to anti-CD47 mAb, these treatments reduce IL-12 production by maturing DCs and generate mDCs that have a impaired capacity to induce IFN- γ production by allogeneic T cells; however, unlike anti-CD47 mAb, they do not prevent DCs to acquire increased T cell stimulatory activity.

In agreement with Kapsenberg and colleagues, we found that human mDCs produce ten-fold less IL-12 (and TNF- α) than iDCs (41), regardless of anti-CD47 mAb treatment. This contrasts with the increased capacity of mDCs, as compared to iDCs, to stimulate IFN- γ production by adult T cells (Fig.6), a phenomenon which is IL-12-dependent (ref. 42 and data not shown). Moreover, mDCs are better at inducing IFN- γ production because they express higher levels of membrane-bound (CD80, CD86, CD54 and CD58) and soluble molecules (IL-18) which co-stimulate the effects of IL-12 (43). Inclusion of anti-CD47 mAb during DC maturation did not affect the IL-12 nor the IL-18 producing capacity of mDCs, whereas it reduced their capacity to stimulate T cell proliferation and IFN- γ production; probably by inhibiting the up-regulation of membrane bound co-stimulatory molecules. This interpretation is supported by two observations. First, even in the presence of exogenous IL-12 (50 pM), the production of IFN- γ by T cells stimulated with anti-CD47-treated DCs remains significantly lower than that induced by control mAb-treated DCs (44 ± 7 ng/ml of IFN- γ compared to 76 ± 11 ng/ml; mean \pm SEM of 4 experiments, $p < 0.05$). Second, anti-CD47-treated DCs also display a reduced rather than enhanced capacity to induce IL-13 production by T cells (Fig. 6), a cytokine whose production is suppressed by IL-12 (44).

The inhibition of DC maturation may be biologically and clinically relevant as illustrated in a recent study showing that *Plasmodium falciparum* may use this strategy to defeat the human immune response [45]. Malaria-infected human erythrocytes reportedly exert the same effects on LPS-induced maturation of iDCs as those described in the present study. Interestingly, the ability of intact malaria-infected erythrocytes to inhibit DC maturation was linked to the expression on their surface of still undefined parasite-derived proteins binding to CD54, CD36 and TSP. It is possible that TSP bound to infected erythrocytes may engage CD47 expressed on DCs and alter their ability to induce effective T cell-dependent immunity. It is also worthy to note that *Plasmodium falciparum* was shown to express a thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), capable of binding to human cells [46].

Thrombospondin is an homotrimeric extracellular matrix protein (ECM) which is produced not only by platelets but also by monocytes and macrophages [27]. TSP is transiently expressed at high concentration in damaged and inflamed tissues [28,29] and there is growing evidence that it has potent anti-inflammatory properties. These may involve at least two distinct mechanisms. First, TSP binds to immature TGF- β and activates it into a potent immunoregulatory cytokine [47]. TSP-deficient animals display diffuse inflammatory lesions that are corrected by treatment with the active form of TGF- β and are reminiscent of those observed in TGF- β deficient animals [48]. The second mechanism involves the binding of TSP to CD47 expressed on inflammatory cells and / or APC. In addition to the present findings, engagement of CD47 by TSP reportedly inhibits IL-12 production by human monocytes stimulated via T cell-dependent mechanisms or bacterial products [49]. Whether or not some pathogens exploit the CD47-mediated inhibition of DC maturation, our observations are consistent with a role for this molecule and its

ligand (TSP) in regulating the early stages of the innate and adaptive immune response.

Acknowledgements

We thank Mrs. Norma Delbosco for excellent secretarial assistance and Dr.M.Gately (Hoffman Laroche,Nutley,NJ) for providing anti-IL-12 Abs.

Footnotes

1: This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada to M.Sarfati and from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to C.Demeure. C.Demeure is an FRSQ scholar.

2: Address for correspondence: Dr. M. Sarfati ,University of Montreal,Laboratoire Allergie (M4211-K),Centre Recherche CHUM,Campus Notre-Dame,1560 Sherbrooke Street East,Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada

TEL: (514)281-6000Ext. 6632

FAX: (514)896-4753

E-MAIL: sarfati.delespesse@sympatico.ca

3. Abbreviations used in this paper: iDCs: immature dendritic cells; mDCs: mature DCs; TSP: thrombospondin

Table 1: IFN- γ fails to prevent inhibition of cytokine production by CD47 engagement on DCs.

Stimulation ^b	additions	Cytokines (ng/ml) ^c			
		IL-12	TNF- γ	IL-8	IL-10
SAC + IFN- γ	Clg	7.69 \pm 1.57	110.9 \pm 29.7	27.98 \pm 7.43	1.33 \pm 0.38
SAC + IFN- γ	anti-CD47	2.64 \pm 0.91	37.9 \pm 13.7	27.42 \pm 5.23	0.74 \pm 0.26
		p=0.003 ^c	p=0.004	p=0.8	p=0.05

^a Cytokines were measured in the supernatants taken after 24h. Results are expressed as mean \pm SEM of 6 to 10 experiments.

^b IFN- (500U/ml) and anti-CD47 (B6H12) or its isotype-matched control (both at 10_g/ml) mAbs were added together with SAC.

^c p values were calculated using the paired t test.

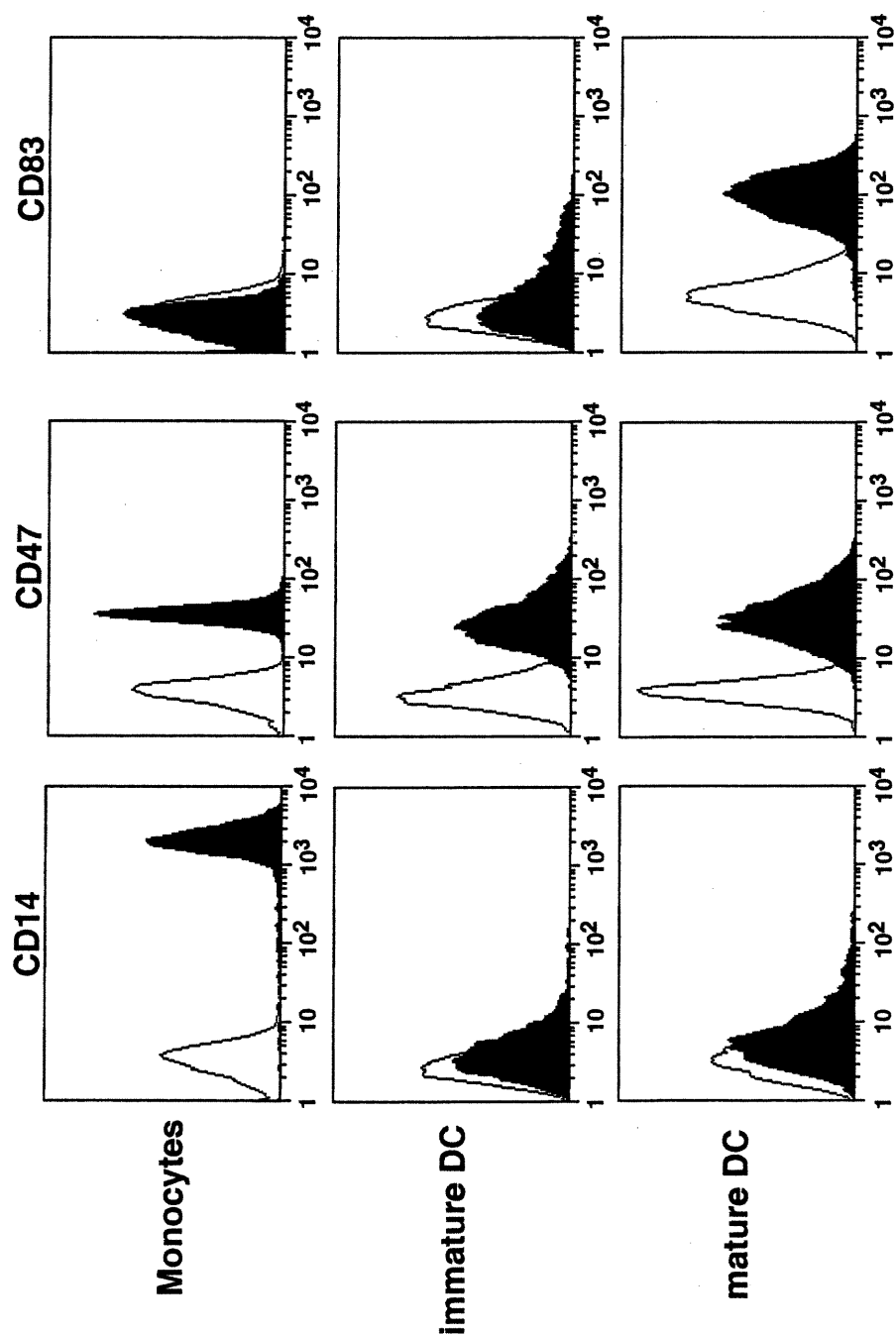


Fig. 1: Dendritic cells express the CD47 antigen. Fresh monocytes, immature DCs and SAC-activated DCs (mature DCs) were analyzed by flow cytometry for the expression of CD47, CD14 and CD83. The results are representative of 4 experiments.

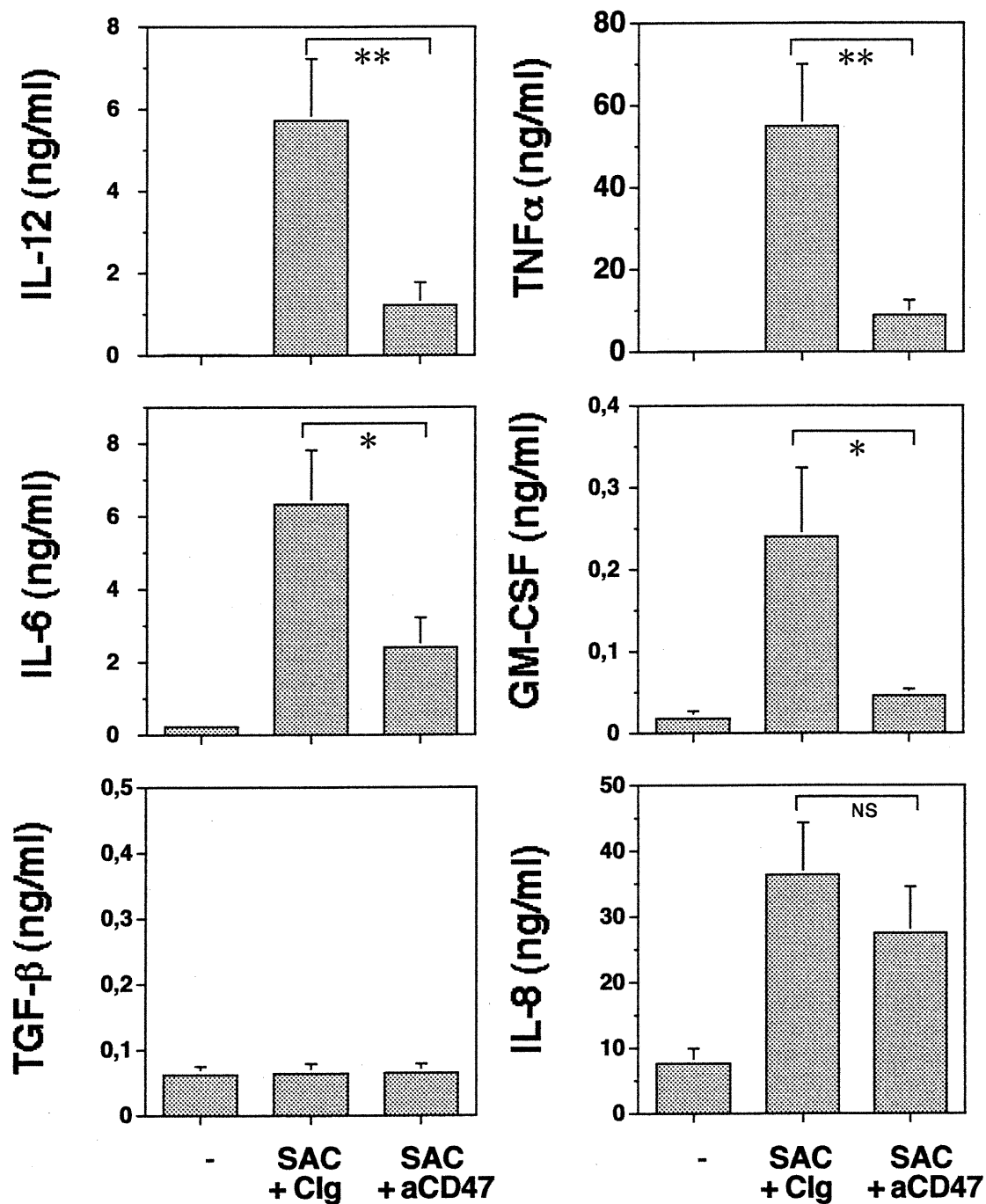


Fig. 2: CD47 ligation inhibits cytokine release by monocyte-derived DCs. Immature DCs were cultured with either medium alone or SAC (0.02%) in the presence of CD47 mAb [B6H12] or its isotype-matched control [Clg] mAb [10 μ g/ml]. Cytokines were measured in culture supernatants collected after 24 h. Results are expressed as means \pm SEM of 10 experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

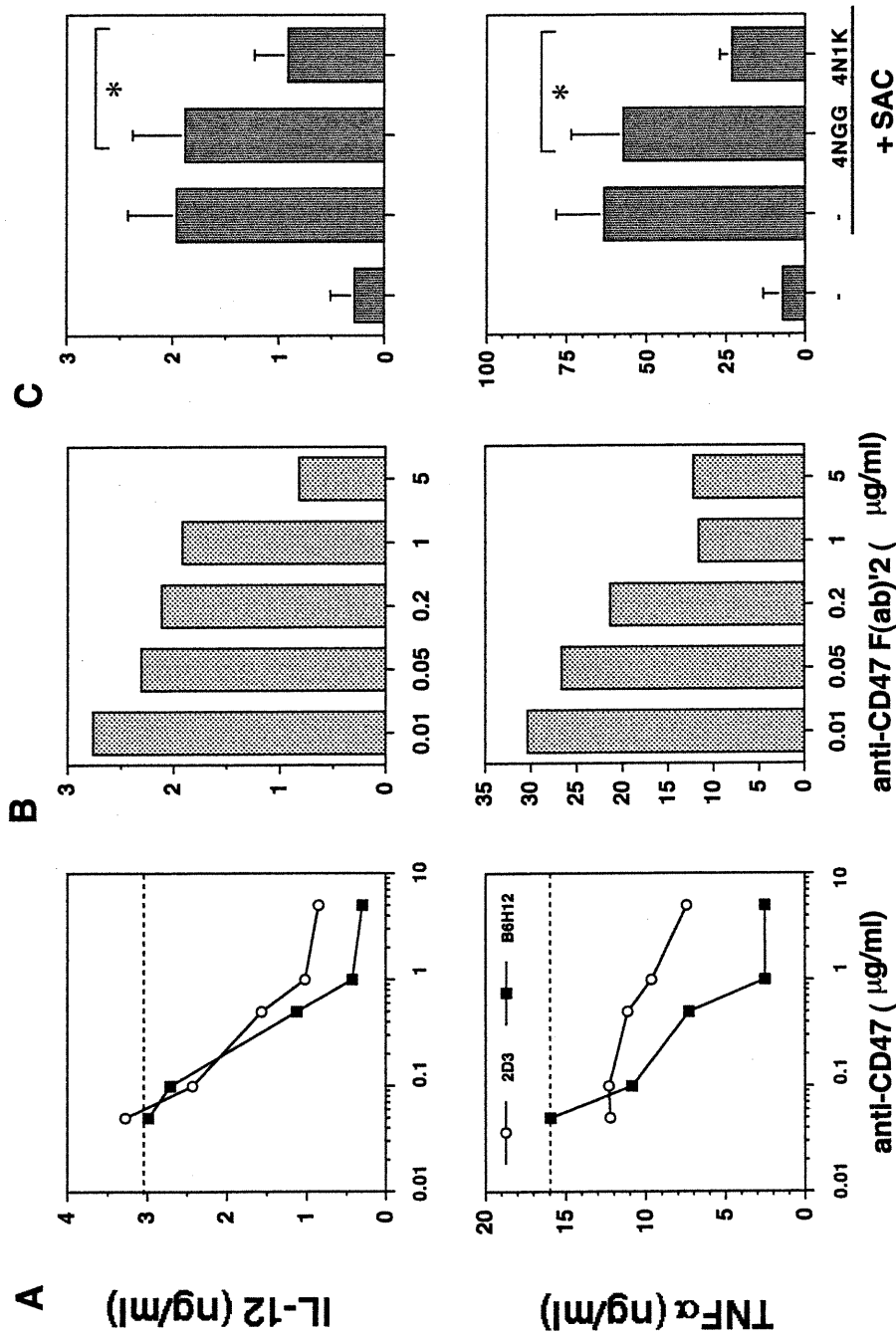


Fig. 3: Suppression of cytokine production by intact or F(ab)₂ fragments of CD47 antibodies and synthetic peptides. Immature DCs were stimulated with SAC in the presence of graded doses of (A) B6H12 (closed squares) or 2D3 (open circles) CD47 mAbs, (B) B6H12 F(ab)₂ fragments and (C) 4N1K (derived from the CD47-binding site of thrombospondin) or 4NGG (mutant peptide), each at 50 µg/ml. The dotted line in panel (A) indicates SAC-induced cytokine production in the presence of a high dose (20 µg/ml) of isotype-matched control Ab (C1g). Panels A and B show 1 representative experiment of 5 and panel C the means ± SD of 4 experiments.

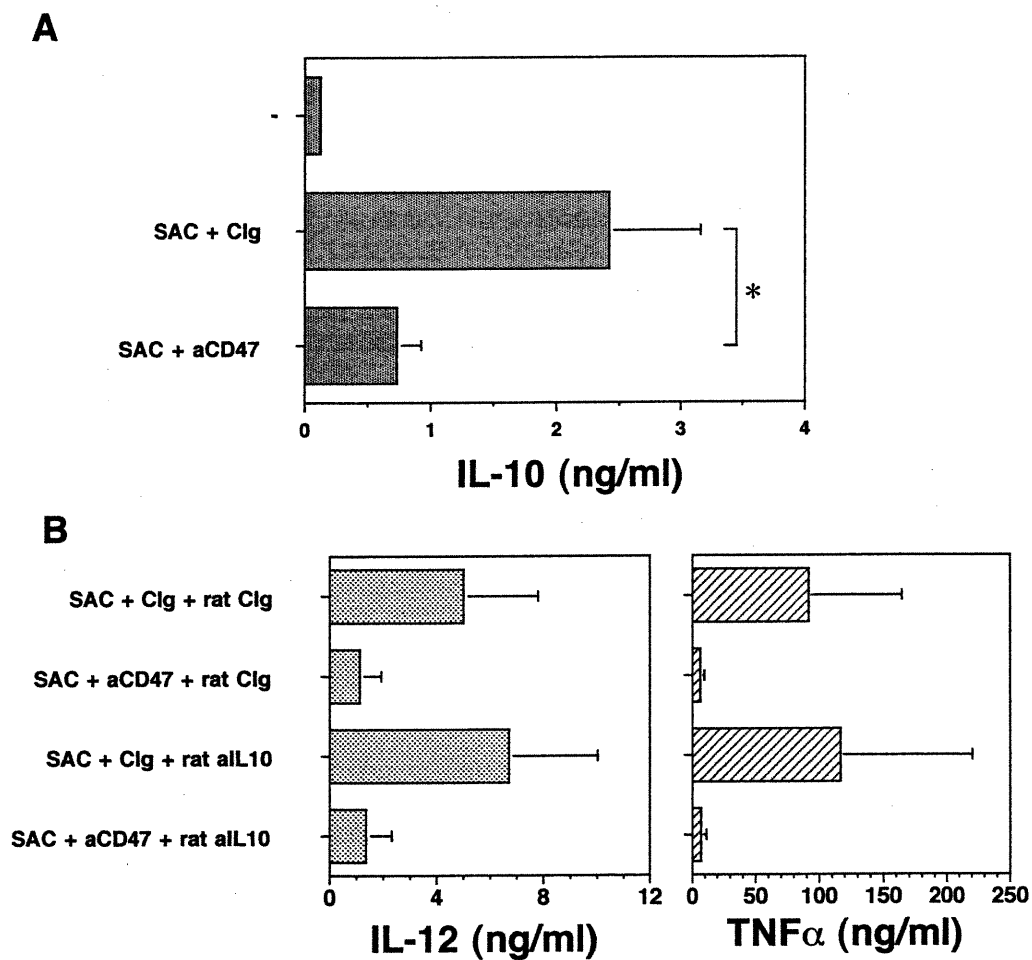


Fig. 4: Suppression of cytokine production by CD47 mAb is IL-10-independent. [A]: IL-10 production by iDCs stimulated with SAC in the presence of CD47 mAb or its isotype-matched control as described for figure 2. [B]: IL-12 and TNF- α production by iDCs stimulated as in panel A, in the presence of a blocking rat anti-human IL-10 mAb (10 μ g/ml) or Clg. Results represent the means \pm SEM of six [A] and four [B] experiments respectively. *, $p < 0.05$.

