

Université de Montréal

Rôle de CD47 dans l'induction de la tolérance *in vivo*

par
Patrick Gautier-Éthier

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en sciences biomédicales
option générale

août 2009

© Patrick Gautier-Éthier, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Rôle de CD47 dans l'induction de la tolérance *in vivo*

Présenté par :
Patrick Gautier-Éthier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Alain Lamarre
président-rapporteur

Marika Sarfati
directeur de recherche

Manuela Santos
membre du jury

Résumé

La tolérance orale permet la modulation de la réponse immunitaire à l'égard des antigènes exogènes présents dans la lumière intestinale. Essentiels à l'établissement d'une relation symbiotique entre le système immunitaire et la flore intestinale, l'induction et le maintien de la tolérance orale reposent sur différents mécanismes immunologiques. Parmi eux, l'induction de cellules T régulatrices par les cellules dendritiques et de mécanismes apoptotiques. Or, la glycoprotéine membranaire CD47 est impliquée, en périphérie, dans ces mécanismes. Cependant, le rôle de CD47 dans la tolérance orale n'est pas connu. À l'aide d'un modèle murin déficient en CD47, nous avons démontré principalement, que l'absence de CD47 est associée à une diminution de 50 % de la proportion de cellules dendrites myéloïdes CD11b⁺CD103⁻ retrouvées dans les ganglions mésentériques. Suite au transfert adoptif de cellules T antigènes spécifiques dans nos différents modèles expérimentaux, on a, aussi, observé une diminution de 45 % de leur niveau d'activation dans les ganglions mésentériques. Malgré les effets observés, le CD47 n'est pas impliqué dans l'induction d'une réaction de tolérance orale secondaire à l'administration intragastrique de fortes doses d'ovalbumine. Cependant, nous avons démontré que CD47 est impliquée au niveau de la migration des cellules dendritiques de la peau et de certaines sous-populations retrouvées dans les ganglions mésentériques.

Mots clés :

1. Tolérance orale
2. Réponse d'hypersensibilité de type retardé
3. Réponse immune Th1
4. Ganglions mésentériques
5. Cellules dendritiques
6. Migration

Abstract

Oral tolerance allows the modulation of the immune response against exogenous antigens present in the intestinal lumen. Essential to establish a symbiotic relationship between the immune system and intestinal flora, the induction and maintenance of oral tolerance rests on different immunological mechanisms. Among them, induction of regulatory T cells by dendritic cells and apoptotic mechanisms. However, the membrane glycoprotein CD47 is involved in the periphery of these mechanisms. However, the role of CD47 in oral tolerance is unknown. With a mouse model deficient in CD47, we showed mainly that the absence of CD47 is associated with a decrease of 50% in the proportion of myeloid dendritic cells CD11b⁺ CD103⁻ found in the mesenteric lymph nodes. Following the adoptive transfer of antigen specific T cells in our experimental models, we also observed a decrease of 45% of their level of activation in mesenteric lymph nodes. Despite the observed effects, CD47 is not involved in the induction of oral tolerance response secondary to intragastric administration of high doses of ovalbumin. However, we have shown that CD47 is involved in the migration of dendritic cells of the skin and some sub-populations found in mesenteric lymph nodes.

Keywords :

1. Oral tolerance
2. Delayed-type hypersensitivity
3. Th1-type immune response
4. Mesenteric lymph nodes
5. Dendritic cells
6. Migration

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract	IV
Table des matières.....	V
Liste des abréviations.....	VIII
La dédicace	IX
Les remerciements	X
L'avant-propos.....	XII
Introduction.....	1
La tolérance.....	1
La tolérance centrale	1
La tolérance périphérique.....	3
La tolérance orale.....	5
Les tissus lymphocytaires associés à l'intestin	7
Les cellules dendritiques de l'intestin	9
Les mécanismes de la tolérance orale	12
CD47	13