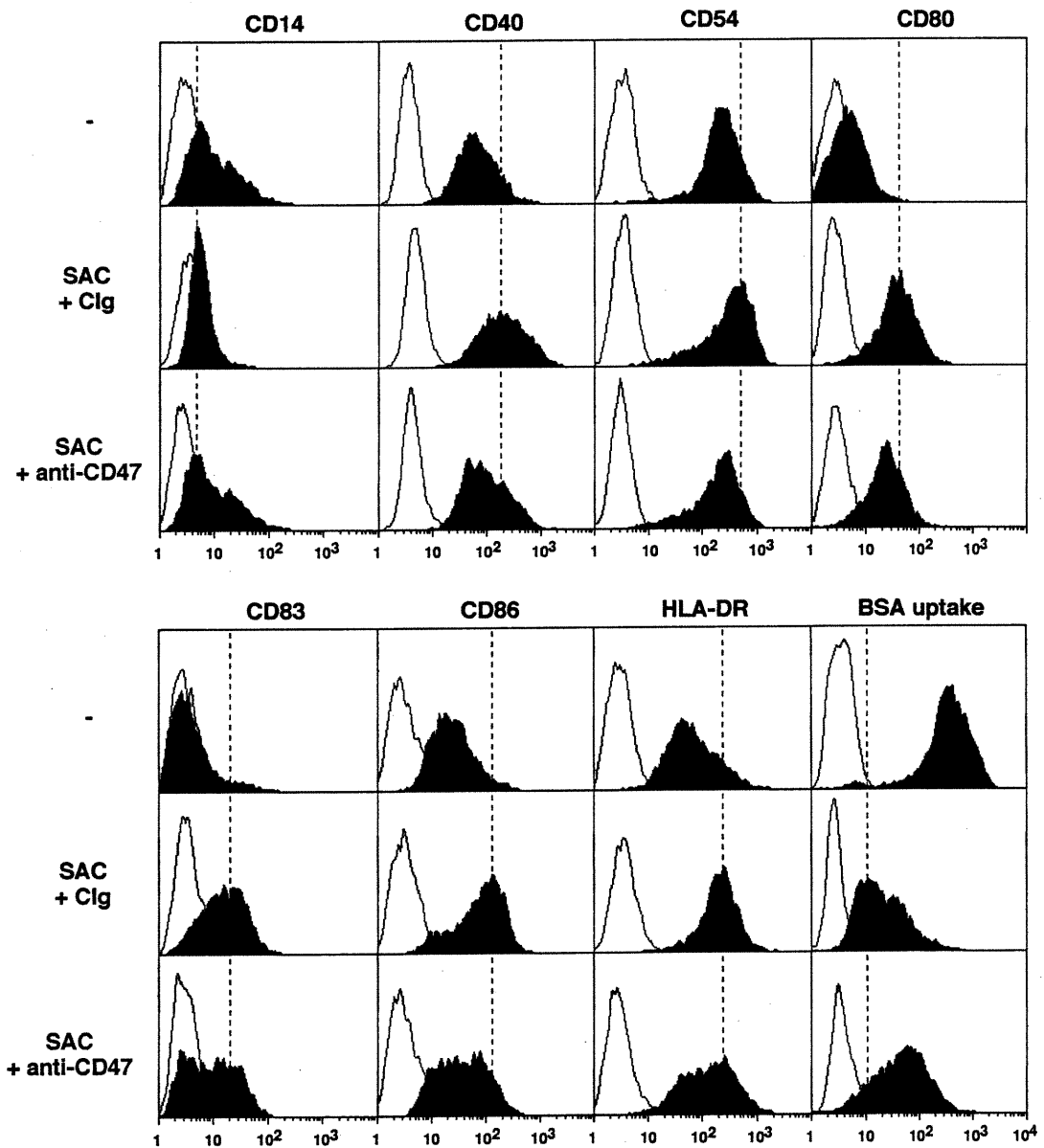


Fig. 5: CD47 engagement prevents SAC-induced DC maturation. iDCs cultured with either medium alone or SAC in the presence of anti-CD47 mAb (B6H12) or Clg were analyzed by flow cytometry for the expression of surface molecules (48 h) and their capacity to endocytose macromolecules (24 h). For analysis of the endocytic capacity, iDCs were stimulated as above except that culture medium contained GM-CSF and IL-4. After 24 h, cells were washed and incubated at 0.5×10^6 cells/ml with $50 \mu\text{g/ml}$ FITC-labelled BSA for 30 min at 37°C (filled profiles) or 4°C (open profiles) (negative control), and analyzed by flow cytometry. The figure is representative of 4 independent experiments.

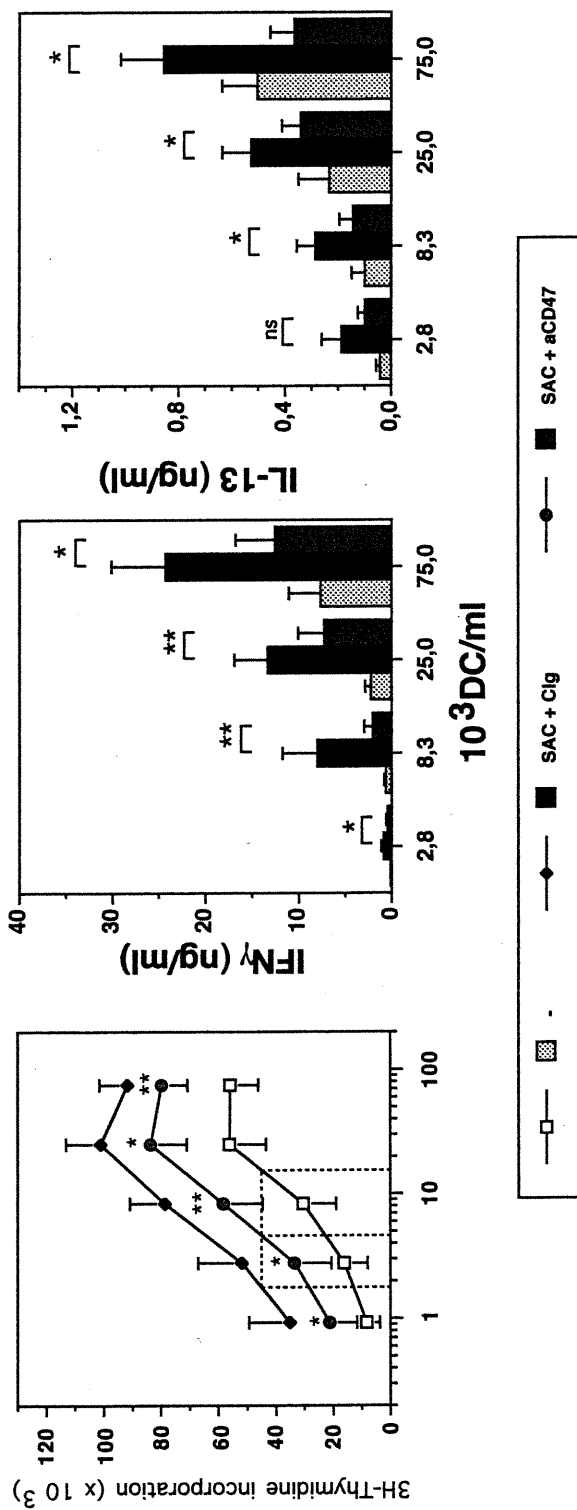


Fig. 6: CD47 engagement during SAC-induced DC maturation impairs their ability to stimulate allogeneic T cells. Day 5 iDCs were either maintained in IL-4 and GM-CSF-supplemented medium (-) or stimulated with SAC in the presence of anti-CD47 or Clg. After 48h, cells were washed and used to stimulate allogeneic T cells (10⁶/ml). Culture supernatant was collected after 4 days for measurement of cytokine production and ³H-thymidine uptake was assessed during the last 16 hours of culture. Shown are the means \pm SEM of 9 experiments. *, p < 0.05; **, p < 0.01.

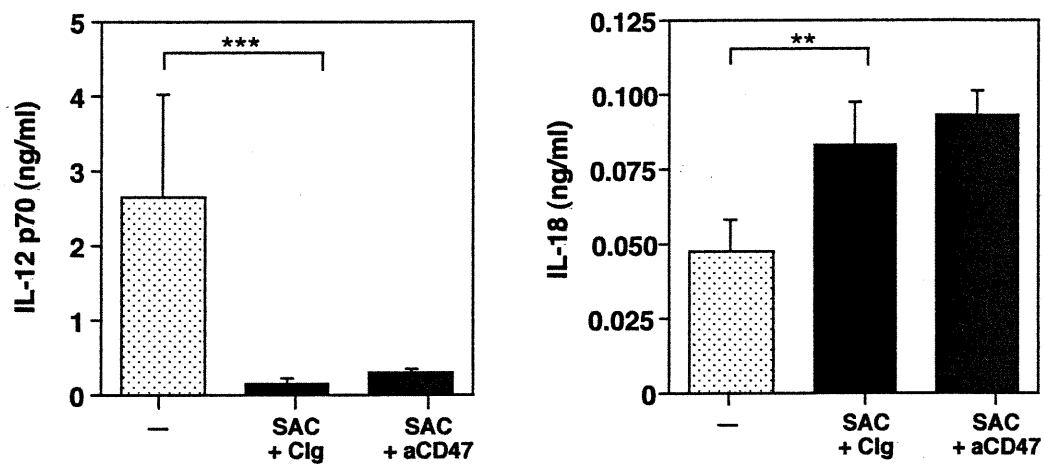


Fig.7: Maturation of iDCs in the presence of anti-CD47 mAb does not alter the capacity of mDC to produce IL-12 and IL-18. Day 5 iDCs were either maintained in IL-4 and GM-CSF-supplemented medium (-) or stimulated with SAC in the presence of anti-CD47 or Clg. After 48h, cells were washed and re-stimulated (0.25×10^6 /ml) with soluble trimeric CD40L ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) and IFN- γ (500 U/ml) in order to mimic T cell-dependent activation. IL-12 and IL18 were measured after 24h of stimulation. The figure shows the means \pm SEM of 6 experiments; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$.

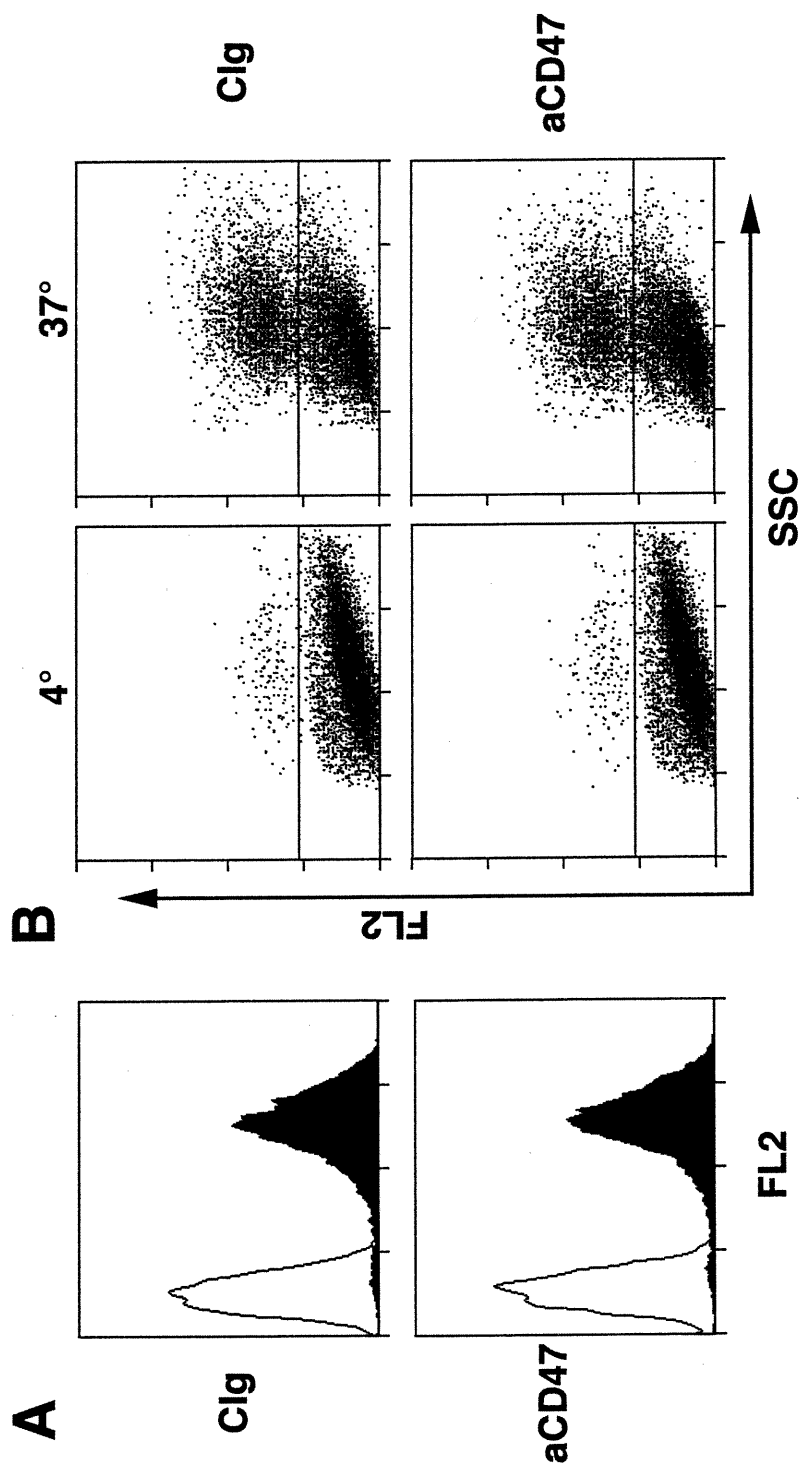


Fig. 8: CD47 engagement does not affect the endocytic and phagocytic capacities of iDCs. iDCs were incubated in the presence of anti-CD47 mAb (B6H12) or Clg and examined for their capacity to endocytose macromolecules (A) or to phagocytose apoptotic cells (B). To determine the endocytic capacity, iDCs were incubated (0.5×10^6 cells/ml) with $50 \mu\text{g/ml}$ of FITC-labelled BSA for 30 min at 37°C (filled histograms) or 4°C (open histograms). To evaluate the phagocytic capacity, iDCs were incubated with fluorescent apoptotic B cells (10^6 B cells per one iDC) for 3h at 37°C or at 4°C and examined by flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Recombinant human IL-4, soluble CD40 ligand, and GM-CSF were kindly provided by Immunex Corporation (Seattle, WA) and Dr. D. Bron (Institut Bordet, Brussels, Belgium) respectively. IL-12 was a generous gift from Dr. M. Gately (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ) and IFN γ was obtained from Genzyme (Boston, MA). *Staphylococcus aureus* Cowan I strain (SAC) was used at 0.02% (wt/vol; Pansorbin, Calbiochem-Behring, LaJolla, CA). Anti-CD47 mAb B6H12 (mouse IgG1), and neutralizing anti-IL-10 mAb (clone 19 F1.1) were obtained from ATCC (Manassas, VA). The anti-CD47 mAb 2D3 (mouse IgG1) was kindly provided by Dr. E. Brown (University of California, San Francisco, CA). Isotype-matched negative control mAb (mouse IgG1) was prepared in our laboratory. F(ab) $'_2$ fragments of CD47 mAb were prepared using Pierce (Rockford, IL) commercial kit. The 4N1K peptide (KRFYVMWKK) and 4NGG (KRFYGGMWKK) were obtained from Genosys (The Woodlands, Texas); 4N1K corresponds to the C terminal domain of TSP and 4NGG is a control mutant (27). FITC-labelled BSA was purchased from Sigma (Sigma Chemicals, St-Louis, MO).

Cell purification and culture conditions

Generation of monocyte-derived DCs. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation of heparinized blood from healthy volunteers using Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Enriched monocytes were prepared by cold aggregation as described (30), followed by one cycle of rosetting with S-(2 aminoethyl) isothiuronium bromide (Aldrich, Milwaukee) -treated SRBC to deplete residual T and NK cells. Monocyte purity was shown to be >95% by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA) using PE-conjugated anti-CD14 mAb (Ancell, London, Ontario).

Human monocyte-derived immature dendritic cells were prepared exactly as described [31] except that two-thirds of culture medium was replaced by fresh medium containing GM-CSF and IL-4 every other day and non-adherent cells were harvested at day 5. Upon microscopic analysis, >98% non-adherent cells presented cellular projections. Analysis by flow cytometry revealed that preparations consisted in a homogenous (>96%) population of CD2⁻, CD14^{lo/-}, CD16⁻, CD40⁺, CD54⁺, CD80^{lo}, CD83^{lo/-}, CD86⁺, HLA-DR⁺ large cells <1% CD3⁺, CD19⁺ or CD56⁺ cells could be detected.

DCs cultures were performed in complete serum-free HB101 medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) and supplemented with 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM hepes, 100 IU penicillin and 100 µg/ml streptomycin. DCs were cultured at (0.5×10^6 /ml) in 24 well flat-bottom Falcon plates (Becton Dickinson).

Mature DCs were generated by stimulating day 5 monocyte-derived DC (0.5×10^6 /ml) in HB101 medium with SAC (0.02% wt/vol) for 2 days in the presence of GM-CSF and IL-4 as above.

T Lymphocytes and allogeneic MLR. Highly purified T cells were obtained from the monocyte-depleted PBMC by rosetting with AET-treated SRBC, followed by treatment of rosette-forming cells with Lympho-Kwik T (One Lambda, Los Angeles, CA) following manufacturer's recommendations. Cell purity was assessed by flow cytometry using PE-conjugated anti-CD3, anti-CD4 or anti-CD8 mAbs (Ancell) and was shown to be >98%.

These T cells (10^6 /ml) used as responder cells were stimulated in 96 wells flat bottom microplates (Falcon) with different numbers of mitomycin C-treated DCs. All cultures were performed in complete RPMI 1640 medium (BioWhittaker, Walkersville, MA) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM Heps, 100 IU penicillin, 100 mg/ml streptomycin (BioWhittaker) and 10% FCS. Culture supernatant was collected at day 4 and cytokine content was determined.

DNA synthesis was assessed by adding 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ of (methyl- ^3H) thymidine (10 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL) during the last 16 h of culture. Triplicate cultures were then harvested onto glass fiber filters, and the radioactivity was counted using liquid scintillation.

Cytokine measurement

IL-12p70 release was assessed by a two-site sandwich ELISA using mAb 20C2 as the capture mAb and HRPO-coupled mAb 4D6 as detection probe. Both mAbs were generously provided by Dr. M. Gately (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ). The sensitivity of the assays was 6 pg/ml. IFN- γ was measured by a sandwich solid-phase RIA using two anti-IFN- γ mAbs as previously described. TNF- α , GM-CSF and IL10 were measured using a sandwich ELISA or RIA as previously described (30,32). IL-13 was measured using a sandwich ELISA using rat anti-IL-13 mAb (clone 5A2, ATCC) as capture mAb and a polyclonal rabbit anti-IL-13 Ab (Accurate Chemicals, Westbury, NY) as a detecting probe. IL-6, IL-8 and TGF- β ELISA kits were purchased from R & D Systems. All the measurements were performed in duplicate.

Ag uptake assay

Two identical aliquots of DC were washed and resuspended ($10^6/\text{ml}$) in complete HB101 culture medium at 37°C or 4°C [ice-cold]. An equal volume of BSA-FITC (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final concentration; Sigma) was then added and cells were incubated for 30 min. Ag uptake was stopped by extensive washing using cold PBS containing 1% BSA and 10mM Sodium Azide before analysis with a FacScan (Becton Dickinson). Negative controls were the experiments performed at 4°C. For testing the effect of CD47 engagement on endocytosis, anti-CD47 mAb or isotype-matched control (IgG1)(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mAbs were added during the incubation with BSA-FITC.

Phagocytosis of apoptotic cells.

B-cells from Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) patients were isolated by density gradient centrifugation of heparinized blood followed by one cycle of rosetting with S-(2 aminoethyl) isothiuronium bromide (Aldrich, Milwaukee) -treated sheep and red blood cells to deplete T cells. B cell purity was shown to be >98% by flow cytometry (FACSort, Becton Dickinson). Freshly purified B-CLL cells were stained with PKH26 red fluorescent cell linker (Sigma) according to the manufacturer's instructions before induction of apoptosis by culture for 16 h in the presence of hydrocortisone (5×10^{-4} M). More than 95% cells appeared apoptotic as determined using FITC-Annexin V/PI staining. Cells were washed and were given to iDCs (2×10^5 /ml) as a phagocytic meal (10 apoptotic cells per one iDC) for 3 h at 4°C (control) or 37°C, in the presence of anti-CD47 mAb (B6H12, 10 µg/ml) or its isotype-matched control. Endocytosis of PKH26-stained B cells was determined by FACS after gating on live DCs.

Flow cytometry analysis

CD47 surface expression was assessed using a two-step procedure. Briefly, cells were first incubated for 1 h at 4°C with a biotinylated mouse anti-CD47 mAb (B6H12) or class-matched negative control mAb (5 µg/ml). After washing, cells were incubated with PE-labeled streptavidin (AnceLL) for 1 h at 4°C. Stained cells were analyzed using FACScan (Becton Dickinson). All other FITC- or PE-conjugated mAbs were purchased from AnceLL.

Statistical analysis.

The paired t-test was used to determine statistical significance of the data. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

REFERENCES

1. Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392:245.
2. Austyn, J.M. 1998. Dendritic cells. *Curr.Opin.Hematol.* 5:3.
3. Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman, and R.M. Steinman. 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J.Exp.Med.* 188:2163.
4. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J.Exp.Med.* 179:1109.
5. Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C.R. Mackay. 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology Today*. 19:568.
6. Reis e Sousa, C., A. Sher, and P. Kaye. 1999. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr.Opin.Immunol.* 11:392.
7. Gately, M.K., L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D.H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: Role in normal and pathologic immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 16:495.
8. Palucka, K., and J. Banchereau. 1999. Linking innate and adaptive immunity. *Nature Medicine*. 5:868.
9. Trinchieri, G. 1997. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection [IL-10, IL-12, IFN- γ]. *Curr.Opin.Immunol.* 9:17.
10. de Vries, J.E. 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J.Aller.Clin.Immunol.* 102:165.
11. Takeuchi, M., P. Alard, and J.W. Streilein. 1998. TGF- β promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J.Immunol.* 160:1589.
12. Van der Pouw Kraan, T.C.T.M., L.C.M. Boeije, R.J.T. Smeenk, J. Wijdenes, and L.A. Aarden. 1995. Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J.Exp.Med.* 181:775.
13. Vieira, P.L., P. Kalinski, E.A. Wierenga, M.L. Kapsenberg, and E.C. de Jong. 1998. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J.Immunol.* 161:5245.
14. Marth, T., and B.L. Kelsall. 1997. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J.Exp.Med.* 185:1987.
15. Sutterwala, F.S., G.J. Noel, R. Clynes, and D.M. Moser. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J.Exp.Med.* 185:1977.
16. Buelens, C., V. Verhasselt, D. De Groote, K. Thielemans, M. Goldman, and F. Willems. 1997. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur.J.Immunol.* 27:756.
17. Enk, A.H., V.L. Angeloni, M.C. Udey, and M.C. Katz. 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10: a role for IL-10 in induction of tolerance. *J.Immunol.* 151: 2390.

18. De Smedt, T., M. Van Mechelen, G. De Becker, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur.J.Immunol.* 27:1229.
19. Liu, L., B.E. Rich, J.H. Inobe, W. Chen, and H.L. Weiner. 1998. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4⁺ T cells to secrete IL-4. *Int.Immunol.* 10:1017.
20. Geissmann, F., P. Revy, A. Regnault, Y. Lepelletier, M. Dy, N. Brousse, S. Amigorena, O. Hermine, and A. Durandy. 1999. TGF- β 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J.Immunol.* 162:4567.
21. Piemonti, L., P. Monti, P. Allavena, M. Sironi, L. Soldini, B.E. Leone, C. Soggi, and V. Di Carlo. 1999. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J.Immunol.* 162:6473.
22. Lindberg, F.P., H.D. Gresham, E. Schwarz, and E.J. Brown. 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: An immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in α v β 3-dependent ligand binding. *J.Cell.Biol.* 123:485.
23. Lindberg, F.P., H.D. Gresham, M.I. Reinhold, and E.J. Brown. 1996. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *J.Cell.Biol.* 134(5):1313.
24. Lindberg, F.P., D.C. Bullard, T.E. Caver, H.D. Gresham, A.L. Beaudet, and E.J. Brown. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science.* 274:795.
25. Cooper, D., F.P. Lindberg, J.R. Gamble, E.J. Brown, and M.A. Vadas. 1995. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein [CD47]. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 92:3978.
26. Imhof, B.A., D. Weerasinghe, E.J. Brown, F.P. Lindberg, P. Hammel, L. Piali, M. Dessing, and R. Gisler. 1997. Cross talk between α v β 3 and α 4 β 1 integrins regulates lymphocyte migration on vascular cell adhesion molecule 1. *Eur.J.Immunol.* 27:3242.
27. Gao, A-G., F.P. Lindberg, M.B. Finn, S.D. Blystone, E.J. Brown, and W.A. Frazier. 1996. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J.Biol.Chem.* 271:21.
28. Bornstein, P. 1992. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J.* 6:3290.
29. Lahav, J. 1993. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1182:1.
30. Hermann, P., M. Rubio, T. Nakajima, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1998. IFN- α priming of human monocytes differentially regulates gram-positive and gram-negative bacteria-induced IL-10 release and selectively enhances IL-12p70, CD80, and MHC class I expression. *J.Immunol.* 161:2011.
31. Ohshima, Y., and G. Delespesse. 1997. T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J.Immunol.* 158:629.
32. Armant, M., M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1995. Soluble CD23 directly activates monocytes to contribute to the antigen-independent stimulation of resting T cells. *J.Immunol.* 155:4868.
33. Zhou, M., and E.J. Brown. 1993. Leukocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J.Exp.Med.* 178:1165.

34. Brown, E., L. Hooper, T. Ho, and H. Gresham. 1990. Integrin-associated protein: A 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J.Cell Biol.* 111:2785.
35. Snijders, A., C.M.U. Hilkens, P. Kalinski, and M.L. Kapsenberg. 1998. High levels of IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int.Immunol.* 10:1593.
36. Albert, M.L., S.F.A. Pearce, L.M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R.L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\text{v}\beta 5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 188:1359.
37. Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 343:170.
39. Kalinski, P., C.M.U. Hilkens, A. Snijders, F.G.M. Snijdewing, and M.L. Kapsenberg. 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E_2 , promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J.Immunol.* 159:28.
40. Karp, C.L., M. Wysocka, X. Ma, M. Marovich, R.E. Factor, T. Nutman, M. Armant, L. Wahl, P. Cuomo, and G. Trinchieri. 1998. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur.J.Immunol.* 28:3128.
41. Rieser, C., C. Papesh, M. Herold, G. Böck, R. Ramoner, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1998. Differential deactivation of human dendritic cells by endotoxin desensitization: Role of tumor necrosis factor- α and prostaglandin E_2 . *Blood.* 91:3112.
42. Kalinski, P., J.H.N. Schuitemaker, C.M.U. Hilkens, E.A. Amsterdam, and M.L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of human dendritic cells is associated with decreased responsiveness to IFN- γ and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during interaction with T helper cells. *J.Immunol.* 163:3231
43. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J.Exp.Med.* 184:747.
44. Stoll, S., H. Jonuleit, E. Schmitt, G. Müller, H. Yamauchi, M. Kurimoto, J. Knop, and A.H. Enk. 1998. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur.J.Immunol.* 28:3231.
45. Jung, T., J. Wijdenes, C. Neumann, J.E. de Vries, and H. Yssel. 1996. Interleukin-13 is produced by activated human CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cells: modulation by interleukin-4 and interleukin-12. *Eur.J.Immunol.* 26:571.
46. Urban, B.C., D.J.P. Ferguson, A. Pain, N. Willcox, M. Plebanski, J.M. Austyn, and D.J. Roberts. 1999. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature.* 400:73.
47. Robson, K.J.H., U. Frevert, I. Reckmann, G. Cowan, J. Beier, I.G. Scragg, K. Takehara, D.H.L. Bishop, G. Pradel, R. Sinden, S. Saccheo, H.M. Müller, and A. Crisanti. 1995. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J.* 14:3883.
48. Schultz-Cherry, S., J. Lawler, and J.E. Murphy-Ullrich. 1994. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor- β . *J.Biol.Chem.* 269:26783.
49. Crawford, S.E., V. Stellmach, J.E. Murphy-Ullrich, S.M.F. Ribeiro, J. Lawler, R.O. Hynes, G.P. Boivin, and N. Bouck. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell.* 93:1159.

50. Armant, M., M-N. Avice, P. Hermann, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 selectively downregulates human IL-12 production and responsiveness. *J.Exp.Med.* 190:1175.

DISCUSSION

1. Redéfinition de la mort cellulaire programmée

Les résultats présentés ici ^[112, 113] décrivent un processus de mort cellulaire efficace qui se caractérise par la mise en place d'événements exclusivement cytoplasmiques de la mort cellulaire par apoptose. De ce fait, nous proposons une sous-classification de la mort cellulaire programmée qui sépare les événements observés dans le cytoplasme [mort cytoplasmique] de ceux induits dans le noyau [mort nucléaire].

1.1. Mort « cytoplasmique »

Nous avons vu précédemment que les signaux qui engendrent l'apoptose peuvent être de nature très variée. Cependant, ils conduisent tous à des modifications cytologiques consensuelles, permettant finalement à la cellule mourante d'être éliminée rapidement de façon « silencieuse ». Au niveau cytoplasmique, les modifications sont, par ordre d'importance : 1/ la perte de l'asymétrie membranaire quant à sa composition en phospholipides, et notamment l'ecto-exposition des PS de la membrane plasmique, ceci en l'absence de rupture de celle-ci ; 2/ le rétrécissement de la cellule, événement concomitant au précédent ; 3/ la baisse de potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\psi_m$; d) le bourgeonnement éventuel de la membrane plasmique. A cet égard, les conséquences engendrés par l'agrégation de CD47 rentrent dans le cadre d'un processus de « mort cytoplasmique », puisque les trois premières conditions sont remplies [Article I et II]. In vivo, la destinée d'une cellule en apoptose est son élimination par phagocytose via les cellules avoisinantes et (ou) les phagocytes professionnels, tels les macrophages et les cellules dendritiques. Comme nous le discuterons

ultérieurement, cette suppression se produit généralement en l'absence d'inflammation, et sans dispersion de matériel cellulaire dans le milieu extracellulaire. Les observations que nous rapportons ici contribuent à étayer l'hypothèse que certains des événements cytoplasmiques engendrés lors de la mort cellulaire suffisent à eux seuls à la reconnaissance et à la phagocytose des cellules ainsi engagées vers la mort. Nous montrons que les cellules tuées via CD47 sont efficacement phagocytées, alors qu'aucun événement nucléaire n'est détectable, ni par cytométrie de flux (recherche de noyaux hypodiploïdes par marquage à l'iodure de propidium, d'ADN simple brin par l'Ac F7-26), ni sur gel d'agarose (DNA ladder) ni enfin en microscopie à fluorescence (DAPI) ou électronique^[112, 113]. Récemment, une étude a montré que les plaquettes, cellules anucléées mais néanmoins pourvues d'un programme de mort cellulaire, meurent par une apoptose de type « cytoplasmique » (condensation cellulaire, exposition des PS, maintien de l'intégrité membranaire) suite à une élévation des protéines proapoptotiques Bak et Bax. Ces cellules qui meurent d'un processus physiologique (vieillesse et privation de facteurs de survie) sont reconnues et efficacement phagocytées par des macrophages^[4]. L'importance de ces événements cytoplasmiques dans l'élimination des cellules en apoptose a été confirmée par l'étude de Zhuang *et al.* qui ont observé que l'inhibition de certains événements cytoplasmiques de l'apoptose (exposition des PS, perméabilité plasmique accrue) par l'emploi d'oligomycine ou d'antimycine A empêchait la phagocytose de ces cellules apoptotiques. Il faut noter que les autres événements caractéristiques de l'apoptose sont maintenus lors de ces traitements (faible $\Delta\Psi_m$, activation de la caspase-3, clivage de PARP et fragmentation de l'ADN)^[114]. Un nombre croissant de données indiquent que les événements nucléaires de l'apoptose ne sont pas nécessaire à l'élimination des cellules en apoptose.

In vivo, la phagocytose des cellules en apoptose peut avoir lieu avant que ne soient mis en place certains événements nucléaires. Chez *C. elegans*, la dégradation de l'ADN se fait par le produit du gène *nuc-1*, une endonucléase homologue de la DNase II humaine^(115, 116). Chez les mutants déficients pour cette DNase, aussi bien la mort cellulaire que la phagocytose s'observent, mais l'ADN des noyaux, toutefois pycnotiques, n'est pas dégradé⁽¹¹⁷⁾. Chez les vertébrés, l'équivalent est observable. Les travaux de Nakamura *et al.* montrent que l'élimination des thymocytes apoptotiques et des lymphocytes B du centre germinatif se fait avant l'apparition d'ADN fragmenté, chez la souris. Toutefois, quelques cellules à noyau pycnotique peuvent s'observer hors des phagocytes^(118, 119). La génération de souris Knock-out* du gène *cad*⁽¹²⁰⁾ ou transgéniques d'une forme non clivable par la caspase-3 de ICAD, ICAD-Sdm⁽¹²¹⁾, confirment le caractère accessoire de la fragmentation d'ADN quant à la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques. En fait, ces animaux sont viables, ne présentent pas de défauts évidents de croissance, et sont fertiles. Ils ont un développement de leur système immunitaire manifestement normal, malgré le fait qu'*in vitro* leurs cellules spléniques et leurs thymocytes sont résistants à la condensation et à la fragmentation d'ADN suite à l'induction d'apoptose par divers stimuli (étoposide, staurosporine et actinomycine D pour les souris CAD-nulles, radiations ionisantes, dexaméthasone, Ac anti-Fas pour les souris ICAD-Sdm transgéniques). Cependant, dans des coupes de tissus où l'apoptose est présente dans des conditions physiologiques normales (cortex et medulla thymique, corps jaune et cellules granuleuses des follicules ovariens), des cellules qui présentent une fragmentation de leur chromatine sont détectables par la technique TUNEL; et les niveaux d'apoptose sont comparables à ceux présent chez les souris non mutées. Un examen plus poussé du thymus a permis de montrer que les thymocytes positifs pour le marquage TUNEL se retrouvent en fait dans les

* Cf. note p. 13

macrophages. La fragmentation d'ADN serait déclenchée dans les lysosomes de ces derniers, probablement due à l'activation de DNases acides présentes dans ce phagocyte⁽¹²¹⁾. Enfin, une étude chez les souris Apaf1 nulles et les souris *Hammertoe*, démontre que la fragmentation d'ADN n'est pas nécessaire à la mort des cellules interdigitales conduisant à la séparation effective des doigts⁽⁴⁶⁾. Les souris *Hammertoe* ont une mutation génétique non identifiée qui empêche la séparation des orteils lors de leur développement. Cependant, on peut forcer cette séparation en induisant l'apoptose des cellules interdigitales. Si conjointement on inhibe les événements nucléaires par l'utilisation du peptide ZVAD-fmk, la séparation reste effective alors que les cellules interdigitales ne présentent aucun signe de dégradation d'ADN. Parallèlement, l'analyse de l'espace interdigital des embryons Apaf1 nuls, pour lesquels la séparation, quoique ralentie, a complètement lieu chez les souris parvenues à leur terme, confirme que ce phénomène peut se produire en l'absence de mort nucléaire.

L'ensemble de ces travaux suggère fortement que la « mort cytoplasmique » est un processus physiologique pouvant suffire à l'élimination des cellules apoptotiques.

1.2. Mort « nucléaire »

Il n'y a pas si longtemps, l'apoptose se caractérisait essentiellement par la fragmentation internucléosomale de la chromatine, donnant lieu aux « barreaux d'échelle » d'ADN typique sur gel d'agarose (DNA ladder). Si l'assertion n'est pas fautive, nous avons vu précédemment que l'absence de sa détection ne signifie pas absence d'apoptose ni, a fortiori, absence de mort⁽¹²²⁾. Cependant, ces événements nucléaires sont présents dans une grande majorité de cas et revêtent probablement une importance physiologique encore mal définie. Les événements cytologiques caractéristiques de la mort cellulaire dans le noyau sont, par ordre

d'apparition : 1/ la condensation de la chromatine, ou noyaux pycnotiques ; 2/ la fragmentation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire de 300 et/ou 50 Kb ; et 3/ en fragments internucléosomaux de 180 paires de bases et ses multiples (DNA ladder).

Nous avons abordé dans l'introduction certains mécanismes moléculaires connus pour engendrer ces événements. Dans notre modèle, la participation de CAD semble exclue pour deux raisons. 1/ Nous n'observons pas de fragmentation d'ADN (Cf. paragraphe précédent et Article I, fig. 5b et c, fig. 6 et fig. 7); 2/ La caspase-3 n'est pas activée (Article II, fig. 1B). Récemment, la participation de l'endonucléase G mitochondriale (Endo-G) dans la dégradation internucléosomale de l'ADN a été mise en évidence chez *C. elegans* et chez la Souris^(29, 123). Cette découverte pourrait expliquer qu'une faible dégradation d'ADN résiduelle puisse être observée dans les souris ICAD mutées et CAD nulles^(29, 120). Endo-G possède une activité intrinsèque, et ne semble pas nécessiter de facteurs activateurs extérieurs. Son activité, post-mitochondriale, est indépendante des caspases. Toutefois, cette DNase est libérée de la mitochondrie sous l'action de la forme tronquée de Bid (t-Bid) et transloquée vers le noyau où elle exerce son activité. Or, l'activation de Bid se fait sous l'action de la caspase-8⁽¹²⁴⁾. Dans ces conditions, il est peu probable que l'engagement de CD47 produise un t-Bid, puisque nous montrons que la caspase-8 n'est pas activée dans notre modèle (Article II, fig. 1B). Nonobstant, nous ne pouvons pas fermement exclure que Endo-G ne soit pas libérée. L'énorme gonflement de la mitochondrie observée laisse supposer que la membrane externe et/ou interne de la mitochondrie est/est(sont) rompue(s), permettant la libération de molécules de l'espace inter membranaire et matriciel, telles que l'endo-G, l'AIF ou encore le cytochrome c. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'une activité endonucléasique internucléosomale résiduelle puisse survenir ultérieurement (après 18h), puisque les recherches d'ADN fragmenté (gel d'agarose) n'ont pas été poursuivie au delà de

24h d'induction, l'apoptose spontanée des B de LLC étant trop forte pour la discriminer de celle spécifique à CD47. Cependant, bien qu'aucun changement cytologique et biochimique ne soit observé après 6h d'induction dans le noyau, les cellules sont parfaitement phagocytées [Article II, fig. 1C]. D'autre part, l'absence de condensation péri nucléaire de l'ADN indique que si AIF est libéré de la mitochondrie, sa translocation vers le noyau doit être empêchée par un facteur cytosolique restant à identifier, ou bien sa conformation spatiale n'est pas sous forme active^[125]. AIF peut transloquer vers le noyau dans des conditions de mort non apoptotique [déplétion en ATP], où il provoque non plus une condensation péri nucléaire, mais plutôt homogène, accompagnée d'une fragmentation d'ADN en fragments de haut poids moléculaire^[49]. Nous n'observons pas de condensation nucléaire, ni de fragmentation. Cependant, les techniques que nous avons utilisées (Gel d'agarose, microscopie à fluorescence classique) ne permettent pas de les visualiser clairement. Cette fragmentation n'est pas détectable en gel d'agarose^[49], et en microscopie électronique, les noyaux des cellules tuées via CD47 semblent intacts après 16 h [Article I, fig. 7]. Une analyse plus poussée du noyau [microscopie confocale, électrophorèse à flux pulsé] nous permettrait d'éclaircir ce point. Par ailleurs, des marquages en immunofluorescence nous permettraient de déterminer la distribution [mitochondriale et/ou cytoplasmique ?] de AIF et du cytochrome *c* suite à l'engagement de CD47.

Dans des conditions pathologiques particulières, la dégradation endogène de l'ADN de la cellule apoptotique pourrait être nécessaire. Ainsi, lorsque l'organisme fait face à une infection, notamment virale, la dégradation d'ADN dans la cellule infectée peut permettre d'éviter que ne soit retransmis du matériel génétique, contenant de l'information potentiellement délétère, à la cellule phagocytaire. Ceci s'applique également pour des cellules ayant subi des transformations néoplasiques. Cependant, des travaux récents infirment cette hypothèse. En effet, il est démontré

qu'une transmission horizontale d'ADN viral ou oncogénique peut avoir lieu de la cellule apoptotique vers le phagocyte, et ce pour des cellules qui présentent une dégradation d'ADN importante^(126, 127). Ce phénomène reste néanmoins à démontrer *in vivo*.

D'autre part, il semble que le maintien dans l'organisme de cellules apoptotiques non phagocytées favorise l'apparition de maladies auto-immunes⁽¹²⁸⁾. Le noyau renferme des antigènes [généralement sous forme de complexes protéiques associés à l'ADN] qui sont de puissants immunogènes. Si le contenu du noyau se répand dans l'organisme, une réponse immunitaire contre des antigènes normalement non accessibles est mise en place, ce qui peut conduire à des phénomènes d'auto-immunité. Le rôle de la dégradation de l'ADN dans ce phénomène pourrait être de diminuer ce pouvoir immunogène, ou de circonscrire l'épanchement cellulaire. Néanmoins, certaines études suggèrent que le matériel nucléaire provenant de cellules apoptotiques est nettement plus immunogène que celui provenant de cellules vivantes. Mevorach *et al.* ont montré que l'injection de thymocytes syngéniques apoptotiques (radiations ionisantes) dans des souris saines (C3H-SnJ, BALB/c et C57BL/6) induit la production d'auto-anticorps antinucléaires⁽¹²⁹⁾. L'irradiation des thymocytes est une technique classique d'induction de fragments internucléosomiaux d'ADN. Dans cette étude il est également montré qu'un lysat total de thymocytes parfaitement viables (dont l'ADN n'est donc pas fragmenté) est nettement moins immunogène que les cellules apoptotiques. D'autre part, certaines formes de lupus résultent de défauts dans le processus d'élimination des cellules en apoptose⁽¹²⁸⁾. En fait, la dégradation même des constituants cellulaires lors de l'apoptose dévoilerait des épitopes cryptiques, normalement inaccessibles, et induirait l'activation des lymphocytes T auto-réactifs lorsque les débris cellulaires des cellules mortes ne sont pas rapidement phagocytés⁽¹³⁰⁾. Ceci pourrait en partie expliquer le faible pouvoir immunogène des

lysats de cellules non apoptotiques, qui ne présenteraient donc pas ces antigènes cryptiques. L'irradiation aux rayons γ de la souris ICAD-Sdm (dont l'apoptose se déroule en absence de fragmentation d'ADN) génère en peu de temps une grande quantité de thymocytes apoptotiques^[121]. Dans ces conditions, les auteurs montrent que les phagocytes ne suffisent plus à ingérer ce surnombre de cellules mortes. Une grande quantité de thymocytes ICAD-Sdm apoptotiques risquent de répandre leur contenu délétère dans le milieu extérieur. Il serait alors intéressant de comparer les taux d'auto anticorps produits dans des souris « normales » après transfert de thymocytes provenant de souris syngéniques irradiées, et « congéniques » pour ICAD-Sdm (ou CAD déficientes de même fond génétique), afin de déterminer si la dégradation d'ADN favorise ou non, dans ces conditions, l'apparition d'une réponse auto immune.

L'ensemble de ces travaux ne nous permettent pas de conclure que la dégradation d'ADN revêt une importance physiologique majeure. Cependant l'existence de divers agents moléculaires l'induisant, tels AIF, CAD et Endo-G ne peut être fortuite. Si les souris CAD knock-out sont parfaitement viables, l'inactivation du gène de AIF empêche tout simplement le développement embryonnaire^[131]. Toutefois, l'action de AIF pourrait ne pas se limiter à sa seule action sur le noyau^[125, 131].

Dans notre modèle, l'absence d'évènements nucléaires ne nuit pas à l'élimination des cellules tuées via CD47 (article II, fig.1C), impliquant que cette apoptose cytoplasmique est efficace. Afin d'écartier tout doute quant au caractère potentiellement nocif de l'ADN « intact » de cellules tuées via CD47, des études *in vivo* comparables à celles précédemment décrites pour les souris ICAD-Sdm sont nécessaires.

2. Les caspases : pas uniquement des tueuses

2.1. Absence d'activation des caspases dans l'apoptose

L'étude présentée ici révèle l'existence d'une nouvelle voie de signalisation de mort cellulaire où les caspases n'interviennent pas, initiée par l'engagement de la molécule CD47^(112,113). Nous verrons dans le paragraphe suivant que des travaux de plus en plus nombreux ont permis de mettre en évidence l'existence de voies concomitantes à celle de l'activation des caspases dans la mort cellulaire programmée. Dans notre étude nous décrivons un modèle de mort cellulaire efficace où les caspases ne sont jamais activées. Cette mort s'apparente morphologiquement à de l'apoptose, en l'absence d'évènements nucléaires. En effet, l'ecto-exposition des PS vers le milieu extracellulaire (flip-flop), le rétrécissement de la cellule et l'absence de rupture de la membrane plasmique sont des caractéristiques de l'apoptose et non de la nécrose (voir Introduction).

D'autres voies de signalisation de mort cellulaire programmée sans activation des caspases ont été rapportées dans la littérature. Les antigènes de surface tels que CD45⁽¹³²⁾, le CMH-I⁽¹³³⁻¹³⁵⁾, le CMH-II⁽¹³⁶⁾, CD2⁽¹³⁷⁾, CD4 et CXCR4⁽¹³⁷⁾, CD99⁽¹³⁸⁾ ou le BCR⁽¹³⁹⁾ peuvent induire un type de mort cellulaire très proche de l'apoptose classique, sans pour autant activer les caspases. De même, la forme oncogénique de Ras⁽¹⁴⁰⁾, la protéine adaptatrice Bin1⁽¹⁴¹⁾ et le stress oxydatif⁽¹⁴²⁾ provoquent une mort cellulaire programmée de ce type. Enfin, le programme d'élimination naturelle des plaquettes s'apparente à de l'apoptose et se déroule en l'absence de toute activation des caspases⁽⁴⁾.

Parmi ces travaux, peu d'entre eux font part d'événements exclusivement cytoplasmiques, puisque la plupart rapportent également l'observation d'événements nucléaires. Seuls les processus de mort cellulaire déclenchés par CD45⁽¹³²⁾, un épitope conformationnel du CMH de classe I⁽¹³⁵⁾, Ras⁽¹⁴⁰⁾ et CD99⁽¹³⁸⁾, ainsi que la mort naturelle des plaquettes⁽⁴⁾ sont morphologiquement très proches de la mort induite par l'engagement de CD47. Malgré la disparité des modèles, des points communs peuvent être mis en évidence. En effet, tous les antigènes doivent être engagés d'une façon précise pour induire ce type de mort cellulaire. Tout d'abord, CD45 et CD47 n'induisent la mort que s'ils sont agrégés par des anticorps immobilisés. Ensuite, seuls des anticorps reconnaissant des épitopes conformationnels de CD47⁽¹⁴³⁾, de CD99 et du CMH permettent ce type de signalisation mortelle. Il semble donc que la qualité du signal dépende de la conformation de la molécule. Par exemple, l'engagement du CMH peut déclencher trois types de mort cellulaire indépendante des caspases. Celles-ci varient en fonction du domaine et de l'épitope concerné⁽¹³³⁻¹³⁵⁾. Enfin, la mort induite par CD45 et CD47 nécessite la participation du cytosquelette^(113, 143, 144).

D'autre part, si bien les plaquettes mourantes⁽⁴⁾ que les cellules tuées via CD47⁽¹¹³⁾ sont éliminées par des phagocytes professionnels, indiquant que ce type de mort cellulaire est bien efficace.