Matériel et méthodes	17
Souris	17
Purification des leucocytes de la rate, des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques, et cytométrie en flux	17
Sensibilisation active au FITC	18
Transfert adoptif.....	18
Hypersensibilité de type retardée à l'OVA	19
Immunisation <i>in vivo</i> de souris non manipulées	19
Analyse statistique	20
Résultats	21
La migration des DCs de la peau est dépendante de l'expression du CD47	21
L'absence de CD47 influence négativement la prolifération des cellules T dans les MLNs	25
CD47 n'est pas essentielle à l'induction de la tolérance orale.....	27
CD47 influence la présence de certaines sous populations de DCs retrouvées dans les MLNs.....	29
L'absence de CD47 induit un biais de type Th1 au niveau de la production Acs .	31
Discussion	35
Bibliographie.....	44

Liste des figures

Figure 1 : L'effet associé à une déficience en CD47 sur la migration des DCs de la peau	21
Figure 2 : En conditions inflammatoires, l'interaction entre CD47 et SIRP- α est nécessaire à la migration des DCs de la peau	23
Figure 3 : L'absence de CD47 est associée à une diminution de la prolifération des cellules T CD4 ⁺ DO11.10 Ag-spécifiques dans les MLNs suite à l'administration orale d'Ag	25
Figure 4 : La présence de CD47 n'est pas essentielle à l'induction de la tolérance orale	27
Figure 5 : L'effet associé à une déficience en CD47 sur les différentes populations de DCs présentes dans les MLNs	29
Figure 6 : Présence d'un biais humoral de type Th1 chez la souris CD47 ^{-/-} .	31

Liste des abréviations

Ag	: Antigène
CFA	: Adjuvant complet de Freund
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	: Cellule présentatrice d'antigène
CTLA-4	: « Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 »
DC	: Cellule dendritique
dDC	: Cellule dendritique du derme
DN	: Cellule dendritique double négative (CD8 ⁻ CD11b ⁻)
DTH	: Réponse d'hypersensibilité de type retardé
EAF	: Épithélium associé aux follicules
FITC	: fluorescéine isothiocyanate
IFA	: Adjuvant incomplet de Freund
IFN	: Interféron
IL	: Interleukine
i.g.	: Intra-gastrique
i.p.	: Intra-péritonéal
i.v.	: Intra-veineux
LC	: Cellule dendritique de l'épiderme
LP	: Lamina propria
MLNs	: Ganglions mésentériques
OVA	: Ovalbumine
pDC	: Cellule dendritique plasmacytoïde
PP	: Plaques de Peyer
SIRP	: « Signal regulatory protein »
s.c.	: Sous cutanée
TGF	: « Transforming growth factor »
TNF	: « Tumor necrosis factor »
Treg	: Cellule T régulatrice
TSP	: Thrombospondine

À ma famille actuelle et future.

Les remerciements

La réalisation d'un tel travail demande beaucoup de temps, mais aussi de support. Je tiens donc à remercier sincèrement tous ceux et celles qui m'ont accordé leur aide à un moment ou à un autre.

Je pense, bien entendu, à Marika, qui a su faire évoluer ce projet en fonction de mes nouvelles responsabilités. Merci pour ton support indéfectible.

À Guy pour ton apport constant de connaissances et ta personnalité si généreuse.

Il y a aussi l'ensemble de mes amis, et à la fois collègues, du laboratoire qui à plusieurs reprises m'ont aidé à la préparation et à la réalisation d'expériences. Je pense particulièrement à Marianne, Genny, Manu, Quang et Salim. Je remercie aussi Deborah et Sylvie pour leur enseignement et leur encadrement lors de mon arrivée au laboratoire.

À vous tous, je vous remercie une seconde fois pour votre gentillesse et, surtout, votre amitié.

Par ailleurs, je ne peux me permettre d'omettre de remercier ma famille pour leur support exceptionnel et spécialement pour l'aide que Stéphane et Sandrine m'ont octroyé.

En terminant, merci Julie, ma conjointe, pour ton aide, ton appui et la motivation offerte. Sans toi, l'accomplissement de ce travail aurait été à quelques reprises compromis.

Et aussi, je tiens à dire un merci spécial à tout ceux que j'oublis et aussi au FRSQ et aux IRSC pour leur support financier.