Tel que souligné ci-dessus, il est donc probable que des mécanismes de mort cellulaire de type apoptotique mais complètement indépendants des caspases puissent prendre place dans un mécanisme normal de régulation de la mort cellulaire.

2.2. Coexistence de voies non dépendantes des caspases dans la mort cellulaire

L'identification de CED-3 chez *C. elegans* comme étant indispensable à son programme de mort cellulaire, suivie de la découverte de la famille grandissante des caspases chez les mammifères, ont pendant plusieurs années orienté les travaux des « apoptologistes » vers l'étude des voies activées par ces protéases. Nous avons vu précédemment que de nouvelles visions émergent, où la mort cellulaire programmée peut survenir sans la participation de ces « stars » de l'apoptose. De plus, un nombre conséquent de travaux rapportent que parallèlement aux voies caspases, des voies indépendantes et complémentaires peuvent être activées. Nous n'aborderons ici que quelques exemples illustrant ce phénomène.

2.2.1. Mort induite par les récepteurs de la famille des TNFRs

L'utilisation de l'inhibiteur à large spectre des caspases ZVAD-fmk et de cellules déficientes pour différentes caspases, a mis à jour l'existence de voies parallèles (concomitantes ou mutuellement exclusives?) à celles des caspases lors de la mort cellulaire induite par l'engagement des récepteurs de type TNFRs^[5, 47]. Le premier exemple est le TNF, dont l'action (apoptose ou nécrose) varie en fonction de sa cible. Le TNF induit la nécrose de manière indépendante des caspases, alors que ces mêmes caspases la bloquent. En effet, l'inhibition des caspases (par l'utilisation de ZVAD ou du CrmA) augmente la sensibilité des cellules à la nécrose induite par le TNF de plus de 1000 fois. Des résultats similaires sont obtenus dans la voie Fas^[145]. Parallèlement, une autre étude de la voie Fas rend compte de voies de signalisation

dont la dépendance aux caspases varie selon le type cellulaire⁽¹⁴⁶⁾ et met en évidence deux types de mort cellulaire apoptotique induite par l'engagement de Fas : Le type I, complètement indépendant de la mitochondrie et le type II qui fait intervenir Bid (voir Introduction). Enfin, dans des cellules Jurkat (hybridome T) déficiente pour la caspase 8, la multimérisation de FADD induit une mort de type nécrotique. Cette voie se fait en l'absence totale d'activation des caspases [initiatrices ou effectrices]⁽¹⁴⁷⁾. Une étude récente apporte un éclaircissement quant au fonctionnement de ces voies parallèles⁽⁴⁸⁾. Fas peut induire une mort cellulaire de type nécrotique en présence de ZVAD dans des lymphocytes T périphériques préalablement traités à la PHA et l'IL-2 pendant 72h. Dans ces conditions les auteurs montrent qu'après 3h d'induction, les caspases-2, -3, -7, -8, et -9, ne sont pas activées, le cyt. c n'est pas libéré dans le cytoplasme, et ni Bid ni PARP ne sont clivés. Cette signalisation de la mort cellulaire en l'absence des caspases dépend de la présence de la sérine-thréonine kinase RIP (*receptor-interacting protein*), puisque les cellules qui en sont déficientes sont résistantes à la mort induite par Fas en présence de ZVAD. Toutefois, pour le moment, le mode d'action de RIP n'est pas connu.

2.2.2. Autres voies

Dès 1995, Vasilakos et al. rapportent que la mort induite par la privation en IL-2 de la lignée murine CTLL-2 n'est pas affectée par la présence d'inhibiteurs des caspases⁽¹⁴⁸⁾. Une étude complémentaire dans cette lignée T, confirme que non seulement l'apoptose induite par la privation d'IL-2, mais aussi celle induite par la dexaméthasone et l'etoposide, ne sont pas bloquées par l'inhibiteur des caspases pan spécifique, ZVAD-fmk⁽¹⁴⁹⁾. D'autre part, la privation en IL-7 de thymocytes induit également leur mort cellulaire malgré la présence de ZVAD⁽¹⁵⁰⁾.

Un autre exemple est fourni par les travaux de Doerfler *et al.* sur la sélection thymique. Les auteurs ont généré une souris transgénique pour la protéine virale p35, un inhibiteur des caspases, de façon à ce que celle-ci soit sélectivement exprimée dans les thymocytes. Les auteurs ont ensuite étudié la sélection négative en croisant leurs souris avec des souris arborant un TCR transgénique permettant de suivre facilement le devenir des thymocytes⁽¹⁵¹⁾. La présence de p35 inhibe l'activation des caspases dans les thymocytes et confère une résistance à la mort spontanée et à celle induite via Fas et le TCR *in vitro*. Cependant la sélection négative (*in vivo*) n'est aucunement affectée par cet inhibiteur, indiquant que lors de ce processus, les caspases sont superflues. Il est intéressant de noter qu'une chute du potentiel membranaire est observé lors de cette sélection, suggérant que la mitochondrie participe à ce processus d'élimination.

Le site catalytique des caspases contient un résidu cystéine sujet aux oxydations⁽⁵⁾. Ceci implique que suivant l'état bioénergétique de la cellule (Stress oxydatif, libération de ROS), celle-ci peut être dans l'impossibilité d'activer les voies caspases « classiques » en présence de concentration élevée d'agent oxydant. La mort des cellules rétinienne en est une parfaite illustration. En effet, ces cellules meurent par un stress oxydatif. Celui-ci provoque une mort cellulaire présentant les caractéristiques de l'apoptose⁽¹⁴²⁾. Toutefois, les caspases sont inactivées par les espèces réactives à l'oxygène libérées dans ces cellules. Dans les Jurkat, un phénomène comparable peut être observé en présence de fortes concentrations d'H₂O₂ qui inhibent l'activation des caspases tout en induisant une mort cellulaire de type apoptotique⁽¹⁵²⁾. Enfin, la mort indépendante des caspases induite par l'agrégation de CD45 dans les thymocytes est également dépendante de la production de ROS⁽¹³²⁾. Celle-ci se caractérise par une chute du $\Delta\psi_m$ et la libération de ROS dans le cytoplasme. La neutralisation des ROS par un traitement des cellules avec le *N*-acetyl-L-cystéine (NAC) inhibe la mort induite par CD45 d'environ

modèle, il est possible que les ROS soient impliquées. En effet, nous avons observé une chute (1.7 fois moindre) du niveau d'activité basale de la caspase-3 suite à l'engagement de CD47 (M. Sarfati *et al.* résultats non publiés). Toutefois, nous n'avons pas examiné si CD47 entraîne la libération de ROS. À la lumière de ce qui précède, il serait donc intéressant de rechercher cette activité et de tester si le NAC, par exemple, inhibe et la mort cellulaire et/ou la chute de l'activité basale des caspases dans notre modèle.

2.3. Activation des caspases en l'absence de mort cellulaire

Nous avons vu dans l'introduction que la famille des caspases comprend des membres chez lesquels aucune implication dans la mort cellulaire n'a pu être mise en évidence (voir tableau I). De plus, les fonctions de nombre d'entre elles sont mal définies. Certaines, comme les caspase-1 et -11, présentent des activités éloignées de l'apoptose, puisqu'elles sont responsables de la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. D'ailleurs, leur expression est fortement induite par des agents bactériens comme le LPS⁽⁹⁰⁾.

Enfin, l'étude des effets de plusieurs caspases par la génération de souris knock-out* a apporté certaines surprises. Il semble que certaines caspases puissent participer au contrôle du cycle cellulaire⁽¹⁵³⁾ puisque leur absence entraîne des déficiences au niveau des processus de différenciation et/ou de développement cellulaire. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques issues de souris casp-8 négatives ont perdu leur capacité à former des colonies et produisent un nombre insuffisant de précurseurs thymiques⁽¹⁵³⁾. Certaines caspases semblent nécessaire à la signalisation proliférative des lymphocytes T^(154, 155). En effet, il a été

* voir note p. 13

été montré que des inhibiteurs des caspases comme IETD et ZVAD inhibent la prolifération de lymphocytes T humains induite par l'engagement du CD3, lorsque les inhibiteurs sont ajoutés le jour de la stimulation (dès le deuxième jour, ils n'ont plus d'effets). Cette stimulation anti-CD3 est potentialisée par l'ajout de FasL soluble^[155] et entraîne rapidement le clivage de la casp-8^[154, 155], indiquant que cette dernière puisse intervenir dans un processus de régulation du cycle cellulaire. Ultérieurement, les produits de clivage des casp-3, -6 et -7 apparaissent dans des PBMCs activés via le CD3 en présence l'IL-2, alors que certains signes de l'apoptose comme l'ecto-exposition des PS ne sont pas décelables dans ces cellules^[154]. L'ensemble de ces travaux suggère donc que les caspases (notamment la casp-8) peuvent intervenir dans le contrôle de la prolifération des cellules de la lignée hématopoïétique.

3. Implications physiologiques et régulation des fonctions de CD47 dans le système hématopoïétique

3.1. Implications dans la régulation de la mort cellulaire

Nous avons démontré que l'engagement de CD47 par la TSP induit la mort cellulaire des lymphocytes B de LLC. La TSP agit via CD47 puisque 1/ des anticorps monoclonaux dirigés contre CD47 et 2/ le peptide 4N1K correspondant au domaine de la TSP qui lie CD47, ont les mêmes effets mortels (article I, fig. 3d). Enfin, ce phénomène semble indépendant des intégrines $\alpha v \beta 3$ ^[112].

La TSP a été ultérieurement associée à la mort cellulaire dans deux autres systèmes. Premièrement, la TSP permet l'inhibition de l'angiogénèse, en induisant

l'apoptose des cellules endothéliales micro-vasculaires chez la Souris⁽¹⁵⁶⁾. Cette mort cellulaire diffère cependant radicalement de celle décrite dans notre étude puisque : 1/ elle nécessite l'engagement de la molécule CD36, un autre ligand de la TSP-1 ; 2/ elle fait intervenir la tyrosine-kinase (PTK) Fyn — dans notre système, la genestéine, un inhibiteur des PTKs, n'a pas d'effet sur la mort induite via CD47 (voir tableau III) ; 3/ les caspases sont activées.

Une seconde étude, chez l'Homme, effectuée dans les cellules endothéliales des veines ombilicales (HUVEC), établit que la TSP est impliquée dans la mort cellulaire⁽¹⁵⁷⁾. Les HUVEC possèdent la particularité de rentrer en apoptose en conditions de culture statique (lorsque plus aucune force ou flux hémodynamique ne leur est appliquée). Les auteurs montrent que cette mort cellulaire est induite par l'interaction de la TSP avec CD47 et les intégrines $\alpha\beta3$, conjointement. Contrairement au modèle décrit précédemment, CD36 n'est pas impliqué puisque les HUVEC n'en expriment pas. Le rétablissement du flux inhibe cette mort cellulaire et, les auteurs montrent que la TSP se fixe de manière identique aux HUVEC cultivées en conditions statiques ou soumises à une force hémodynamique. Ce n'est donc pas une absence d'interaction de la TSP avec les cellules qui explique leur insensibilité à la mort dans ces conditions. En fait, la disparition quasi totale de CD47 à la surface des HUVEC cultivées en conditions dynamiques pourrait expliquer cette insensibilité à la TSP, puisque l'expression des intégrines $\alpha\beta3$ reste inchangée⁽¹⁵⁷⁾. La modulation de l'expression de CD47 semble donc être l'élément régulateur de la mort cellulaire des HUVEC en condition statique.

Chez le rat, lors de l'involution du follicule de Graaf après ovulation, et lors de l'involution des glandes mammaires après sevrage (deux phénomènes physiologiques qui s'accompagnent d'un taux de mort cellulaire important), les niveaux d'ARNm de CD47 sont soudainement augmentés dans ces deux tissus⁽¹⁵⁸⁾. Chez l'Homme, il est montré que les protéines CD47 et TSP sont exprimées de

TABLEAU III. Liste des inhibiteurs testés et leurs effets sur la mort induite par l'engagement de CD47

INHIBITEURS	CIBLES	EFFETS
<i>Inhibiteurs de protéases</i>		
ZVAD-fmk	Toutes les caspases Calpaïne	Pas d'effet
TPCK	Sérines et Cystéine protéases	Pas d'effet à faibles doses Toxique pour les B de LLC
TLCK	Sérines et Cystéine protéases	Pas d'effet
<i>Signalisation</i>		
Wortmanine	PI3K	Pas d'effet
Génestéine	PTKs	Pas d'effet
Rottlérine	PKC δ	Pas d'effet
Toxine Pertussique	Protéines Gi/Go	Pas d'effet
Calphostin C	PKCs	Toxique à faibles et fortes doses pour les B de LLC. Non interprétable à doses moyennes non toxiques.
EDTA	Chélateur d'ions divalents (Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺)	Pas d'effet
EGTA	Chélateur d'ions divalents (Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺)	Pas d'effet
<i>Mitochondrie</i>		
Antimycine	Complexe III de la chaîne respiratoire	Inhibition de l'exposition de PS et du rétrécissement cellulaire. Pas d'effet sur le $\Delta\Psi_m$
Oligomycine	ATPases FO/F1	Pas d'effet
Cyclosporine A + Ac. Aristolochic	Cyclophiline D Phospholipase A-2	Pas d'effet
Ac. Bongrekic	Adénine nucléotide translocase	Pas d'effet
<i>Membranes et cytosquelette</i>		
Methyl-β-cyclodextrine	RAFT (Déplétion en cholestérol)	Pas d'effet
Cytochalasine D	F-actine	Inhibition de l'exposition de PS et du rétrécissement cellulaire. Inhibition de la chute du $\Delta\Psi_m$

façon conjointe dans les cellules granuleuses et lutéales ovariennes⁽¹⁵⁹⁾. Ces deux observations, mises à la lumière de ce qui précède, nous invitent à nous interroger sur le rôle éventuel que pourrait jouer le couple CD47/TSP dans l'involution tissulaire de ces glandes.

L'ensemble de ces travaux contribue à étayer l'hypothèse que l'interaction de CD47 avec la TSP joue probablement un rôle non négligeable dans le contrôle de la mort cellulaire chez les mammifères.

Le deuxième ligand de CD47, SIRP- α , manifeste une distribution tissulaire beaucoup plus restreinte. Contrairement à CD47 qui est ubiquitaire et à la TSP qui est présente dans de nombreuses matrices extracellulaires et existe sous forme circulante, SIRP- α est principalement exprimé sur les neurones et les cellules de la lignée myélocytaire.

Nous avons testé si l'engagement de CD47 par SIRP- α induisait la mort cellulaire. Dans ce but, nous avons mis en contact des B de LLC et des cellules fibroblastiques murine (cellule L) transfectées ou non avec l'ADNc du *sirp- α* humain⁽¹⁶⁰⁾. Aucune différence de viabilité n'a été observé entre les B de LLC cultivés en présence de L-SIRP ou de cellules L contrôles [V.Mateo *et al.* résultats non publiés]. L'engagement de CD47 par un SIRP- α exprimé à la surface de cellule L se rapproche des conditions physiologiques normales. Cependant dans certaines situations, la présence de CD47 sur la même cellule que SIRP- α s'avère nécessaire aux fonctions de ce dernier. En effet, seuls les macrophages qui expriment CD47 sont capables d'éliminer les globules rouges déficients en CD47. De ce fait, les souris CD47^{-/-} ne présentent pas d'anémie hémolytique, bien que SIRP- α soit exprimé à des niveaux comparables sur les macrophages de souris normales ou CD47^{-/-}⁽¹⁶¹⁾. Dans notre système, les cellules L expriment du CD47 murin. Or le CD47 murin ne lie pas le SIRP- α humain⁽¹⁶⁰⁾. On peut donc supposer que le SIRP- α

exprimé sur les cellules L ne soit pas dans une conformation fonctionnelle optimale pour interagir avec le CD47 humain. À l'inverse, on peut penser que comme CD47 possède au moins deux ligands distincts, ceux-ci déclenchent des fonctions distinctes^(97, 98). Il est donc probable que SIRP- α ne puisse induire la mort cellulaire.

Quand une protéine ubiquitaire a plus d'un ligand, on peut aisément supposer que ces différentes molécules aient des effets contrastés. En effet, comment une molécule omniprésente comme CD47 peut-elle exercer des fonctions aussi nombreuses que variées, sinon en interagissant avec des ligands à distribution tissulaire contrôlée, en s'associant à différents partenaires moléculaires ($\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$...), et en modulant sa propre expression ? CD47 dispose toutefois d'une quatrième faculté de variation et adopte des conformations spatiales variables. Quatre anticorps conformationnels de CD47 ont été décrits à ce jour. Il s'agit de 10G2^(90, 103), d'Ad22⁽¹⁴³⁾ et des anticorps MEM-120 et MEM-133⁽¹⁰²⁾. Néanmoins on ignore si ces anticorps reconnaissent des épitopes différents. Toutefois, MEM-120 et MEM-133 semblent posséder des spécificités distinctes. En effet, la fixation de MEM-120 (et non celle de MEM-133) sur des PBMCs est potentialisée par un cinquième anticorps (conformationnel ?), HI172⁽¹⁰²⁾.

Nous montrons dans l'article II que les cellules du sang ont une susceptibilité variée à la mort induite par CD47, et ce, indépendamment de son niveau d'expression membranaire⁽¹¹³⁾. Cependant, nous avons pu établir une relation entre une modulation de l'épitope 10G2 sur les cellules T activées, et une baisse de sensibilité à CD47. En effet, les lymphocytes T activés via le CD3 sont nettement moins sensibles à l'engagement de CD47 par B6H12 immobilisé, un anticorps anti-CD47 non conformationnel (article II, fig. 2B). Parallèlement, l'épitope 10G2 est fortement diminué sur les T activés (M. Sarfati *et al.* résultats non publiés). À l'inverse, Pettersen *et al.* montrent que l'engagement de l'épitope conformationnel Ad22 (par l'anticorps Ad22 sous forme soluble mais non sous forme immobilisée) induit la

mort cellulaire de la lignée Jurkat et des PBMC activés via le CD3. D'autre part, l'anticorps 1F7 soluble, dirigé contre un épitope proche de celui reconnu par B6H12, présente une toxicité non négligeable^[143]. Enfin, nous avons observé que l'anticorps 2D3, qui reconnaît un épitope très éloigné de B6H12 et de 1F7, tue les B de LLC quand il est immobilisé sur plastique. Sous forme soluble ou présenté par des anticorps secondaires immobilisés, il n'a aucun effet [V. Mateo *et al.*, observations personnelles], alors que B6H12 tue également lorsqu'il est présenté par des anticorps secondaire (article I, fig. 3e). Au vu de ces données, il semble donc que la manière dont CD47 est engagé détermine la qualité et l'amplitude du signal mortel reçu.

L'ensemble de ces travaux suggère que la mort cellulaire induite via CD47 est en partie contrôlée par divers mécanismes de régulation de l'expression de CD47.

3.2. Signalisation dans la mort induite via CD47

3.2.1. Implication du cytosquelette

Dans notre étude, nous avons observé que la mort cellulaire induite par l'engagement de CD47 s'accompagne d'un remaniement du cytosquelette. En effet, la majorité des cellules qui y sont sensibles s'attachent fortement aux anticorps dirigés contre CD47 immobilisés sur plastique et s'étalent fréquemment [*spreading*]. Dans certains cas, les cellules adoptent même une forme de fuseau (article I, fig. 6 ; article II, fig. 4C; et observations non publiées). Ces considérations nous ont amenés à nous interroger sur l'implication du cytosquelette dans la signalisation de la mort cellulaire via CD47. Nous avons donc testé l'effet d'un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, la cytochalasine-D, dans notre modèle. La mort cellulaire n'est plus observée en sa présence (article II, fig. 6A), ce qui suggère

fortement que l'activité mortelle de CD47 nécessite l'intégration des signaux par le cytosquelette.

D'autres travaux ont précédemment montré un lien entre la signalisation de CD47 et le cytosquelette^[143, 163-165]. Tout d'abord, chez la souris, deux nouvelles molécules s'associant aux domaines cytoplasmiques des isoformes 2 et 4 de CD47 ont été clonées. Il s'agit de PLIC-1 et de PLIC-2 (PLIC: *protein linking IAP and cytoskeleton*)^[163]. Ces protéines permettraient de relier les filaments intermédiaires de vimentine à la membrane plasmique par l'intermédiaire de CD47. Lorsque transfectées dans les cellules Jurkat et OV10 (voir article II,), les molécules PLICs renforcent le spreading* dépendant de CD47. Dans notre modèle, nous démontrons que l'isoforme 1 de CD47 induit des niveaux d'apoptose comparables à ceux qui sont induits par l'isoforme 2 (article II, fig. 4). Wu *et al.* ont cloné les PLICs par la technique de double hybride en utilisant les domaines cytoplasmiques des isoformes 2 et 4 de CD47 comme « appâts ». Nous ne savons donc pas si les PLICs peuvent s'associer à la l'isoforme 1. L'affinité des PLICs pour CD47 augmente avec la taille du domaine cytoplasmique de ce dernier, puisque les PLICs ont une affinité nettement plus grande pour la forme 4 que pour la forme 2. L'implication de molécules homologues humaines de PLICs dans notre modèle ne peut être exclue. Cependant, il faut noter que le domaine cytoplasmique de l'isoforme 1 est constitué de seulement trois acides aminés, ce qui laisse supposer que les PLICs ne s'y associent pas.

Chez l'Homme, l'engagement de CD47 par des anticorps (B6H12) immobilisés sur plastique induit la polymérisation de la F-actine et la translocation de la PKC- θ à la membrane plasmique dans les cellules Jurkat^[165]. Ces événements nécessitent conjointement les domaines IgV et 5TMS de CD47, ainsi qu'une localisation de CD47 dans les RAFTs. Dans notre système, les domaines IgV et 5TMS sont

* Cf. note p. 13

également nécessaires (article II, fig.4b) alors que la localisation de CD47 dans les RAFTs ne semble pas requise. En effet, la désorganisation de ces microdomaines par l'utilisation du méthyl- β -cyclodextran (un agent qui extrait le cholestérol des membranes et de ce fait déstructure les RAFTs) n'inhibe pas l'action mortelle de CD47 dans les B de LLC (V. Mateo *et al.* résultats non publiés et voir tableau III). Enfin, l'implication de la PKC- θ n'a pu être démontrée, faute d'inhibiteur spécifique (voir chap. suivant).

Dans les cellules B, les travaux de Yoshida *et al.* ont montré que lors du spreading induit par l'agrégation de l'antigène CD47, la réorganisation de la F-actine fait intervenir la Rho GTPase Cdc42⁽¹⁶⁴⁾. Seul l'anticorps immobilisé B6H12, et non 2D3, permet ce phénomène, ce qui est à mettre en parallèle avec ce que nous observons (voir Chap. précédent). Cdc42 induit la polymérisation de l'actine via la protéine WASP (*Wilskot-Aldrich syndrome protein*). En effet, Cdc42 agit en levant l'auto-inhibition de WASP qui peut alors s'associer au complexe Arp2/3, ce qui rend alors possible l'incorporation de monomères G-actine aux polymères F-actine⁽¹⁶⁶⁾. Afin de confirmer l'implication du cytosquelette dans la signalisation mortelle de CD47, nous avons testé des PBMCs issus de patients atteints du syndrome de Wilskot-Aldrich (WAS). Ces malades présentent diverses mutations au niveau du gène *WASP* conduisant à la production de protéines WASP non fonctionnelles. Nous avons observé que les PBMCs issus de trois patients WAS (dont les mutations identifiées conduisent à des WASP ne pouvant lier Cdc42) restent insensibles à la mort induite par l'agrégation de l'antigène CD47, alors que celui-ci est fortement exprimé sur ces cellules (article II, fig. 6B-D). Ces résultats suggèrent donc que Cdc42 est impliqué dans la mort via CD47. Des études complémentaires avec des dominants négatifs de Cdc42 et des inhibiteurs spécifiques seront nécessaires pour confirmer ce résultat. Notons que l'expression forcée d'une forme active de Cdc42 induit la mort cellulaire par apoptose des cellules Jurkat⁽¹⁶⁷⁾,

suggérant en effet que cette GTPase joue un rôle dans notre système. Plusieurs autres hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer l'insensibilité des PBMC de patients WAS à la mort cellulaire induite par CD47. On peut fort bien imaginer que dans les cellules issues de WAS, chez qui les fonctions du cytosquelette sont défectueuses, la conformation de l'antigène CD47 ne soit pas adéquate. Son association avec des partenaires moléculaires non identifiés nécessaires à la signalisation mortelle peut également être altérée.

L'ensemble de ces observations suggèrent très fortement qu'un remaniement du cytosquelette est nécessaire à la signalisation mortelle de CD47 dans notre modèle. Parallèlement, les effets de l'anticorps conformationnel Ad22 (voir Chap. précédent) sont également inhibés par la cytochalasine-D^[143]. Ceci illustre d'une façon plus générale l'implication du cytosquelette dans la mort induite via CD47.

3.2.2. Les PKC, la mort cellulaire et CD47

Nous avons vu précédemment que CD47 induit la translocation de la PKC- θ à la membrane plasmique de l'hybridome T Jurkat, et ceci, dans des conditions de culture similaires à celles qui sont nécessaires à induire la mort cellulaire dans notre système. Parallèlement, nous avons observé que l'activation des PKCs par le PMA (phorbol myristate acétate) augmentait la sensibilité des Jurkats à la mort induite par l'engagement de CD47 de façon significative (article II). Nous avons donc cherché à mettre en évidence une éventuelle implication des PKCs dans notre système.

Les PKCs appartiennent à une famille de 12 isoenzymes, classées en trois familles selon leur exigence en co-facteurs : 1/ les PKCs classiques (α , β I, β II et γ) sont dépendantes du Ca^{++} et activées par les PS et le diacylglycérol (DAG), 2/ les

nouvelles PKCs (δ , ϵ , η , θ et μ) qui diffèrent des premières par leur indépendance au Ca^{++} , et 3/ les PKCs atypiques (ζ et ι/λ) activées par les PS uniquement⁽¹⁶⁸⁾. La PKC- θ a une très forte homologie avec la PKC- δ . Il n'existe à ce jour aucun inhibiteur spécifique de la PKC- θ , bien que la Rottlerine puisse être parfois employée à cet effet [A. Altman, communication personnelle].

Nous avons testé l'effet de deux inhibiteurs de PKCs, la Calphostine et la Rottlerine sur la mort induite via CD47 dans les lymphocytes B de LLC. La Rottlerine est un inhibiteur spécifique à certaines isoformes de la nouvelle famille des PKCs, avec une prédilection pour l'isoforme δ ($\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$), mais un très faible pouvoir sur la PKC- θ . La Calphostine, quant à elle, est un inhibiteur à plus large spectre, puisqu'elle rentre en compétition avec les sites de liaisons au DAG et aux esters de phorbol. La mort induite via CD47 dans les B de LLC n'est pas inhibée par des concentrations de Rottlerine allant de 5 à 20 μM [article II, fig. 5C]. Ces résultats nous permettent d'exclure la participation de la PKC- δ , mais non celle des autres isoformes, puisque des concentrations supérieures à 30 μM sont nécessaires pour les inhiber. Malheureusement ces fortes doses sont toxiques dans notre système. Pour les mêmes raisons, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'éventuelle participation d'autres PKCs par l'utilisation de la Calphostine. En effet, celle-ci est hautement toxique pour les lymphocytes, et ce même à des concentrations extrêmement faibles (0,5 μM). Néanmoins, la participation des PKCs classiques, dont l'activation dépend du calcium est contestable. En effet, nous avons testé l'effet de chélateurs d'ions divalent tels l'EDTA et l'EGTA sur la mort cellulaire via CD47. Ceux-ci n'ont aucun effet inhibiteur [V. Mateo *et al.* résultats non publiés et voir Tableau III], suggérant que les PKC α , β I, β II et γ ne sont pas impliquées.

La PKC- θ a une distribution cellulaire essentiellement restreinte aux muscles squelettiques et aux cellules de la lignée hématopoïétique⁽¹⁶⁹⁾. Cependant, ni les lymphocytes B normaux, ni les cellules de la lignée U937 ne semblent en

exprimer⁽¹⁷⁰⁾. Nous montrons que CD47 induit la mort cellulaire dans ces deux types cellulaires [article II, fig.2B et fig.3]. La participation de la PKC- θ dans la mort via CD47 y en est donc exclue. Toutefois ces résultats n'écartent pas le fait que d'autres isoformes puissent être nécessaires, puisque l'expression des PKCs dépend non seulement du type cellulaire examiné, mais aussi de son stade de différenciation et d'activation. Ceci peut expliquer l'existence de rapports contradictoires quant au rôle des PKCs dans la mort cellulaire. En effet, les PKCs sont impliquées à divers niveaux dans les processus apoptotiques⁽¹⁷¹⁻¹⁷⁷⁾. Lors de l'apoptose, ces enzymes peuvent être clivées par les caspases, avec pour conséquence leur activation^(171, 172, 174) ou l'inverse⁽¹⁷⁶⁾. La PKC- δ permet par exemple d'activer une scramblase conduisant à l'ecto-exposition des PS sur la membrane des cellules mourantes⁽¹⁷⁴⁾. Dans un autre système, son inactivation entraîne l'inhibition du clivage de la caspase-3⁽¹⁷⁶⁾. Enfin, Gomez-Angelats *et al.* proposent un modèle où l'activation des PKCs protège de l'apoptose induite par Fas dans les Jurkat. Les auteurs montrent que la régulation du volume cellulaire dépendant du flux potassique est contrôlée par les PKCs dans ces cellules lors de l'apoptose⁽¹⁷⁷⁾.

3.2.3. L'efflux potassique

Le rétrécissement cellulaire survenant lors de l'apoptose (*shrinkage*) résulte essentiellement de la régulation de flux ioniques, et notamment d'efflux potassiques et sodiques^(178, 179). Nous avons montré que lors de la mort cellulaire induite par CD47 ce phénomène de diminution du volume cellulaire dépendait en partie d'un efflux potassique [voir article II, fig.5]. Ces observations soulèvent cependant une controverse. En effet, les travaux de J. Cidlowski montrent que la diminution du volume provoquée par un efflux potassique est essentielle à l'activation des caspases et des endonucléases. De plus, le rétablissement d'une concentration

normale de K^+ dans le cytosol inhibe l'activation des ces enzymes^(179, 180). La mort cellulaire (activation des caspases, fragmentation d'ADN...) n'a donc plus lieu si l'on empêche les mécanismes de régulation du volume cellulaire de se produire⁽¹⁸¹⁾. Nous n'observons aucune activité hydrolase lors de la mort induite via CD47, alors qu'un efflux potassique semble cependant avoir lieu. Manifestement, dans notre modèle, aucun lien entre les caspases ou les Dnases et l'efflux potassique n'existe. D'autre part, un lien entre l'efflux potassique et la diminution du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) peut être établi⁽¹⁸⁰⁻¹⁸²⁾. Nonobstant, les relations de causalité entre ces évènements sont contradictoires. Alors que Bortner *et al.* et Maeno *et al.* montrent que l'efflux potassique précède la diminution du $\Delta\psi_m$ et la libération du cyt. c, respectivement, Dallaporta *et al.* observent un phénomène inverse, dans des systèmes très proches. Dans notre modèle, nous observons un ralentissement parallèle de l'exposition des PS, de la diminution du volume cellulaire et de la chute du $\Delta\psi_m$ dans les cellules tuées via CD47 en présence d'une concentration potassique extracellulaire élevée (V Mateo *et al.* observations non publiées-). Une étude cinétique approfondie nous permettrait de définir les relations de cause à effet entre ces divers phénomènes lors de la mort cellulaire induite par l'agrégation de CD47. Finalement, un autre mécanisme de régulation du volume cellulaire doit intervenir ici puisque nous ne sommes pas entièrement parvenus à inhiber la mort cellulaire par le blocage du flux potassique.

3.2.4. La perte du potentiel membranaire mitochondrial : cause ou conséquence de la mort cellulaire induite via CD47

Nous avons montré que la mort cellulaire induite via CD47 s'accompagne d'un gonflement important des mitochondries [article I, fig.7e-g] et d'une perméabilité mitochondriale membranaire (PMM) accrue, telle que mesurée indirectement par

un marquage au 3,3'-dihexyloxycarbocyanine (DiOC), une sonde cationique lipophile qui permet de visualiser une perte de $\Delta\psi_m$ (article II, fig.1A).

Le $\Delta\psi_m$ est créé par un gradient électrochimique entre les membranes internes et externes des mitochondries. Ce gradient permet la diffusion de protons à travers les membranes, aboutissant finalement à la production d'ATP grâce à la phosphorylation oxydative. La chute du $\Delta\psi_m$ est un événement précoce de l'apoptose. Il est le reflet d'une soudaine perméabilité membranaire mitochondriale, permettant, dans la plupart des cas, la libération de facteurs apoptogènes nécessaires à la signalisation de l'apoptose (voir Introduction, Chap. 1.2.3.3. et fig. 4). Les protéines proapoptotiques de la famille de Bcl-2 peuvent l'induire, en provoquant diverses transformations des membranes mitochondriales plus ou moins reliées les unes aux autres. Celles-ci incluent 1/l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTPC : permeability transition pore complex), complexe multiprotéique qui forme alors un pore non spécifique permettant la diffusion passive des solutés et le découplage de la chaîne respiratoire ; 2/la fermeture de la porine ou VDAC (voltage dependent anion channel), qui provoque l'accumulation de protons dans la mitochondrie ; 3/la formation de pores lipidiques par déstabilisation des lipides membranaires ; 4/la création de canaux par homo ou hétéro oligomérisation des membres de la famille de Bcl-2 entre eux ou avec d'autres molécules mitochondriales. La plupart de ces événements conduisent à un gonflement de la mitochondrie et font suite à une perte de l'équilibre électrochimique provoquée par des échanges non spécifiques entre le cytosol et les compartiments mitochondriaux^[6, 38]. Ce gonflement peut éventuellement conduire à la rupture des membranes mitochondriales.

Nous avons cherché à mettre en évidence l'implication d'un des principaux mécanismes responsables la chute du $\Delta\psi_m$ lors de l'engagement de CD47. Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de certaines des protéines qui

forment le PTPC, dont l'utilisation permet d'inhiber la chute du $\Delta\psi_m$ et la libération conséquente du cyt. c (et donc l'apoptose) dans de nombreux systèmes^[6, 39]. Ni la Cyclosporine A (5 μM) combinée avec l'acide Aristolochic (50 μM), ni l'acide Bongkreic (50 μM), qui ciblent respectivement la cyclophiline D, la phospholipase-A2 et le translocateur de nucléotides à adénine (ANT), n'ont d'effets sur la mort induite via CD47 dans les B de LLC et les cellules U937 [V Mateo *et al.*, résultats non publiés]. L'exposition des PS, la chute du $\Delta\psi_m$ et la diminution du volume cellulaire y sont toujours observées. Ces résultats nous permettent de conclure que ni le PTPC, ni l'ANT ne participent à la mise en place de la PMM dans notre système.

Deux agents qui ciblent la mitochondrie, l'oligomycine et l'antimycine A, sont alternativement employés pour induire ou bloquer certains événements de l'apoptose, selon le type cellulaire étudié et le signal induit. Notamment, ces deux toxines inhibent spécifiquement l'ecto-exposition des PS, mais non la fragmentation d'ADN et la chute du $\Delta\psi_m$, dans deux modèles différents^[114, 189]. Nous montrons que, dans notre système, l'antimycine A inhibe la translocation des PS ainsi que la diminution de volume cellulaire dans les B de LLC et les cellules U937, alors que la chute du $\Delta\psi_m$ n'est pas bloquée [article II, fig. 5B et V. Mateo, observations personnelles]. Néanmoins, nous ne sommes jamais parvenus à obtenir des résultats comparables par l'utilisation d'oligomycine (voir Fig. 6 et V. Mateo, observations personnelles). L'action de l'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire) et de l'oligomycine (inhibiteur de l'ATPase FO/F1) induisent des « catastrophes » bioénergétiques comparables qui aboutissent finalement à une chute des concentrations cytosoliques en oxygène et en ATP, et à la production de ROS. Nous observons une potentialisation de la chute du $\Delta\psi_m$ dans les cellules traitées avec ces deux agents (voir Fig. 6), alors que seule l'antimycine A inhibe l'ecto-exposition des PS et la diminution du volume cellulaire induites par CD47.

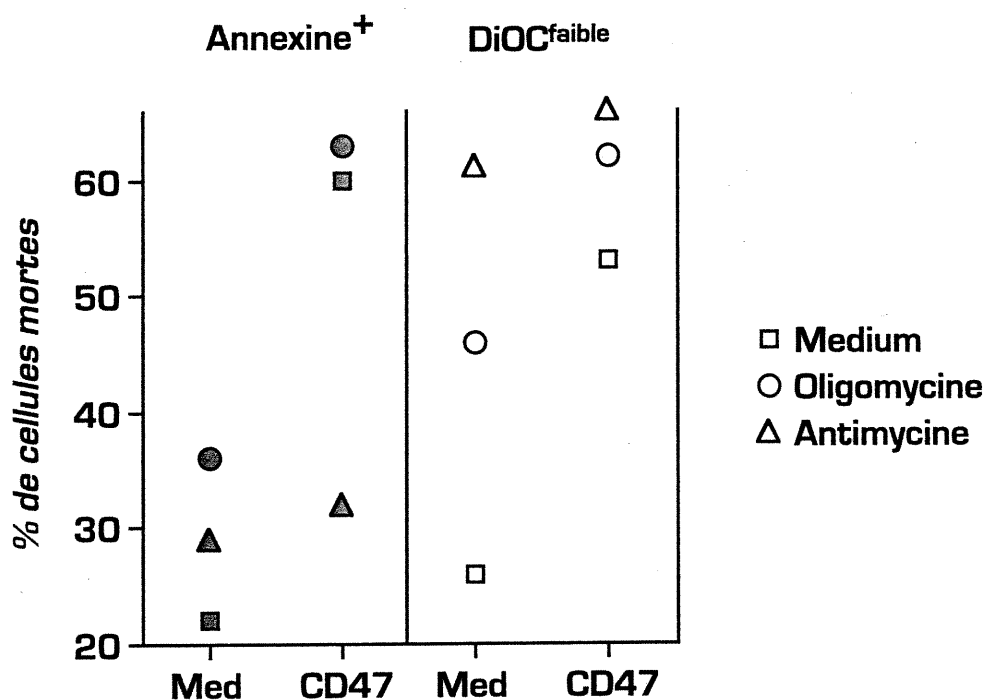


Figure 6 : Effets comparés de deux inhibiteurs mitochondriaux sur la mort induite via CD47.

Les lymphocytes B de LLC sont cultivés 3 h à 37 °C en plaques de 96 puits préincubées (CD47) ou non (Med) avec 2,5 µg/ml d'anticorps monoclonaux dirigés contre CD47, en présence d'antimycine (40 µM) et d'oligomycine (100 µM). Les cellules sont préincubées 15 min avec les inhibiteurs avant d'être déposées dans les puits. Les pourcentages de cellules mortes sont mesurés par double marquage Annexin-V-FITC/PI (formes plaines) ou par marquage au DiOC₆ (formes vides) et visualisés en cytométrie de flux.

Récemment, une nouvelle cible de l'antimycine A a été identifiée, ce qui permettrait d'expliquer en partie les différences que nous observons⁽¹⁸⁴⁾. En effet, Tzung *et al.* montrent que l'antimycine A simule le domaine BH3 des protéines de la famille Bcl-2 et interagit directement avec la niche hydrophobe de Bcl-2. De fait, dans des cellules qui sur-expriment les protéines Bcl-xL (ou Bcl-2), l'antimycine A, mais non l'oligomycine, induit l'apoptose par un mécanisme antagonique aux effets protecteurs de ces protéines. Toutefois, cette toxine provoque une baisse des concentrations d'oxygène et d'ATP intracellulaire et la production de ROS et cela de façon équivalente dans les cellules exprimant peu (insensibles à l'antimycine) ou beaucoup (hypersensibles à l'antimycine) de Bcl-xL⁽¹⁸⁴⁾, excluant l'implication de ces phénomènes bioénergétiques dans la mort observée.

Au vu de nos résultats, et à la lumière de ce qui précède, nous pouvons élaborer l'hypothèse suivante : l'exposition des PS et la diminution du volume cellulaire observées dans les cellules traitées par des anti-CD47 sont indépendantes de la PMM. L'action de l'antimycine A résulterait plutôt de sa faculté à interagir avec des domaines BH3 des molécules de la famille Bcl-2. Dans notre cas, au lieu d'un effet antagoniste sur des membres anti-apoptotiques, l'antimycine A bloquerait l'action des protéines pro-apoptotiques de cette famille - qui contiennent toutes un domaine BH3. Puisque la mort induite par CD47 dépend également d'un remaniement du cytosquelette, les protéines pro-apoptotiques qui y sont associées telles que Bim, Bmf⁽¹⁸⁵⁾ pourraient y participer.

Dans le cas de Bax, il a été montré que son action indépendante des caspases (non inhibable par la présence de z-VAD) nécessite la présence de son domaine BH3⁽¹⁸⁶⁾. De plus, Bax est impliqué dans un type de mort apoptotique exclusivement cytoplasmique (diminution du volume cellulaire et ecto-exposition des PS) où les caspases ne sont pas activées⁽⁴⁾. Cependant, la mort induite par Bax est inhibée par

l'oligomycine et l'antimycine A⁽¹⁸⁷⁾, indiquant que ce n'est probablement pas la cible de l'antimycine A dans notre modèle.

Finalement, nos résultats n'excluent pas la possible libération de facteurs mitochondriaux apoptogènes tels que AIF, l'endoG ou le cyt. *c*. Comme nous l'avons mentionné auparavant, le gonflement mitochondrial observé laisse supposer qu'au moins la membrane externe est rompue. D'autre part, la libération du cyt. *c* par exemple, ou celle de AIF peuvent précéder l'apparition d'une chute de $\Delta\psi_m$, indiquant que les premières puissent être indépendantes de la deuxième^(49, 188). Cependant, ces événements sont inhibés par la protéine Bcl-2. Nous avons testé plus d'une cinquantaine de patients LLC différents depuis le début de ce projet de recherche, et tous sont sensibles à la mort induite par l'engagement de CD47 (voir Article I, fig. 2b et V. Mateo *et al.*, résultats non publiés). Or, rappelons que 70 % des B de LLC expriment des niveaux protéiques de Bcl-2 anormalement élevés, comparables à ceux résultant d'une translocation t(14:18) qui place *Bcl-2* sous le puissant contrôle de l'enhancer* des Ig. De plus, aucune modulation de l'expression de Bcl-2 ou de modification post-transductionnelle (phosphorylation) ne sont observées dans les LLC suite à la mise en contact avec des anti-CD47 immobilisées (V. Mateo *et al.*, résultats non publiés). Ceci suggère que Bcl-2 n'est pas la cible impliquée dans la chute du PPM dans notre système, et que si AIF et le cyt. *c* sont libérés, Bcl-2 ne peut bloquer cette libération. Enfin, les molécules Bid et Bik induisent la libération du cyt. *c* sans chute de $\Delta\psi_m$ ⁽¹⁸⁷⁾. Cette libération n'est inhibé ni par la CsA ni par l'acide Bongkreic, ni par des chélateur de Ca⁺, impliquant que cette libération soit indépendante de l'ouverture des PTPC. De façon similaire, aucun de ces inhibiteurs ne bloquent la mort cellulaire induite par CD47 dans notre système (voir Tableau III).

* Cf. note p. 13

En conclusion, l'exposition des PS, tout comme la diminution du volume cellulaire, semblent être des événements indépendants de la PMM dans la mort induite via CD47. Si le *cyt. c* et AIF sont en effet libérés suite au gonflement mitochondrial, des facteurs cytosoliques non identifiés inhibent leur action ou bien manquent à leur activation, puisque ni les caspases, ni les endonucléases ne sont activées et qu'aucune condensation nucléaire n'est observée. Par exemple, l'Hsp27 inhibe l'action du *cyt. c* cytosolique en se fixant à celui-ci, empêchant ainsi la formation de l'apoptosome⁽¹⁸⁹⁾. L'Hsp70 quant à elle peut intervenir à divers niveaux au cours du processus d'apoptose, et notamment inhiber elle aussi la formation du complexe Apaf-1/Casp-9⁽¹⁹⁰⁾. Cependant, l'Hsp-70 inhibe aussi bien l'apoptose dépendant des caspases que celle qui en est indépendante, notamment en bloquant la chute du $\Delta\psi_m$ dans les cellules Jurkat⁽¹⁵²⁾. En dernier lieu, il a été montré que l'induction de la PMM et la libération conséquente de *cyt. c* ne suffisaient pas à eux seuls à induire l'apoptose dans des cellules leucémique humaines⁽¹⁹¹⁾. D'autre part, les ROS, possiblement libérées dans notre système, peuvent induire des phénomènes apoptotiques semblables aux nôtres, tout en inhibant les caspases^(142, 152). Ceci doit également être pris en considération dans notre modèle et éclairci par des dosages de ROS dans des cellules traitées aux Ac anti-CD47. Enfin, l'antimycine A cible un ou des mécanismes de régulation de l'ecto-exposition des PS et de la diminution du volume cellulaire, et ce, probablement en dehors des effets bioénergétiques communs à ceux engendrés par l'oligomycine.

3.3. Implications lors de l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes professionnels

3.3.1. Généralités et bases moléculaires de la reconnaissance des cellules en apoptose.

Au sein d'un tissu, les cellules en apoptose sont rapidement éliminées par hétérophagie. Ce processus met en jeu les cellules saines avoisinantes au cœur du tissu, et les phagocytes professionnels l'infiltrant, tels les macrophages et les cellules dendritiques immatures. Ces dernières permettent d'établir un lien entre l'immunité naturelle et l'immunité acquise. Il est communément admis que, contrairement à la nécrose qui s'accompagne toujours d'une réponse inflammatoire, les cellules apoptotiques sont généralement phagocytées en absence d'inflammation, et ceci pour deux raisons principales. Tout d'abord les cellules mourantes émettent très tôt des signaux permettant leur phagocytose, les « *eat-me signals* », alors que le déroulement du processus d'apoptose est à peine initié, et que la cellule est quasiment intacte. De cette façon, rien de la cellule morte potentiellement pro-inflammatoire et immunogène ne peut se répandre dans le milieu extracellulaire. En second lieu, les cellules apoptotiques elles-mêmes transmettent des signaux immunomodulateurs aux phagocytes qui les ingèrent¹⁹² et peuvent parfois même sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β ^{194, 195}. Ces signaux de communications bidirectionnelles sont encore mal définis. Diverses molécules participant à la reconnaissance et/ou la phagocytose des cellules mortes ont été impliquées dans ce processus d'élimination « silencieuse ». Cependant, les PS semblent jouer un rôle central dans ce processus.