L'avant-propos

Entreprise en parallèle à mes études de médecine, la réalisation de cette maîtrise en sciences biomédicales m'a demandé beaucoup d'efforts et de sacrifices. Cependant, l'importante charge de travail nécessitée par cette aventure m'a forcé à prolonger la durée de ma maîtrise. Par conséquent, j'ai dû adapter, à quelques reprises, l'orientation de cette dernière afin de permettre la publication précoce de mes résultats, Malgré les changements apportés, je suis content d'avoir réalisé ce projet complet et structuré.

D'autre part, je profite de l'occasion pour apporter quelques suggestions afin de rendre cette double formation, très stimulante et bénéfique, plus accessible.

- 1) Afin de permettre une présence accrue au laboratoire de recherche et une participation active aux activités scientifiques (club de lecture, réunion du laboratoire), il serait bénéfique d'inclure, surtout lors de l'externat, une journée de recherche par semaine. Je crois que cette mesure sera bénéfique à la réalisation des expériences, en plus de faciliter l'accès aux personnes ressources et à l'expertise disponible dans les laboratoires de recherche. Par ailleurs, je crois que l'impact de cette mesure, sur la formation médicale sera minime.

- 2) Par ailleurs, il serait souhaitable de revoir le soutien financier disponible. Effectivement, seul le FRSQ offre des bourses pour les étudiants de l'Université de Montréal inscrits dans un programme de MD/M.Sc. Or, ces bourses sont d'une durée maximale de 2 ans. Il me paraît difficile d'imaginer de réaliser cette double aventure en une si courte période. Il serait dès lors profitable de mettre à la disposition des étudiants un programme de bourses complémentaires.
- 3) En dernier lieu, la création de réels programmes de MD/M.Sc et MD/Ph.D. serait bénéfique, puisque pour l'instant, il est nécessaire de s'inscrire séparément dans les 2 programmes et qu'aucun encadrement pédagogique n'est fourni par les différentes facultés.

Introduction

La tolérance

Lors du développement des lymphocytes T et B, différents phénomènes de réarrangements géniques confèrent au système immunitaire la capacité d'induire une réponse immune adéquate envers une multitude d'antigènes (Ags) (1-3). Occasionnellement, cette réaction est dirigée contre des antigènes du soi. En de telles circonstances, il peut y avoir apparition de maladies dites auto-immunes (1, 4). Elles peuvent être regroupées en maladies auto-immunes systémiques ou ciblant des tissus spécifiques (5).

La faible incidence de ces maladies résulte de la présence au sein de l'organisme d'un phénomène de tolérance immunologique. Ce processus permet l'établissement d'un état de non-réponse immunitaire spécifique à l'égard d'un Ag reconnu, sous certaines conditions, par l'organisme (6, 7). Par ailleurs, la réponse à tous les autres antigènes reste normale (7).

L'induction d'un état de tolérance repose sur différents éléments encore peu connus. Cependant, on distingue 2 grandes classes de tolérance : la tolérance centrale et la tolérance périphérique (8).

La tolérance centrale

La tolérance centrale mène à l'élimination de la majeure partie des clones lymphocytaires autoréactifs et elle fait partie intégrale du processus de maturation

des lymphocytes T et B. Ce dernier a lieu au niveau des organes lymphoïdes centraux soit le thymus pour les lymphocytes T et la moelle osseuse pour les lymphocytes B (8, 9). Cependant, puisque notre modèle expérimental repose principalement sur l'action des lymphocytes T, nous allons nous pencher uniquement sur les mécanismes impliqués dans la régulation de ces dernières cellules.

Le processus d'élimination des cellules T autoréactives repose principalement sur deux grandes étapes de sélection. Tout d'abord, dès leur arrivée dans le cortex du thymus, les précurseurs des cellules T, coexprimant le $CD4^+$ et le $CD8^+$, sont sélectionnés positivement en fonction de l'affinité de leur TCR pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'hôte. Ainsi, les thymocytes ayant une faible affinité pour le CMH exprimé à la surface des cellules épithéliales du cortex vont mourir suite à l'absence de signaux leur permettant de poursuivre leur maturation. Les thymocytes qui survivent vont continuer leur migration vers la zone médullaire du thymus où un grand nombre d'Ag_s du soi sont présentés par les cellules épithéliales. Les thymocytes, ayant une affinité pour les peptides du soi ainsi présentés, seront éliminés par apoptose. De tous les précurseurs de cellules T présents dans le thymus, uniquement 3 % vont franchir les étapes de sélection positive et négative et vont se retrouver dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils expriment alors que le CD4 ou le CD8 (10-12).