De nombreux travaux ont démontré la nécessité des PS dans la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques par divers phagocytes¹⁹⁶. Dernièrement le

récepteur des PS spécialement impliqué dans l'élimination des cellules mourantes a été identifié⁽¹⁹⁷⁾. Enfin, dans un travail récent, Fadok *et al.* montrent que la seule présence des PS à la surface externe de la membrane plasmique suffit à engendrer l'élimination des cellules apoptotiques⁽¹⁹⁸⁾. L'ajout artificiel de PS dans la membrane plasmique externe de cellules qui n'ont reçu aucun signal apoptotique suffit à susciter leur phagocytose. Cette observation est cependant surprenante. En effet, s'il est généralement admis que les PS jouent un rôle primordial dans l'élimination des cellules mourantes, de nombreuses autres molécules, sur le phagocyte et sur la proie sont impliquées dans ce processus d'élimination⁽¹⁹⁹⁻²⁰¹⁾. De plus, les modifications membranaires engendrées lors de la mort cellulaire programmée, et dont l'ecto-exposition des PS ne représente qu'un aspect, permettent en fait l'apparition de nouveaux sites de reconnaissance (comme des sucres) pour les phagocytes^(199, 202). De ce fait, une étude récente de Hirt *et al.* montre que dans des conditions particulières de mort cellulaire, les cellules sont phagocytées en absence d'ecto-exposition des PS⁽¹⁸³⁾. Ceci implique que l'absence de PS peut être compensée par d'autres signaux de reconnaissance présents sur les cellules en apoptose. À ce propos, un nouveau récepteur impliqué dans la phagocytose de cellules en apoptose, MER, a été identifié récemment⁽²⁰³⁾. Des mutations de MER chez la Souris ont pour conséquences l'apparition de maladies auto immunes, indiquant que ce système de reconnaissance indépendant des PS revêt une importance physiologique non négligeable.

3.3.2. CD47 et la phagocytose

Nous montrons que l'engagement de CD47 par la TSP induit l'ecto-exposition des PS sur les lymphocytes B de LLC [article I, fig.2a]. De plus, les cellules tuées par

l'engagement de CD47 sont efficacement phagocytées par des iDCs (article II, fig.1C).

Il a été clairement établi que lorsqu'une cellule apoptotique est éliminée, la TSP permet de « ponter » la cellule mourante au phagocyte. La TSP se lie d'une part aux intégrines $\alpha\beta3$ et à la molécule CD36 sur le phagocyte, et d'autre part, à la cellule mourante au travers d'un ou des ligand(s) qui reste(nt) à être identifié(s)⁽¹⁹⁹⁾. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la TSP est trimérique, et chaque monomère contient deux motifs peptidiques qui lient spécifiquement la molécule CD47. Dans l'absolu, la TSP peut donc fixer six molécules de CD47. De ce fait, nous proposons que CD47 puisse être une des contre-structure qui lie la TSP sur la cellule apoptotique lors de la rencontre phagocyte/cellule apoptotique. Ainsi, on peut imaginer que l'engagement du CD47 permettrait la mise en place d'une boucle amplificatrice de l'exposition des PS sur la cellule mourante. Cependant, cette liaison hypothétique ne doit pas présenter un caractère primordial pour la reconnaissance et l'ingestion des cellules en apoptose par les iDCs et les macrophages^(204, 205). En effet, le traitement de cellules B de LLC apoptotiques par des anticorps B6H12 solubles n'inhibent pas leur phagocytose par des iDCs (article III, fig.8B). Parallèlement, ces même anticorps ne bloquent pas la reconnaissance de neutrophiles et de lymphocytes apoptotiques par des macrophages⁽²⁰⁵⁾. On peut également envisager que la TSP se fixe aussi (et en même temps ?) au CD47 du phagocyte, renforçant ainsi le lien phagocyte/cellule mourante. Il a été montré que lors de la phagocytose de cellules apoptotiques, le phagocyte doit également présenter une perte d'asymétrie membranaire et conséquemment exposer ses PS⁽²⁰⁶⁾. L'engagement du CD47 du phagocyte par la TSP pourrait contribuer à cette perte d'asymétrie phospholipidique.

Enfin, très récemment il a été montré que CD47 participe à la régulation de la phagocytose des érythrocytes via la particule opsonisante iC3b du complément⁽²⁰⁷⁾.

Or, le récepteur au complément CR3, qui reconnaît préférentiellement iC3b, joue également un rôle important dans l'élimination des cellules en apoptose par les macrophages⁽²⁰⁸⁾. Il serait donc possible que CD47 soit aussi impliqué dans ce dernier processus.

3.4. Implications dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire

En l'absence de toutes données expérimentales, la participation de CD47 dans la régulation des phénomènes de reconnaissance et d'ingestion des cellules apoptotiques est pour le moment du domaine de l'hypothèse et reste à être examinée. Néanmoins, certaines observations suggèrent que cette hypothèse est peut-être plausible. Ainsi, le récepteur aux PS et la molécule CD36 rentrent dans le processus anti-inflammatoire mis en place lors de l'ingestion de cellules en apoptose. Notamment, l'engagement de ces récepteurs par leur ligand induit la production de TGF- β (une cytokine immunosuppressive et anti-inflammatoire) et la suppression consécutive de la production de cytokines pro-inflammatoires (tels le TNF- α)^(192, 193, 197). Nous allons voir dans ce chapitre que CD47 est aussi impliqué dans la régulation de processus anti-inflammatoires. Ceux-ci pourraient éventuellement intervenir lors du contact phagocyte/cellule apoptotique.

Nous montrons que l'engagement de CD47 par des anticorps solubles inhibe la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-12, TNF- α et GM-CSF par des cellules dendritiques immatures (iDC) stimulées par SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan / strain) [article III, fig. 2]. Cette suppression dépend de l'engagement exclusif de CD47 puisque le peptide 4N1K module également la production de l'IL-12 et du TNF- α . De plus, CD47 prévient la maturation phénotypique et fonctionnelle des iDCs [article III, fig. 5, 6 et 8].

Les cellules dendritiques immatures sont, avec les macrophages, parmi les phagocytes professionnels les plus efficaces dans l'élimination des cellules apoptotiques. De plus, les iDCs sont d'excellentes APCs en devenir. On comprend donc qu'en absence de danger (ce qui est l'état le plus fréquent !) il faille mettre en place de puissants mécanismes de modulation de la réponse antigénique lors de la rencontre d'une cellule phagocytaire et d'une cellule sénéscente. Nous avons abordé dans le chapitre précédent les quelques mécanismes décrits pouvant intervenir dans ce processus. Sur la cellule phagocytaire, l'engagement de CD36 (par la TSP ?) et du récepteur aux PS (par les PS nouvellement exposés sur la cellule phagocytée) induit la production de TGF- β , une puissante cytokine anti-proliférative et anti-inflammatoire. De plus, le TGF- β est activé par la TSP⁽²⁰⁹⁾. Dans notre modèle, la modulation de la production de cytokines ne dépendait pas d'une production accrue de TGF- β , mais plutôt d'une inhibition directe (article III, fig. 2). Nous proposons donc que l'engagement de CD47 par la TSP lors de l'élimination des cellules apoptotiques puisse représenter un mécanisme complémentaire d'immunomodulation à ceux mis en jeu par CD36 et le récepteur aux PS, d'une part, par la suppression directe de la sécrétion de cytokines inflammatoires, et d'autre part, en inhibant le pouvoir de présentation antigénique des cellules dendritiques. Parallèlement, dans une autre étude, nous avons examiné les effets de CD47 sur son autre ligand, le récepteur SIRP- α dans les cellules dendritiques. La liaison de CD47 au SIRP- α des cellules dendritiques inhibe leur réponse à l'IL-12, leur production de cytokines (IL-6, IL-10, IL-12 et TNF- α), tout comme leur maturation phénotypique et fonctionnelle⁽¹⁶⁰⁾. Là encore de puissants mécanismes immunomodulateurs sont mis en place. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les paires de molécules TSP/CD47 et CD47/SIRP- α interviennent dans le rétro-contrôle négatif de la réponse inflammatoire.

Les cellules dendritiques immatures sont, avec les macrophages, parmi les phagocytes professionnels les plus efficaces dans l'élimination des cellules apoptotiques. De plus, les iDCs sont d'excellentes APCs en devenir. On comprend donc qu'en absence de danger (ce qui est l'état le plus fréquent !) il faille mettre en place de puissants mécanismes de modulation de la réponse antigénique lors de la rencontre d'une cellule phagocytaire et d'une cellule sénéscente. Nous avons abordé dans le chapitre précédent les quelques mécanismes décrits pouvant intervenir dans ce processus. Sur la cellule phagocytaire, l'engagement de CD36 (par la TSP ?) et du récepteur aux PS (par les PS nouvellement exposés sur la cellule phagocytée) induit la production de TGF- β , une puissante cytokine anti-proliférative et anti-inflammatoire. De plus, le TGF- β est activé par la TSP⁽²⁰⁹⁾. Dans notre modèle, la modulation de la production de cytokines ne dépendait pas d'une production accrue de TGF- β , mais plutôt d'une inhibition directe (article III, fig. 2). Nous proposons donc que l'engagement de CD47 par la TSP lors de l'élimination des cellules apoptotiques puisse représenter un mécanisme complémentaire d'immunomodulation à ceux mis en jeu par CD36 et le récepteur aux PS, d'une part, par la suppression directe de la sécrétion de cytokines inflammatoires, et d'autre part, en inhibant le pouvoir de présentation antigénique des cellules dendritiques. Parallèlement, dans une autre étude, nous avons examiné les effets de CD47 sur son autre ligand, le récepteur SIRP- α dans les cellules dendritiques. La liaison de CD47 au SIRP- α des cellules dendritiques inhibe leur réponse à l'IL-12, leur production de cytokines (IL-6, IL-10, IL-12 et TNF- α), tout comme leur maturation phénotypique et fonctionnelle⁽¹⁶⁰⁾. Là encore de puissants mécanismes immunomodulateurs sont mis en place. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les paires de molécules TSP/CD47 et CD47/SIRP- α interviennent dans le rétro-contrôle négatif de la réponse inflammatoire.

CD47 est impliqué dans plusieurs autres mécanismes immunomodulateurs. Il a été montré que l'engagement de CD47 sur des monocytes (par des Ac., la TSP ou le peptide 4N1K) inhibe sélectivement leur sécrétion d'IL-12, et ce indépendamment de la production de TGF- β ⁽²¹⁰⁾. Parallèlement, l'engagement de CD47 sur des lymphocytes T naïfs stimulés en présence d'IL-12 inhibe leur production d'IL-2 et leur développement conséquent en effecteurs de type Th1. Le développement Th2 n'est pas affecté par l'engagement de CD47⁽²¹¹⁾. En l'absence de cytokines exogènes, la stimulation de lymphocytes T naïfs en présence d'Ac. dirigés contre CD47 induit leur anergie⁽²¹²⁾. Enfin, deux études montrent que CD47 donne un signal de non-agression aux phagocytes professionnels, probablement via SIRP- α . En effet, en absence d'expression de CD47 à leur surface, des érythrocytes⁽¹⁶¹⁾ [et voir Introduction], des lymphocytes T et des cellules de la moelle osseuse⁽²¹³⁾ issus de souris CD47 knock-out sont rapidement éliminés par phagocytose lorsque ces cellules sont transférées dans des souris syngéniques⁽¹⁶¹⁾ et/ou allogéniques⁽²¹³⁾ sauvages.

L'ensemble de ces résultats montrent que CD47 agit comme immunomodulateur dans différents modèles de réponse immunitaire innée et acquise. De plus, SIRP- α semble fonctionner sur le même principe et former avec CD47 un couple moléculaire à signalisation négative bidirectionnelle. Dans le système immunitaire, l'expression de SIRP- α est restreinte au compartiment myéloïde alors que CD47 est omniprésent. L'engagement de SIRP- α par CD47 donne un signal négatif aux macrophages et aux iDCs^(160, 161), alors que CD47 inhibe le développement des lymphocytes T naïfs en effecteurs Th1/Th0^(211, 212). Récemment, la caractérisation des molécules CD200-CD200R a permis de mettre en évidence un système comparable de frein immunitaire sur les macrophages⁽²¹⁴⁾. CD200R n'est exprimé que sur la lignée myéloïde (tout comme SIRP- α) alors que son ligand est plus largement présent (comme CD47). L'engagement de CD200R sur les

macrophages par CD200 permettrait le maintien d'un état de non-activation de ceux-ci. Chez les souris CD200R knock-out, les réactions inflammatoires sont exacerbées et l'apparition d'arthrite induite par le collagène est rendue possible.

Enfin, il est intéressant de noter que les intégrines $\alpha v/\beta 3$ [qui sont physiquement et fonctionnellement associées à CD47 dans le récepteur à la vitronectine] et gp49B1 [qui est exclusivement exprimé sur les mastocytes, les macrophages et les cellules NK], forment également un couple de molécules immunomodulatrices qui agit sur l'activation des mastocytes⁽²¹⁵⁾.

CD47/SIRP- α représentent donc des membres d'une famille grandissante de couples moléculaires qui permettent le maintien d'un état d'activation réprimée, nécessaire à l'équilibre fonctionnel du système immunitaire⁽²¹⁶⁾.

4. Conclusion générale

4.1. Thérapeutique dans la LLC

Au cours de ce travail de recherche, les B de LLC d'une cohorte de plus de cinquante patients ont été testés quant à leur sensibilité à la mort induite via CD47. Bien que d'intensité variable, la mort cellulaire est toujours observée [article I, fig 2b et V. Mateo *et al.*, résultats non publiés]. Parmi les patients testés, certains étaient résistants à l'HC *in vitro*. De plus, au cours de cette étude, les B de LLC d'un des patients de notre cohorte (patient "B") a présenté une soudaine résistance *in vitro* à l'hydrocortisone (HC). Cependant, ces mêmes cellules sont restées sensibles à la mort induite par CD47. Le même jour, les B de LLC du patient "C" pris comme témoin positif, répondent parfaitement à l'HC et à CD47 [Fig. 7]. CD47 semble donc être un candidat potentiel pour le traitement des patients qui développent des résistances aux agents cytotoxiques. Une étude récente rapporte d'ailleurs que les

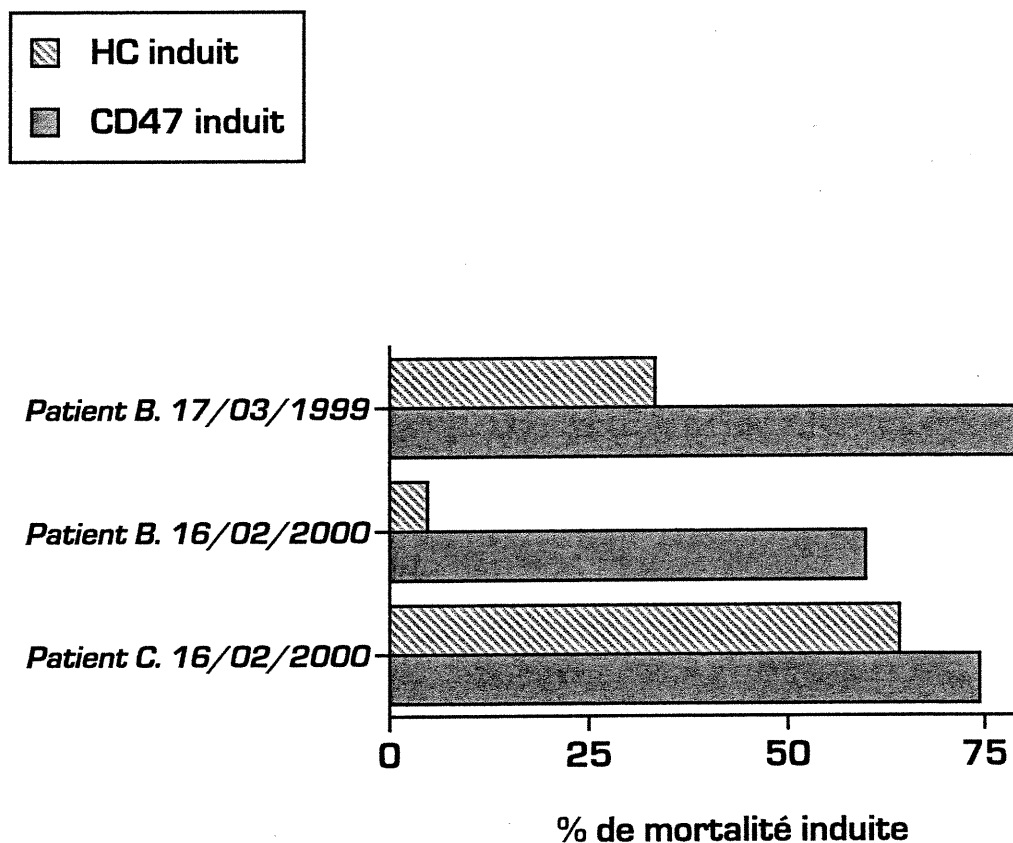


Figure 7: Conversion du patient "B". Les B de LLC du patient "B" maintiennent leur sensibilité à CD47, alors que ces cellules sont devenues résistantes à l'hydrocortisone (HC) *in vitro* entre 1999 et 2000. Les B de LLC sont cultivées 18h à 37 °C dans le milieu synthétique HB10 seul, ou en présence d'HC ($5.10^{-4}M$) ou d'Ac. anti-CD47 préalablement immobilisés. La mort cellulaire est mesurée par un double marquage Annexin-V-FITC/PI et les cellules analysées par cytométrie de flux. Les % d'induction sont calculés comme décrit dans l'article II.

tumeurs qui ont développé un phénotype MDR (*multi-drug resistant*) et qui sont donc résistantes à la cytotoxicité de nombreuses drogues, présentent des résistance à la mort cellulaire apoptotique « classique » (dépendante de l'activation des caspases) mais restent sensibles à la mort indépendante des caspases⁽²¹⁷⁾.

D'autre part, nous avons montré que les B de LLC sont les cellules les plus sensibles à CD47 (64% de mort induite), comparées par exemple aux lymphocytes B (36 %) et T (49 %) normaux, alors que les cellules souches de la lignée hématopoïétique CD34⁺ sont totalement résistantes, tout comme les IDCs (article II, fig.2). Tous ces éléments nous permettent de conjecturer sur l'élaboration d'un traitement pour cette maladie pratiquement incurable. En effet, la plupart des thérapeutiques anti LLC ne parviennent pas à guérir les malades qui finissent souvent par devenir résistants aux agents cytotoxiques employés. CD47 possède le rare avantage d'induire la mort cellulaire chez tous les patients testés.

Des essais cliniques d'immunothérapies dans la LLC ont été entrepris avec un succès variable, notamment avec le Rituximab (anti-CD20) et Campath-1 (anti-CD52). Envisager une immunothérapie anti-CD47 pose le problème essentiel de l'omniprésence de cette molécule. La molécule CD52 est elle aussi largement exprimée (néanmoins dans des proportions moindres), et d'ailleurs le traitement avec Campath-1 élimine sans discrimination toutes les cellules mononuclées du sang. Néanmoins, le nombre de B de LLC est tellement supérieur à celui des cellules normales dans le sang, que lors d'un tel traitement, proportionnellement peu de lymphocytes normaux risquent d'être éliminés. Cependant, on peut aussi envisager de générer des anticorps bi-spécifiques anti-CD47-CD20, par exemple, et ne cibler ainsi que les lymphocytes B. L'avantage par rapport au Rituximab serait de générer un signal de mort supplémentaire. Enfin, l'étude et la compréhension des mécanismes sous jacents à la voie de signalisation mortelle de CD47 nous apporteront peut-être le moyen d'induire une telle mort autrement qu'avec des

anticorps.