La tolérance périphérique

Cependant, ces mécanismes centraux ne sont pas complètement efficaces et un bon nombre de cellules lymphocytaires autoréactives sont retrouvées en périphérie et peuvent induire d'importants dommages tissulaires. Par contre, de nombreux mécanismes sont mis en place afin de maintenir inactifs ou d'éliminer les lymphocytes autoréactifs (13, 14). Ces mécanismes permettent ainsi l'élaboration d'une tolérance périphérique. Parmi ces derniers, on en retrouve principalement cinq.

1) L'activation des lymphocytes T est dépendante de la liaison TCR-Ag-CMH, mais aussi de la présence de signaux de costimulation. Or en absence de ces derniers, il y a production de signaux négatifs et la cellule entre en stade d'anergie irréversible (15). Ainsi, même si les conditions nécessaires à l'activation d'une cellule T sont réunies, cette cellule ne sera pas activée et ne pourra pas induire de réponse immunitaire (16). Par ailleurs, un phénomène similaire est aussi présent au niveau des cellules B potentiellement autoréactives (17).

2) La réponse immunitaire peut être supprimée de manière active par un groupe de cellules T appelées régulatrices (Treg) (8). Elles sont réparties dans différents groupes et sont de diverses origines. Les Treg sont produites principalement dans le thymus, mais elles peuvent être induites en périphérie (18-20). Parmi les différentes populations de cellules régulatrices, les Treg coexprimant le CD4, le CD25 et le Foxp3 jouent un rôle fondamental dans le maintien de la tolérance à l'égard des Ags du soi et dans la prévention de maladies auto-immunes (21). Foxp3 est un facteur de transcription essentiel au fonctionnement de ces cellules (22). Il est fortement

exprimé dans les organes lymphoïdes, tels que le thymus et la rate, et dans les Treg CD4⁺CD25⁺ (23, 24). En absence de celui-ci, les Treg CD4⁺ CD25⁺ ne peuvent modérer le système immunitaire et on note l'apparition de réactions auto-immunes sévères (25). L'action régulatrice de ces cellules semble surtout dépendre de l'établissement de liaisons directes avec les cellules cibles via les molécules de surface CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) et TGF-β (*tumor growth factor-beta*) membranaire (8, 26). Par ailleurs, la production de cytokines anti-inflammatoires solubles, telles que l'interleukine 10 (IL-10) et le TGF-β, est essentielle au maintien de l'homéostasie par les Treg (27). Les Treg CD4⁺CD25⁺ provenant de souris déficientes en IL-10 inhibent moins efficacement la prolifération de cellules T effectrices que les Treg provenant de souris IL-10^{+/+} (21).

3) Les deux moyens précédents servent à prévenir l'activation des lymphocytes autoréactifs. Or, comme la tolérance centrale, ils ne sont pas infaillibles. Afin de maintenir l'homéostasie, il existe un mécanisme de délétion clonale secondaire à l'activation des cellules autoréactives. Ce dernier repose sur l'interaction entre 2 molécules de surfaces, Fas et FasL (28). En effet, l'engagement de Fas, exprimée sur une grande variété de cellules humaines, par FasL, exprimé à la surface des cellules lymphocytaires activées, induit l'apoptose des cellules activées autoréactives (29).

4) Un autre mécanisme de régulation de la réponse immunitaire face aux antigènes du soi repose sur la présence de sites immuns privilégiés. Ces derniers, tels que les yeux, les testicules et le cerveau, sont mécaniquement isolés des cellules du système immunitaire (8). Il y a ainsi présence de séquestration antigénique. Par ailleurs, les tissus de ces sites expriment une variété de molécules anti-inflammatoires et

immunosuppressives telles que le FasL, le TGF- β et le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (30).

5) L'activation de cellules T suite à la reconnaissance d'un Ag du soi mène généralement à l'élaboration d'une réponse immune de type Th1. Cette réponse implique un grand nombre de molécules et cellules pro-inflammatoires et elle est associée à la physiopathologie des maladies telles que la sarcoïdose, l'athérosclérose, la maladie de Crohn et diverses pathologies auto-immunes organes-spécifiques (12). Cependant, la reconnaissance d'Ags du soi peut aussi être associée à une suppression de la réponse immune Th1 et favoriser le développement d'une réponse Th2 ou Th0 moins néfaste. Ce phénomène de déviation immunitaire est dû à la sécrétion locale de cytokines associées à l'induction d'une réponse Th2 telles que l'IL-4. Cette dernière cytokine inhibe aussi le développement de la réponse Th1 (31).

La tolérance orale

À l'opposé des modèles de tolérance centrale et périphérique qui permettent une diminution de la réponse immunitaire envers des Ags spécifiques du soi, la tolérance orale implique des Ags exogènes. Effectivement, elle permet la modulation de la réponse immunitaire tant humorale que cellulaire face à un Ag soluble, d'origine alimentaire par exemple, introduit oralement (32). Cette forme de tolérance est essentielle à l'établissement d'une relation symbiotique entre le système immunitaire de la muqueuse digestive et la flore intestinale, environ 10^{14} bactéries (33). Cependant, cet état de tolérance doit permettre rapidement l'élaboration d'une

réponse immunitaire efficace suite à l'introduction de microorganismes pathogènes. L'induction d'un état de tolérance orale dépend étroitement d'interactions complexes entre la flore intestinale, les Ags présents au niveau de la lumière intestinale et les cellules épithéliales de l'intestin (34). Le rôle des cellules épithéliales n'est pas seulement de former une barrière physique entre la lumière intestinale et l'organisme, mais repose aussi sur la sécrétion de différents médiateurs immunologiques ayant pour but de favoriser : 1) le développement de CPAs capables d'induire la tolérance envers des Ags alimentaires et de la flore commensale, 2) l'anergie des cellules immunitaires telles que les lymphocytes et 3) la formation de cellules régulatrices (34).

D'autre part, la sécrétion IgA, au niveau de la lumière intestinale, aide à la prévention de bactériémie associée à la translocation de bactéries commensales (35). Les IgA intestinaux sont majoritairement produit par les plasmocytes retrouvés dans la lamina propria (LP) et l'induction de ces cellules est largement dépendante de la flore intestinale (36). L'absence de microorganismes intestinaux chez la souris est associée à une hypoplasie des plaques de Peyer (PPs) et à une diminution du nombre de cellules T et de plasmocytes intestinaux (37). Or, la production d'IgA n'est que partiellement induite par les lymphocytes T. En effet, une quantité significative des IgA sécrétées au sein de la lumière intestinale est produite en réponse aux microorganismes présents dans l'intestin selon un mécanisme indépendant de l'action des cellules T (38).

Depuis peu, le système digestif est considéré comme une zone immunitaire privilégiée, puisqu'il permet la cohabitation d'Ags et de microorganismes exogènes

en absence de réaction inflammatoire qui aurait comme conséquence de nuire aux fonctions physiologiques de l'intestin (33). Ainsi, le bris de tolérance envers la flore commensale est associé à diverses pathologies telles que la maladie de Crohn, caractérisée par un excès de cytokines pro-inflammatoires, interféron gamma (IFN- γ) et TNF- α , au niveau de la paroi intestinale (39, 40). La colite ulcéreuse est aussi causée par cette rupture de tolérance et elle est associée à une surproduction de cytokines Th2, IL-4 et IL-13, par les lymphocytes T CD4⁺ et par les cellules NK T retrouvées dans la LP intestinale (40). Par ailleurs, cette rupture de tolérance favorise aussi le bris de la tolérance face aux aliments. Ce bris est le principal responsable des allergies alimentaires (41). En effet, il a été démontré que la suppression de la flore intestinale favorise le développement d'allergies alimentaires (42, 43). Ces dernières sont associées à une réponse immunitaire de type Th2 IgE dépendante (44).