4.2. Synthèses

4.2.1. Signalisation de la mort cellulaire induite par CD47.

L'antigène CD47 induit une nouvelle forme de mort cellulaire lorsque celui-ci est engagé par les anticorps monoclonaux dirigés contre deux épitopes éloignés de CD47 (B6H12 et 2D3), la TSP ou le peptide 4N1K immobilisés. Cet engagement conduit à un remaniement du cytosquelette nécessaire au signal mortel, probablement via une signalisation passant par une voie dépendante de Cdc42/WASP (voir fig. 8). Cette mort cellulaire efficace se traduit par un rétrécissement de la cellule, l'exposition des PS vers le feuillet externe de la membrane plasmique, une chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et un gonflement de la mitochondrie. Tous ces événements sont inhibés lorsque la polymérisation de l'actine n'est pas possible. Il s'avère cependant que les phénomènes de rétrécissement cellulaire et d'ecto-exposition des PS soient dissociables des événements mitochondriaux, puisque l'antimycine A n'inhibe que les premiers. De plus, l'action inhibitrice de l'antimycine A semble indépendante des effets bioénergétiques qu'elle induit et partage avec l'oligomycine, et pourrait donc cibler une protéine de la famille Bcl-2 à domaine BH3 unique associée au cytosquelette, telles Bim, Bmf ou restant à identifier. La régulation du volume cellulaire et l'exposition des PS engendrées par l'engagement de CD47 dépendent aussi partiellement d'un efflux potassique et l'hypothétique activité scramblase responsable de l'exposition des PS est indépendante de la PKC- δ . Enfin, la libération de protéines mitochondriales est fort probable, puisque les mitochondries sont exagérément gonflées. Cependant aucune activité caspase ou endonucléase n'est

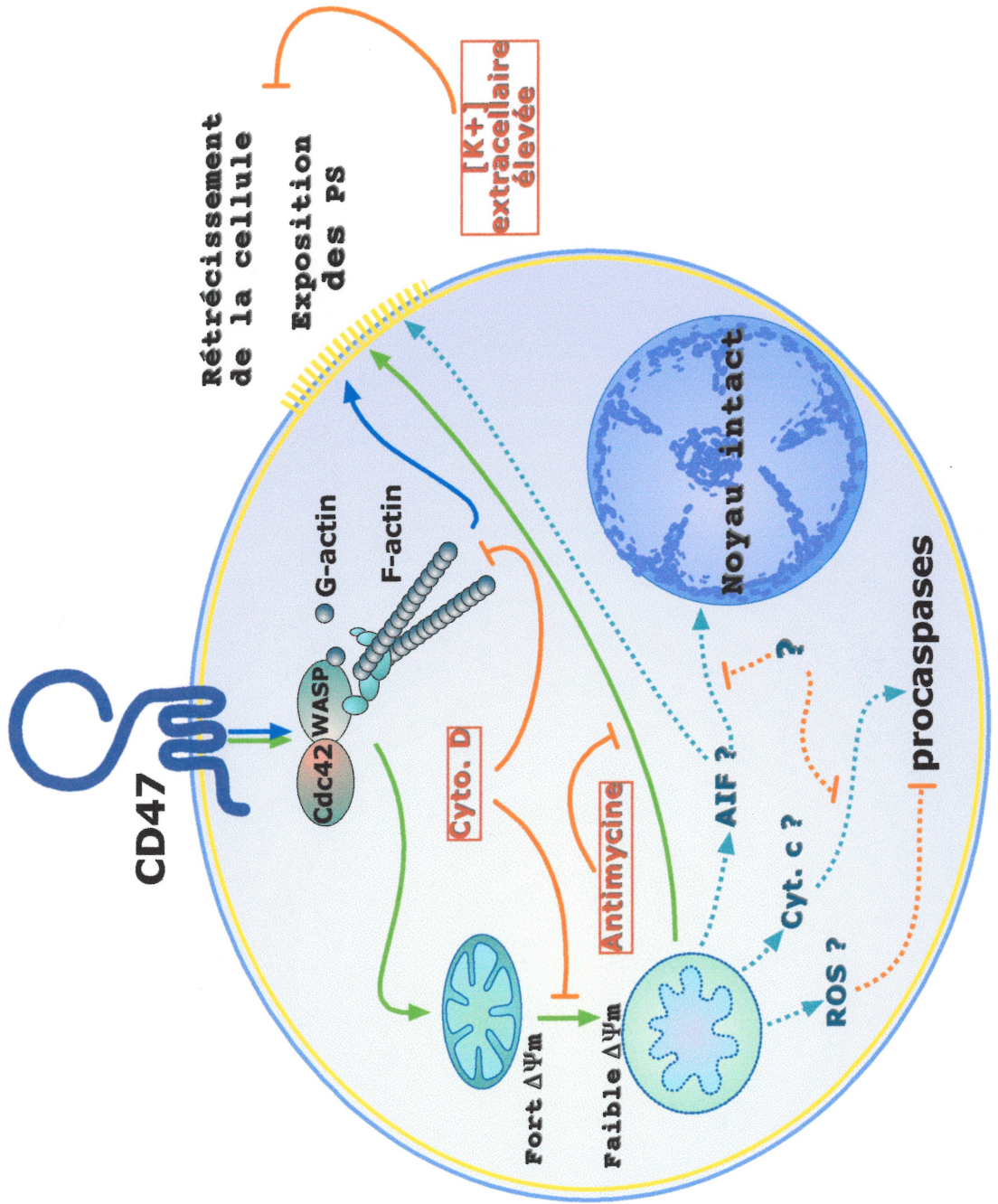


Figure 8: Signalisation de la mort cellulaire par l'engagement de CD47. Une ou deux voies de signalisations sont envisagées. La première voie (flèches vertes) implique des événements qui se déroulent de façon séquentielle. Une voie supplémentaire (flèches bleues) envisage des événements concomitants, où les événements mitochondriaux n'interfèrent pas. En oranges sont représentés les facteurs qui inhibent totalement ou en partie la signalisation CD47. L'hypothétique libération de facteurs mitochondriaux est représentée par des flèches hachurées turquoise, leurs voies d'inhibition par des flèches hachurées oranges. L'implication de WASP et de Cdc42 reste à démontrer.

détectée lors de la mort induite via CD47. Si le cytochrome c et AIF sont présents dans le cytoplasme, leur activité n'est pas décelable. Soit des facteurs supplémentaires sont nécessaires à leur activité, soit ils sont inhibés par des molécules cytosoliques tels Hsp27 ou Hsp70.

4.2.2. Immunomodulation via CD47

L'engagement de CD47 par la TSP sur des cellules dendritiques immatures inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et la maturation des DCs. Parallèlement, l'engagement de SIRP- α par CD47 produit des effets comparables. Lors de la rencontre d'une iDC et d'une cellule en apoptose, nous proposons que la TSP, qui forme un pont moléculaire en se liant au CD36 et aux intégrines $\alpha\beta 3$ du phagocyte, se lie à la cellule apoptotique via CD47. En même temps, le CD47 exprimé sur les cellules phagocytées engage le SIRP- α du phagocyte (voir fig. 9). Ainsi, une communication bidirectionnelle est établie au travers de CD47, qui d'un côté supprime la maturation des cellules dendritiques par deux voies de signalisation parallèles (l'engagement de SIRP- α et de CD47), et de l'autre, amplifie le système de reconnaissance via les récepteurs aux PS en exacerbant l'exposition des PS sur la cellule mourante. De plus, ceci contribue également à amplifier la signalisation anti-inflammatoire puisque l'engagement des récepteurs aux PS induit la sécrétion de TGF- β .

Enfin, CD47 induit une mort cellulaire efficace puisque les cellules tuées par son agrégation sont éliminées par des phagocytes professionnels tels les iDCs. Il pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle de l'homéostasie des cellules de la lignée hématopoïétique, tels les lymphocytes B et T.

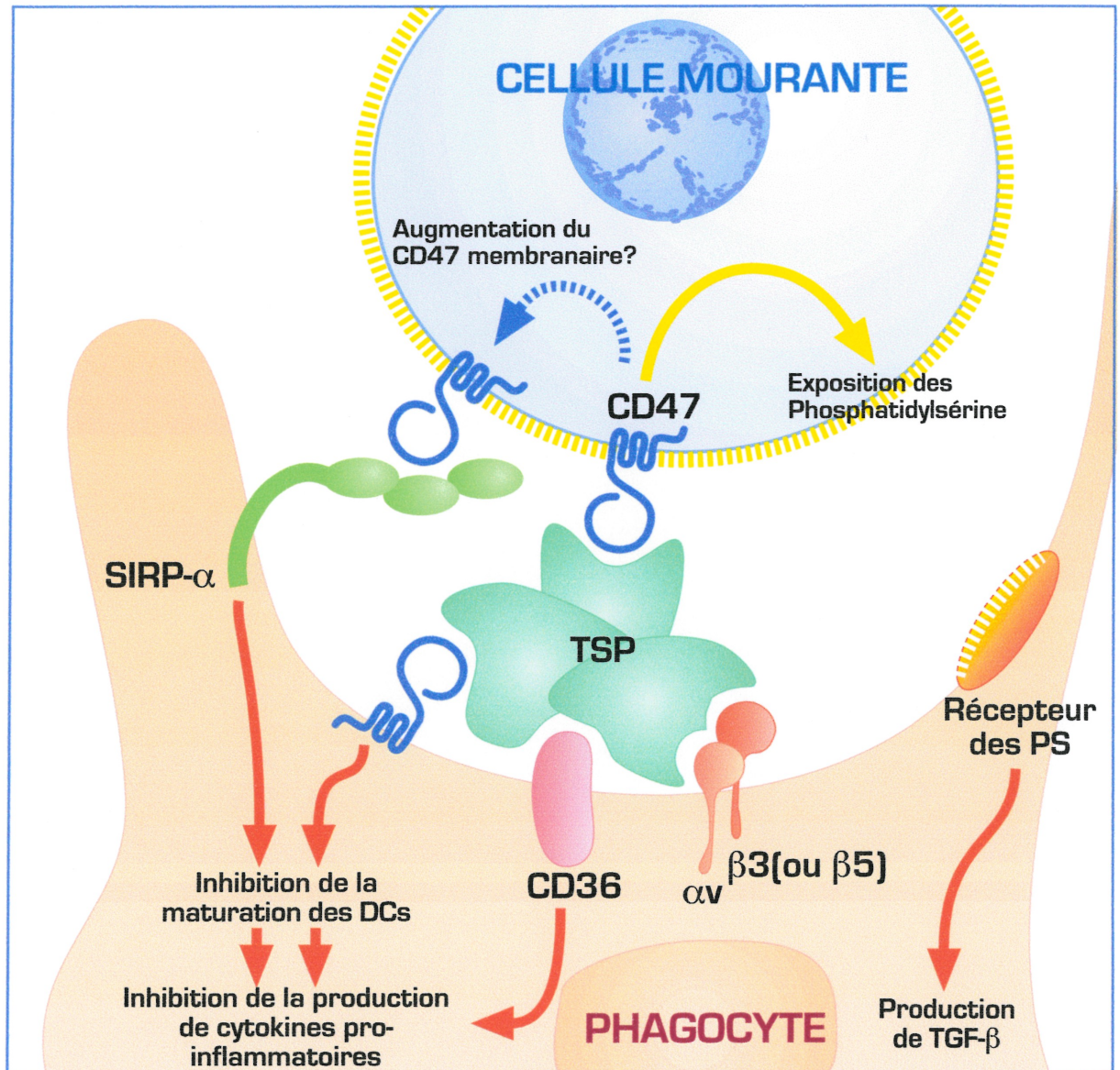


Figure 9: Possibles implications de CD47 et de ses ligands lors de la rencontre d'un phagocyte professionnel et d'une cellule mourante. La forme trimérique de la thrombospondine-1 (TSP) lui permet de lier en théorie six molécules de CD47 (deux par monomères). La liaison de la TSP à CD36 et CD47 du phagocyte donne un signal inhibiteur de la maturation et de la production de cytokines pro-inflammatoires. La liaison de CD47 à SIRP- α engendre des effets immunomodulateurs comparables.

La TSP induit ou exacerbe l'exposition des PS en se liant au CD47 de la cellule mourante. La stimulation du récepteur aux phosphatidylsérines engendre la production de TGF- β , cytokine anti-inflammatoire. L'expression membranaire de CD47 pourrait être augmentée lors de la mort cellulaire, produisant une boucle amplificatrice immunorégulatrice.

BIBLIOGRAPHIE

1. Vaux, D. L., and S. J. Korsmeyer. "Cell death in development." *Cell* (1999), 96:245-254
2. Kitanaka, C., and Y. Kuchino. "Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology". *Cell Death Differ* (1999). 6:508-515.
3. Nicotera, P., M. Leist, and E. Ferrando-May. "Apoptosis and necrosis: different execution of the same death". *Biochem Soc Symp* (1999). 66:69-73.
4. Brown, S. B., M. C. Clarke, L. Magowan, H. Sanderson, and J. Savill. "Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program". *J Biol Chem* (2000). 275:5987-5996.
5. Denecker, G., D. Vercammen, and P. Vandenabeele. "Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors". *Cell Mol Life Sci* (2001). 58:356-370
6. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon. "The mitochondrial death/life regulation in apoptosis and necrosis". *Annu Rev Physiol* (1998). 60:619-642
7. Leist, M., and M. Jäättelä. "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms". *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001). 2:1-10
8. Majno, G., and I. Joris. "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death". *Am J Pathol* (1995). 146:3-15.
9. Jacobson, M. D., M. Weil, and M. C. Raff. "Programmed cell death in animal development". *Cell* (1997). 88:347-354.
10. Hedgecock, E. M., J. E. Sulston, and J. N. Thomson. "Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*". *Science* (1983). 220:1277-1279.
11. Ellis, R. E., J. Y. Yuan, and H. R. Horvitz. "Mechanisms and functions of cell death". *Annu Rev Cell Biol* (1991). 7:663-698.
12. Thompson, C. B. "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease". *Science* (1995). 267:1456-1462.
13. Yuan, J., and B. A. Yankner. "Apoptosis in the nervous system". *Nature* (2000). 407:802-809
14. Reed, J. C. "Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance". *Hematol Oncol Clin North Am* (1995). 9:451-473.
15. Fadeel, B., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky. "Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?" *Biochem Biophys Res Commun* (1999). 266:699-717.
16. Nicholson, D. W. "From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents". *Nature* (2000). 407:810-816.
17. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br J Cancer* (1972). 26:239-257.
18. Strasser, A., L. O'Connor, and V. M. Dixit. "Apoptosis signaling". *Annu Rev Biochem* (2000). 69:217-245.
19. Ranger, A. M., B. A. Malynn, and S. J. Korsmeyer. "Mouse models of cell death". *Nat Genet* (2001). 28:113-118.
20. Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik. "Caspases: enemies within. [Review] [50 refs]". *Science* (1998). 281:1312-1316
21. Wolf, B. B., and D. R. Green. "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases". *J Biol Chem* (1999). 274:20049-20052.
22. Hengartner, M. O. "The biochemistry of apoptosis". *Nature* (2000). 407:770-776.
23. Stroh, C., and O. K. Schulze. "Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates [editorial]. [Review] [52 refs]". *Cell Death & Differentiation* (1998). 5:997-1000

24. Rathmell, J. C., and C. B. Thompson. "The central effectors of cell death in the immune system". *Annu Rev Immunol* (1999). 17:781-828.
25. Utz, P. J., and P. Anderson. "Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules". *Cell Death Differ* (2000). 7:589-602.
26. Leverrier, Y., and A. J. Ridley. "Apoptosis: caspase orchestrate the ROCK 'n' bleb". *Nat cell biology* (2001). 3:E91-E93
27. Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD". *Nature* (1998). 391:43-50
28. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis". *Nature* (1998). 3391:96-99
29. Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria". *Nature* (2001). 412:95-99
30. Los, M., S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff. "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice". *Immunity* (1999). 10:629-639.
31. Zheng, T. S., and R. A. Flavell. "Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice". *Exp Cell Res* (2000). 256:67-73.
32. Wang, J., and M. J. Lenardo. "Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies". *J Cell Sci* (2000). 113:753-757.
33. Salvesen, G. S., and V. M. Dixit. "Caspase activation: the induced-proximity model". *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999). 96:10964-10967.
34. Bratton, S. B., M. MacFarlane, K. Cain, and G. M. Cohen. "Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis". *Exp Cell Res* (2000). 256:27-33.
35. Crompton, M. "Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis". *Curr Opin Cell Biol* (2000). 12:414-419.
36. Krammer, P. H. "CD95's deadly mission in the immune system". *Nature* (2000). 407:789-795.
37. Budd, R. C. "Activation-induced cell death". *Curr Opin Immunol* (2001). 13:356-362
38. Kroemer, G., and J. C. Reed. "Mitochondrial control of cell death". *Nat Med* (2000). 6:513-519
39. Huang, D. C. S., and A. Strasser. "BH3-only proteins—essentials initiators of apoptotic cell death". *Cell* (2000). 103:839-842
40. Wang, H. G., N. Pathan, I. M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T. F. Franke, and J. C. Reed. "Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD". *Science* (1999). 284:339-343.
41. Wallach, D., A. V. Kovalenko, E. E. Varfolomeev, and M. P. Boldin. "Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a *Sanhedrin* verdict". *Curr Opin Immunol* (1998). 10:279-288
42. Jenkins, M., M. Keir, and J. M. McCune. "A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes". *J Biol Chem* (2000). 275:7988-7993.
43. Green, D. R. "Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors". *Cell* (2000). 102:1-4.
44. Goyal, L. "Cell death inhibition: keeping caspases in check". *Cell* (2001). 104:805-808.
45. Gallucci, S., and P. Matzinger. "Danger signals: SOS to the immune system". *Curr Opin Immunol* (2001). 13:114-119
46. Chautan, M., G. Chazal, F. Cecconi, P. Gruss, and P. Golstein. "Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway". *Curr Biol* (1999). 9:967-970.

47. Fiers, W., R. Beyaert, W. Declercq, and P. Vandenabeele. "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage". *Oncogene* (1999). 18:7719-7730.
48. Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, B. J-L., P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp. "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule". *Nat Immunol* (2000). 1:489-495
49. Daugas, E., S. A. Susin, N. Zamzami, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, N. Larochette, M. C. Prevost, B. Leber, D. Andrews, J. Penninger, and G. Kroemer. "Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis". *Faseb J* (2000). 14:729-739.
50. Tonegawa, S. "The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1987. Somatic generation of immune diversity". *Scand J Immunol* (1993). 38:303-319.
51. Johnson, D. E. "Noncaspases proteases in apoptosis". *Leukemia* (2000). 14:1695-1703
52. Holtzman, M. J., J. M. Green, S. Jayaraman, and R. H. Arch. "Regulation of T cell apoptosis". *Apoptosis* (2000). 5:459-471.
53. Laabi, Y., and A. Strasser. "Immunology. Lymphocyte survival-ignorance is BLys". *Science* (2000). 289:883-884.
54. Li, X. C., T. B. Strom, L. A. Turka, and A. D. Wells. "T cell death and transplantation tolerance". *Immunity* (2001). 14:407-416.
55. Pinkoski, M. J., and D. R. Green. "Cloak and dagger in the avoidance of immune surveillance". *Curr Opin Genet Dev* (2000). 10:114-119.
56. Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, C. Hivroz, I. A. Roberts, K. M. Debatin, A. Fischer, and J. P. de Villartay. "Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity". *Science* (1995). 268:1347-1349.
57. Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, S. E. Straus, J. K. Dale, L. A. Middleton, A. Y. Lin, W. Strober, M. J. Lenardo, and J. M. Puck. "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome". *Cell* (1995). 81:935-946.
58. Wang, J., L. Zheng, A. Lobito, F. K. Chan, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J. M. Puck, S. E. Straus, and M. J. Lenardo. "Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II". *Cell* (1999). 98:47-58.
59. Larsson, M., J. F. Fonteneau, and N. Bhardwaj. "Dendritic cells resurrect antigens from dead cells". *Trends Immunol* (2001). 22:141-148.
60. Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells". *J Exp Med* (2000). 191:411-416
61. Restifo, N. P. "Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity". *Curr Opin Immunol* (2000). 12:597-603
62. Timmerman, J. M., and R. Levy. "Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy". *Annu Rev Med* (1999). 50:507-529.
63. Ferguson, T. A., and D. R. Green. "T cells are just dying to accept grafts". *Nat Med* (1999). 5:1231-1232
64. Braciale, T. J. "Life after death: controlling autoreactive CD8⁺ T-cell response". *Nat Med* (2001). 7:774-775
65. DiGiuseppe, J. A., and M. J. Borowitz. "Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. [Review] [28 refs]". *Seminars in Oncology* (1998). 25:6-10
66. Binet, J. L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguat, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, and F. Gremy. "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis". *Cancer* (1981). 48:198-206.
67. Rai, K. R., A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy, and B. S. Pasternack. "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia". *Blood* (1975). 46:219-234.

68. Zwiebel, J. A., and B. D. Cheson. "Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors". *Semin Oncol* (1998). 25:42-59.
69. Bannerji, R., and J. C. Byrd. "Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia". *Curr Opin Oncol* (2000). 12:22-29.
70. Matutes, E., and A. Polliack. "Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia". *Rev Clin Exp Hematol* (2000). 4:22-47.
71. Fais, F., F. Ghiotto, S. Hashimoto, B. Sellars, A. Valetto, S. L. Allen, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. Rai, L. Z. Rassenti, T. J. Kipps, G. Dighiero, H. W. Schroeder, Jr., M. Ferrarini, and N. Chiorazzi. "Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors". *J Clin Invest* (1998). 102:1515-1525.
72. Hamblin, T. J., Z. Davies, A. Gardiner, D. G. Oscier, and F. K. Stevenson. "Unmutated immunoglobulin VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia". *Blood* (1999). 94:1848-1854.
73. Hamblin, T. J., J. A. Orchard, A. Gardiner, D. G. Oscier, Z. Davis, and F. K. Stevenson. "Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL". *Blood* (2000). 95:2455-2457.
74. Darnle, R., T. Wasil, S. L. Allen, P. Schulman, K. Rai, and N. Chiorazzi. "Updated data on V gene mutation status and CD38 expression in B-CLL". *Blood* (2000). 95:2456-2457.
75. Reed, J. C. "Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia". *Semin Oncol* (1998). 25:11-18.
76. Lagneaux, L., A. Delforge, M. Bernier, P. Stryckmans, and D. Bron. "TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia". *Leuk Lymphoma* (1998). 31:99-106.
77. Nowell, P. C., and J. S. Moore. "Aberrant responses of human lymphocytic neoplasms to cytokine regulation". *Immunol Res* (1998). 17:171-177.
78. Rozenfeld-Granot, G., A. Toren, N. Amariglio, F. Brok-Simoni, and G. Rechavi. "Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies". *Exp Hematol* (2001). 29:228-233.
79. Perlman, R., W. P. Schiemann, M. W. Brooks, H. F. Lodish, and R. A. Weingerg. "TGF-beta induced apoptosis is mediated by the adapter Daxx that facilitates JNK activation". *Nat Cell Biol* (2001). 3:708-714.
80. Dancescu, M., M. Rubio-Trujillo, G. Biron, D. Bron, G. Delespesse, and M. Sarfati. "Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression". *J Exp Med* (1992). 176:1319-1326.
81. Moreno, A., M. L. Villar, C. Camara, R. Luque, C. Cespon, P. Gonzalez-Porque, G. Roy, J. Lopez-Jimenez, A. Bootello, and E. R. Santiago. "Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells". *Blood* (2001). 97:242-249.
82. Kay, N. E., L. Han, N. Bone, and G. Williams. "Interleukin 4 content in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B cells and blood CD8+ T cells from B-CLL patients: impact on clonal B-cell apoptosis". *Br J Haematol* (2001). 112:760-767.
83. Burger, J. A., N. Tsukada, M. Burger, N. J. Zvaifler, M. Dell'Aquila, and T. J. Kipps. "Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1". *Blood* (2000). 96:2655-2663.
84. Lagneaux, L., A. Delforge, D. Bron, C. De Bruyn, and P. Stryckmans. "Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells". *Blood* (1998). 91:2387-2396.
85. de la Fuente, M. T., B. Casanova, M. Garcia-Gila, A. Silva, and A. Garcia-Pardo. "Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax". *Leukemia* (1999). 13:266-274.
86. Scrivener, S., E. R. Kaminski, A. Demaine, and A. G. Prentice. "Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of immune dysregulation". *Br J Haematol* (2001). 112:959-964.

87. Fournier, S., G. Delespesse, M. Rubio, G. Biron, and M. Sarfati. "CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia". *J Clin Invest* [1992]. 89:1312-1321.
88. Sarfati, M., S. Fournier, M. Christoffersen, and G. Biron. "Expression of CD23 antigen and its regulation by IL-4 in chronic lymphocytic leukemia". *Leuk Res* [1990]. 14:47-55.
89. Bonnefoy, J. Y., S. Lecoanet-Henchoz, J. F. Gauchat, P. Graber, J. P. Aubry, P. Jeannin, and C. Plater-Zyberk. "Structure and functions of CD23". *Int Rev Immunol* [1997]. 16:113-128.
90. Hermann, P., M. Armant, E. Brown, M. Rubio, H. Ishihara, D. Ulrich, R. G. Caspary, F. P. Lindberg, R. Armitage, C. Maliszewski, G. Delespesse, and M. Sarfati. "The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23". *J Cell Biol* [1999]. 144:767-775.
91. Fournier, S., L. P. Yang, G. Delespesse, M. Rubio, G. Biron, and M. Sarfati. "The two CD23 isoforms display differential regulation in chronic lymphocytic leukaemia". *Br J Haematol* [1995]. 89:373-379.
92. Sarfati, M., S. Chevret, C. Chastang, G. Biron, P. Stryckmans, G. Delespesse, J. L. Binet, H. Merle-Beral, and D. Bron. "Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia". *Blood* [1996]. 88:4259-4264.
93. Molica, S., D. Levato, N. Cascavilla, L. Levato, and P. Musto. "Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia". *Eur J Haematol* [1999]. 62:117-122.
94. Sarfati, M. "Interleukin-4 and the two isoforms of CD23 antigen: their possible contribution to the physiopathology of chronic lymphocytic leukemia disease". *Nouv Rev Fr Hematol* [1993]. 35:109-113.
95. Brown, E. J., and W. A. Frazier. "Integrin-associated protein (CD47) and its ligands". *Trends Cell Biol* [2001]. 11:130-135.
96. Reinhold, M. I., F. P. Lindberg, D. Plas, S. Reynolds, M. G. Peters, and E. J. Brown. "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)". *J Cell Sci* [1995]. 108:3419-3425.
97. Gao, A. G., F. P. Lindberg, M. B. Finn, S. D. Blystone, E. J. Brown, and W. A. Frazier. "Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin". *J Biol Chem* [1996]. 271:21-24.
98. Jiang, P., C. F. Lagenaur, and V. Narayanan. "Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule". *J Biol Chem* [1999]. 274:559-562.
99. Cant, C. A., and A. Ullrich. "Signal regulation by family conspiracy". *Cell Mol Life Sci* [2001]. 58:117-124.
100. van Den Nieuwenhof, I. M., C. Renardel De Lavalette, N. Diaz, I. van Die, and T. K. van Den Berg. "Differential galactosylation of neuronal and haematopoietic signal regulatory protein-[Sagr;] determines its cellular binding-specificity". *J Cell Sci* [2001]. 114:1321-1329.
101. Bornstein, P. "Thrombospondins as matricellular modulators of cell function". *J Clin Invest* [2001]. 107:929-934.
102. Brown, E. "Integrin-associated protein (CD47): an unusual activator of G protein signaling". *J Clin Invest* [2001]. 107:1499-1500.
103. Green, J. M., A. Zhelesnyak, J. Chung, F. P. Lindberg, M. Sarfati, W. A. Frazier, and E. J. Brown. "Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins". *J Cell Biol* [1999]. 146:673-682.
104. Lindberg, F. P., D. C. Bullard, T. E. Caver, H. D. Gresham, A. L. Beaudet, and E. J. Brown. "Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice". *Science* [1996]. 274:795-798.
105. Reinhold, M. I., F. P. Lindberg, G. J. Kersh, P. M. Allen, and E. J. Brown. "Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein (CD47) is an adhesion-dependent, CD28-independent signaling pathway". *J Exp Med* [1997]. 185:1-11.

106. Ticchioni, M., M. Deckert, F. Mary, G. Bernard, E. J. Brown, and A. Bernard. "Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells". *J Immunol* (1997). 158:677-684.
107. Waclavicek, M., O. Majdic, T. Stulnig, M. Berger, T. Baumruker, W. Knapp, and W. F. Pickl. "T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4". *J Immunol* (1997). 159:5345-5354.
108. Brittain, J. E., K. J. Mlinar, C. S. Anderson, E. P. Orringer, and L. V. Parise. "Activation of sickle red blood cell adhesion via integrin-associated protein/CD47-induced signal transduction". *J Clin Invest* (2001). 107:1555-1562.
109. Erb, L., J. Liu, J. Ockerhausen, Q. Kong, R. C. Garrad, K. Griffin, C. Neal, B. Krugh, L. I. Santiago-Perez, F. A. Gonzalez, H. D. Gresham, J. T. Turner, and G. A. Weisman. "An RGD Sequence in the P2Y(2) Receptor Interacts with alpha(V)beta(3) Integrins and Is Required for G(o)-mediated Signal Transduction". *J Cell Biol* (2001). 153:491-502.
110. Cartron, J. P. "RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency". *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* (1999). 12:655-689.
111. Chang, H. P., Y. L. Ma, F. J. Wan, L. Y. Tsai, F. P. Lindberg, and E. H. Lee. "Functional blocking of integrin-associated protein impairs memory retention and decreases glutamate release from the hippocampus". *Neuroscience* (2001). 102:289-296.
112. Mateo, V., L. Lagneaux, D. Bron, G. Biron, M. Armant, G. Delespesse, and M. Sarfati. "CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia". *Nat Med* (1999). 5:1277-1284.
113. Mateo, V., G. Biron, M. Rubio, and M. Sarfati. "Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between PS exposure and cytoskeleton organization". *submitted for publication* (2001).
114. Zhuang, J., Y. Ren, R. T. Snowden, H. Zhu, V. Gogvadze, J. S. Savill, and G. M. Cohen. "Dissociation of phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis from other features of the apoptotic program". *Journal of Biological Chemistry* (1998). 273:15628-15632
115. Liu, Q. A., and M. O. Hengartner. "The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*". *Ann N Y Acad Sci* (1999). 887:92-104.
116. Lyon, C. J., C. J. Evans, B. R. Bill, A. J. Otsuka, and R. J. Aguilera. "The *C. elegans* apoptotic nuclease NUC-1 is related in sequence and activity to mammalian DNase II". *Gene* (2000). 252:147-154.
117. Ellis, H. M., and H. R. Horvitz. "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*". *Cell* (1986). 44:817-829.
118. Nakamura, M., H. Yagi, T. Ishii, S. Kayaba, H. Soga, T. Gotoh, S. Ohtsu, M. Ogata, and T. Itoh. "DNA fragmentation is not the primary event in glucocorticoid-induced thymocyte death in vivo". *Eur J Immunol* (1997). 27:999-1004.
119. Nakamura, M., H. Yagi, S. Kayaba, T. Ishii, T. Gotoh, S. Ohtsu, and T. Itoh. "Death of germinal center B cells without DNA fragmentation". *Eur J Immunol* (1996). 26:1211-1216.
120. Zhang, J., X. Liu, D. C. Scherer, L. van Kaer, X. Wang, and M. Xu. "Resistance of DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45". *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998). 95:12480-12485
121. McIlroy, D., M. Tanaka, H. Sakahira, H. Fukuyama, M. Suzuki, K. Yamamura, Y. Ohsawa, Y. Uchiyama, and S. Nagata. "An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes". *Genes Dev* (2000). 14:549-558.
122. Saini, K. S., and N. I. Walker. "Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis". *Molecular and cellular biochemistry* (1998). 178:9-25
123. Parrish, J., L. Y. Li, K. Klotz, D. Ledwich, X. Wang, and D. Xue. "Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*". *Nature* (2001). 412:90-94
124. Roy, S., and D. W. Nicholson. "Cross-talk in cell death signaling". *J Exp Med* (2000). 192:F21-25.

125. Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer. "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor". *Nature* [1999]. 397:441-446.
126. Holmgren, L., A. Szeles, E. Rajnavolgyi, J. Folkman, G. Klein, I. Ernberg, and K. I. Falk. "Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies". *Blood* [1999]. 93:3956-3963.
127. Bergsmedh, A., A. Szeles, M. Henriksson, A. Bratt, M. J. Folkman, A. L. Spetz, and L. Holmgren. "Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies". *Proc Natl Acad Sci U S A* [2001]. 98:6407-6411.
128. Fadok, V. A. "Clearance: the last and often forgotten stage of apoptosis. [Review] [86 refs]". *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia* [1999]. 4:203-211
129. Mevorach, D., J. L. Zhou, X. Song, and K. B. Elkon. "Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production". *Journal of Experimental Medicine* [1998]. 188:387-392
130. Herrmann, M., R. E. Voll, and J. R. Kalden. "Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus". *Trends Immunol* [2000]. 21:424-426
131. Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J. M. Penninger. "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death". *Nature* [2001]. 410:549-554.
132. Lesage, S., A. M. Steff, F. Philippoussis, M. Page, S. Trop, V. Mateo, and P. Hugo. "CD4+ CD8+ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway". *J Immunol* [1997]. 159:4762-4771.
133. Skov, S., P. Klausen, and M. H. Claesson. "Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis". *J Cell Biol* [1997]. 139:1523-1531.
134. Woodle, E. S., D. M. Smith, J. A. Bluestone, W. M. Kirkman, D. R. Green, and E. W. Skowronski. "Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway". *J Immunol* [1997]. 158:2156-2164.
135. Pettersen, R. D., G. Gaudernack, M. K. Olafsen, S. O. Lie, and K. Hestdal. "The TCR-binding region of the HLA class I alpha2 domain signals rapid Fas-independent cell death: a direct pathway for T cell-mediated killing of target cells?" *J Immunol* [1998]. 160:4343-4352.
136. Drenou, B., V. Blancheteau, D. H. Burgess, R. Fauchet, D. J. Charron, and N. A. Mooney. "A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes". *J Immunol* [1999]. 163:4115-4124.
137. Deas, O., C. Dumont, M. MacFarlane, M. Rouleau, C. Hebib, F. Harper, F. Hirsch, B. Charpentier, G. M. Cohen, and A. Senik. "Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes". *J Immunol* [1998]. 161:3375-3383.
138. Pettersen, R. D., G. Bernard, M. K. Olafsen, M. Pourtein, and S. O. Lie. "Cd99 signals caspase-independent t cell death". *J Immunol* [2001]. 166:4931-4942.
139. Katz, E., M. R. Deehan, S. Seatter, C. Lord, R. D. Sturrock, and M. M. Harnett. "B cell receptor-stimulated mitochondrial phospholipase A2 activation and resultant disruption of mitochondrial membrane potential correlate with the induction of apoptosis in WEHI-231 B cells". *J Immunol* [2001]. 166:137-147.
140. Chi, S., C. Kitanaka, K. Noguchi, T. Mochizuki, Y. Nagashima, M. Shirouzu, H. Fujita, M. Yoshida, W. Chen, A. Asai, M. Himeno, S. Yokoyama, and Y. Kuchino. "Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells". *Oncogene* [1999]. 18:2281-2290.
141. Elliott, K., K. Ge, W. Du, and G. C. Prendergast. "The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program". *Oncogene* [2000]. 19:4669-4684.

142. Carmody, R. J., and T. G. Cotter. "Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro". *Cell Death Differ* (2000). 7:282-291.
143. Pettersen, R. D., K. Hestdal, M. K. Olafsen, S. O. Lie, and F. P. Lindberg. "CD47 signals T cell death". *J Immunol* (1999). 162:7031-7040.
144. Klaus, S. J., S. P. Sidorenko, and E. A. Clark. "CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes". *J Immunol* (1996). 156:2743-2753
145. Vercaemmen, D., G. Brouckaert, G. Denecker, M. Van de Craen, W. Declercq, W. Fiers, and P. Vandenameele. "Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways". *J Exp Med* (1998). 188:919-930
146. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter. "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways". *Embo J* (1998). 17:1675-1687.
147. Kawahara, A., Y. Ohsawa, H. Matsumura, Y. Uchiyama, and S. Nagata. "Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain". *J Cell Biol* (1998). 143:1353-1360.
148. Vasilakos, J. P., T. Ghayur, R. T. Carroll, D. A. Giegel, J. M. Saunders, L. Quintal, K. M. Keane, and B. D. Shivers. "IL-1 beta converting enzyme (ICE) is not required for apoptosis induced by lymphokine deprivation in an IL-2-dependent T cell line". *J Immunol* (1995). 155:3433-3442.
149. Sarin, A., M. L. Wu, and P. A. Henkart. "Different interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) family protease requirements for the apoptotic death of T lymphocytes triggered by diverse stimuli". *J Exp Med* (1996). 184:2445-2450.
150. Kim, K., C. Lee, T. J. Sayers, K. Muegge, and S. K. Durum. "The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways". *J Immunol* (1998). 160:5735-5741
151. Doerfler, P., K. A. Forbush, and R. M. Perlmutter. "Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development". *J Immunol* (2000). 164:4071-4079.
152. Creagh, E. M., R. J. Carmody, and T. G. Cotter. "Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells". *Exp Cell Res* (2000). 257:58-66.
153. Los, M., C. Stroh, R. U. Janicke, I. H. Engels, and K. Schulze-Osthoff. "Caspases: more than just killers?" *Trends Immunol* (2001). 22:31-34.
154. Alam, A., L. Y. Cohen, S. Aouad, and R.-P. Sékaly. "Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells". *J Exp Med* (1999). 190:1879-1890
155. Kenedy, N. J., T. Kataoka, J. Tschopp, and R. C. Budd. "Caspase activation is required for T cell proliferation". *J Exp Med* (1999). 190:1891-1895
156. Jiménez, B., D. V. Volpert, S. E. Crawford, M. Febbraio, R. L. Silverstein, and N. Bouck. "Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1". *Nat Med* (2000). 6:41-48
157. Freyberg, M. A., D. Kaiser, R. Graf, P. Vischer, and P. Friedl. "Integrin-associated protein and thrombospondin-1 as endothelial mechanosensitive death mediators". *Biochem Biophys Res Commun* (2000). 271:584-588.
158. Guo, K., V. Wolf, A. M. Dharmarajan, Z. Feng, W. Bielke, S. Saurer, and R. Friis. "Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat". *Biol Reprod* (1998). 58:739-746.
159. Higuchi, T., H. Fujiwara, S. Yamada, K. Tatsumi, N. Kataoka, K. Itoh, M. Maeda, J. Fujita, and S. Fujii. "Co-expression of integrin-associated protein (IAP/CD47) and its ligand thrombospondin-1 on human granulosa and large luteal cells". *Mol Hum Reprod* (1999). 5:920-926.
160. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse, and M. Sarfati. "Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation". *J Immunol* (2001). 167:2547-2554.

161. Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, Y. F. Fang, C. F. Lagenaur, H. D. Gresham, and F. P. Lindberg. "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells". *Science* (2000). 288:2051-2054.
162. Drbal, K., J. Cerny, P. Angelisova, I. Hilgert, M. Cebecauer, J. Sinkora, and V. Horejsi. "CDw149 antibodies recognize a clustered subset of CD47 molecules associated with cytoplasmic signaling molecules". *Tissue Antigens* (2000). 56:258-267.
163. Wu, A. L., J. Wang, A. Zheleznyak, and E. J. Brown. "Ubiquitin-related proteins regulate interaction of vimentin intermediate filaments with the plasma membrane". *Mol Cell* (1999). 4:619-625.
164. Yoshida, H., Y. Tomiyama, J. Ishikawa, K. Oritani, I. Matsumura, M. Shiraga, T. Yokota, Y. Okajima, M. Ogawa, J. Miyagawa, T. Nishiura, and Y. Matsuzawa. "Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42". *Blood* (2000). 96:234-241.
165. Rebres, R. A., J. M. Green, M. I. Reinhold, M. Ticchioni, and E. J. Brown. "Membrane Raft Association of CD47 Is Necessary for Actin Polymerization and Protein Kinase C theta Translocation in Its Synergistic Activation of T Cells". *J Biol Chem* (2001). 276:7672-7680.
166. Erickson, J. W., and R. A. Cerione. "Multiple roles for Cdc42 in cell regulation". *Curr Opin Cell Biol* (2001). 13:153-157.
167. Chuang, T. H., K. M. Hahn, J. D. Lee, D. E. Danley, and G. M. Bokoch. "The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T lymphocytes". *Mol Biol Cell* (1997). 8:1687-1698.
168. Way, K. J., E. Chou, and G. L. King. "Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches". *TIPS* (2000). 21:181-187.
169. Meller, N., A. Altman, and N. Isakov. "New perspectives on PKCtheta, a member of the novel subfamily of protein kinase C". *Stem Cells* (1998). 16:178-192.
170. Meller, N., Y. Elitzur, and N. Isakov. "Protein kinase C-theta (PKCtheta) distribution analysis in hematopoietic cells: proliferating T cells exhibit high proportions of PKCtheta in the particulate fraction". *Cell Immunol* (1999). 193:185-193.
171. Emoto, Y., Y. Manome, G. Meinhardt, H. Kasaki, S. Kharbanda, M. Robertson, T. Ghayur, W. W. Wong, R. Kamen, R. Weichselbaum, and et al. "Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells". *Embo J* (1995). 14:6148-6156.
172. Datta, R., H. Kojima, K. Yoshida, and D. Kufe. "Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis". *J Biol Chem* (1997). 272:20317-20320.
173. Webb, P. R., K. Q. Wang, D. Scheel-Toellner, J. Pongracz, M. Salmon, and J. M. Lord. "Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase". *Apoptosis* (2000). 5:451-458.
174. Frasch, S. C., P. M. Henson, J. M. Kailey, D. A. Richter, M. S. Janes, V. A. Fadok, and D. L. Bratton. "Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta". *J Biol Chem* (2000). 275:23065-23073.
175. Endo, K., E. Oki, V. Biedermann, H. Kojima, K. Yoshida, F. J. Johannes, D. Kufe, and R. Datta. "Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents". *J Biol Chem* (2000). 275:18476-18481.
176. Basu, A., and G. R. Akkaraju. "Regulation of caspase activation and cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death by protein kinase C". *Biochemistry* (1999). 38:4245-4251.
177. Gomez-Angelats, M., C. D. Bortner, and J. A. Cidlowski. "Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K+ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases". *J Biol Chem* (2000). 275:19609-19619.
178. Bortner, C. D., and J. A. Cidlowski. "Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis". *J Biol Chem* (1999). 274:21953-21962.

179. Gomez-Angelats, M., C. D. Bortner, and J. A. Cidlowski. "Cell volume regulation in immune cell apoptosis". *Cell Tissue Res* (2000). 301:33-42.
180. Bortner, C. D., F. M. Hughes, and J. A. Cidlowski. "A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis". *J Biol Chem* (1997). 272:32436-32442
181. Maeno, E., Y. Ishizaki, T. Kanaseki, A. Hazama, and Y. Okada. "Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis". *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000). 97:9487-9492.
182. Dallaporta, B., T. Hirsch, S. A. Susin, N. Zamzami, N. Larochette, C. Brenner, I. Marzo, and G. Kroemer. "Potassium leakage during the apoptotic degradation phase". *J Immunol* (1998). 160:5605-5615
183. Hirt, U. A., F. Gantner, and M. Leist. "Phagocytosis of nonapoptotic cells dying by caspase-independent mechanisms". *J Immunol* (2000). 164:6520-6529.
184. Tzung, S. P., K. M. Kim, G. Basanez, C. D. Giedt, J. Simon, J. Zimmerberg, K. Y. Zhang, and D. M. Hockenbery. "Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3". *Nat Cell Biol* (2001). 3:183-191.
185. Puthalakath, H., A. Villunger, L. A. O'Reilly, J. G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. S. Huang, and A. Strasser. "Bmf, a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis". *Science* (2001). 293:1829-1832
186. Fitch, M. E., C. M. Chang, and T. G. Parslow. "The BH3 domain is required for caspase-independent cell death induced by Bax and oligomycin". *Cell Death Differ* (2000). 7:338-349.
187. Shimizu, S., and Y. Tsujimoto. "Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity". *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000). 97:577-582
188. Bossywetzel, E., D. D. Newmeyer, and D. R. Green. "Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization[Review]". *Embo Journal* (1998). 17:37-49
189. Bruey, J.-M., C. Ducasset, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S. A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A.-P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary, and C. Garrido. "Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c". *Nat Cell Biol* (2000). 2:645-652
190. Beere, H. M., and D. R. Green. "Stress management- heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis". *Trends Cell Biol* (2001). 11:6-10
191. Hirpara, J. L., M. A. Seyed, K. W. Loh, H. Dong, R. M. Kini, and S. Pervaiz. "Induction of mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in the absence of caspase activation is insufficient for effective apoptosis in human leukemia cells". *Blood* (1999). 95:1773-1780
192. Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden, and I. Girkontaite. "Immunosuppressive effects of apoptotic cells". *Nature* (1997). 390:350-351.
193. Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF". *J Clin Invest* (1998). 101:890-898.
194. Fadok, V. A., D. L. Bratton, and P. M. Henson. "Phagocyte receptors for apoptotic cells/ recognition, uptake, and consequences". *J Clin Invest* (2001). 108:957-962
195. Chen, W., M. E. Frank, W. Jin, and S. M. Wahl. "TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu". *Immunity* (2001). 14:715-725.
196. Fadok, V. A., D. L. Bratton, S. C. Frasch, M. L. Warner, and P. M. Henson. "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes [see comments]. [Review] [128 refs]". *Cell Death & Differentiation* (1998). 5:551-562
197. Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz, and P. M. Henson. "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells". *Nature* (2000). 405:85-90.

198. Fadok, V. A., A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M. Henson, and D. L. Bratton. "Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts". *J Biol Chem* [2001]. 276:1071-1077.
199. Savill, J. "Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis". *Br Med Bull* (1997). 53:491-508.
200. Platt, N., S. R. da, and S. Gordon. "Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. [Review] [59 refs]". *Trends in Cell Biology* [1998]. 8:365-372
201. Gregory, C. D. "CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system". *Curr Opin Immunol* [2000]. 12:27-34.
202. Savill, J., and V. Fadok. "Corpse clearance defines the meaning of cell death". *Nature* [2000]. 407:784-788.
203. Scott, R. S., E. J. McMahon, S. M. Pop, E. A. Reap, R. Caricchio, P. L. Cohen, H. S. Earp, and G. K. Matsushima. "Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER". *Nature* [2001]. 411:207-211
204. Demeure, C. E., H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. "CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells". *J Immunol* [2000]. 164:2193-2199.
205. Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett. "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis". *Nature* [1990]. 343:170-173.
206. Marguet, D., M. F. Luciani, A. Moynault, P. Williamson, and G. Chimini. "Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey". *Nat Cell Biol* [1999]. 1:454-456.
207. Oldenborg, P. A., H. D. Gresham, and F. P. Lindberg. "CD47-signal regulatory protein alpha [SIRPalpha] regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis". *J Exp Med* [2001]. 193:855-862.
208. Mevorach, D., J. O. Mascarenhas, D. Gershov, and K. B. Elkon. "Complement-dependant clearance of apoptotic cells by human macrophages". *J Exp Med* [1998]. 188:2313-2320
209. Crawford, S. E., V. Stellmach, J. E. Murphy-Ullrich, R. O. Hynes, G. P. Boivin, and N. Bouck. "Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo." *Cell* [1998]. 93:1159-1170
210. Armant, M., M. N. Avice, P. Hermann, M. Rubio, M. Kiniwa, G. Delespesse, and M. Sarfati. "CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production". *J Exp Med* [1999]. 190:1175-1182.
211. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. "CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors". *J Immunol* [2000]. 165:4624-4631.
212. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. "Role of cd47 in the induction of human naive t cell energy". *J Immunol* [2001]. 167:2459-2468.
213. Blazar, B. R., F. P. Lindberg, E. Ingulli, A. Panoskaltis-Mortari, P. A. Oldenborg, K. Iizuka, W. M. Yokoyama, and P. A. Taylor. "Cd47 [integrin-associated protein] engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells". *J Exp Med* [2001]. 194:541-550.
214. Nathan, C., and W. A. Muller. "Putting the brakes on innate immunity: a regulatory role for CD200?" *Nat Immunol* [2001]. 2:17-19.
215. Castells, M. C., L. B. Klickstein, K. Hassani, J. A. Cumpido, M. E. Lacouture, K. F. Austen, and H. R. Katz. "gp49B1-alpha(v)beta3 interaction inhibits antigen-induced mast cell activation". *Nat Immunol* [2001]. 2:436-442.
216. Lanier, L. L., and J. V. Ravetch. "Immune inhibitory receptors". *Science* [2000]. 290:84-89
217. Johnstone, R. W., E. Cretney, and M. J. Smyth. "P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death". *Blood* [1999]. 93:1075-1085.

218. Seiffert, M. Brossart, P. Cant, C. Cella, M. Colonna, M. Brugger, W. Kanz, L. Ullrich, A. and Buhring, H. J. "Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells". *Blood* (2001) 97 :2741_2749.