Les tissus lymphocytaires associés à l'intestin

Comme il a été vu précédemment, la muqueuse intestinale est constamment en contact avec des Ags exogènes d'origine alimentaire ou microbienne (commensales et/ou pathogènes). Cette exposition est telle que plus de la moitié des lymphocytes circulant en périphérie se retrouvent soit dans la muqueuse intestinale ou dans les tissus lymphocytaires associés à l'intestin (45). Ces derniers incluent principalement les PPs, les ganglions mésentériques (MLNs) et aussi une couche de la paroi intestinale, la LP, riche en lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques.

Les PPs sont retrouvées au niveau de la sous-muqueuse du petit intestin et sont principalement composées de follicules de cellules B agrégés. Entre ceux-ci, on

retrouve des régions riches en lymphocytes T (39). Les PPs sont séparées de la lumière intestinale par un épithélium particulier. Cet épithélium associé aux follicules (EAF) se présente comme une région à faible densité de vili et à faible concentration d'enzymes digestives (39). Entre cet épithélium et les nombreux follicules de cellules B, on retrouve le dôme sous-épithélial, région riche en CPAs, cellules T et B (39, 46). L'importance des populations de CPAs n'est pas sans lien avec le rôle des PPs au niveau du système immunitaire de l'intestin. Les cellules M, retrouvées au niveau de l'EAF, ont la capacité de délivrer des Ags et des microorganismes présents dans la lumière intestinale, via des vésicules de transport, aux DCs du dôme sous-épithélial (46-48). Cependant, les PPs ne sont pas essentielles à l'induction d'un phénomène de tolérance ni au développement d'une réponse immunitaire protectrice (39, 49).

À l'opposé, les MLNs sont indispensables à l'induction de la tolérance orale (48). De plus, ils servent de transition entre le système immunitaire digestif et systémique. Ceci est corrélé avec l'expression conjointe, à la surface des cellules lymphocytaires, de molécules d'adhésion spécifiques aux muqueuses digestives ($\alpha 4\beta 7$) et aux organes lymphoïdes périphériques (L-Selectine) nécessaires à l'accumulation des lymphocytes dans les MLNs (39). En absence d'inflammation, la très grande majorité des Ags provenant du système digestif n'entreront pas dans la circulation systémique (34). Ils seront principalement retrouvés au niveau des MLNs où ils vont être présentés par les DCs aux cellules T $CD4^+$ naïves. Différentes voies permettent l'arrivée des Ags intestinaux aux MLNs. Effectivement, 1) les cellules M de l'EAF peuvent aller capter dans la lumière des Ags et/ou des microorganismes et les

transférer aux DCs présentes dans le dôme sous-épithélial qui pourront soit activer les lymphocytes présents au niveau des PPs ou migrer jusqu'aux MLNs via les vaisseaux lymphatiques. Les Ags transportés par les cellules M, peuvent aussi atteindre les MLNs directement via la lymphe. Par ailleurs, le passage des Ags est aussi observé à l'extérieur des PPs. 2) Les DCs situées dans la LP et dans les PPs peuvent, par la formation de pseudo jonctions serrées et de dendrites, directement capturer des Ags se trouvant dans la lumière intestinale et par la suite migrer vers les MLNs (34, 39, 41, 50, 51).

Les cellules dendritiques de l'intestin

Un grand nombre des types cellulaires est impliqué dans les processus de capture, de présentation des antigènes intestinaux et d'induction d'une réponse immunitaire adéquate (tolérance vs inflammatoire). Cependant, les DCs, sentinelles du système immunitaire, sont les seules cellules capables d'activer les lymphocytes T naïfs. Au niveau du système digestif, elles permettent le développement de la tolérance envers la flore commensale et les Ags alimentaires, et l'élaboration d'une réponse protectrice contre les microorganismes digestifs pathogènes (52, 53). Cette polyvalence semble dépendre largement de l'environnement local dans lequel elles se trouvent, des précurseurs dont elles proviennent et de leur stade de maturation (54).

Au niveau des tissus lymphocytaires associés à l'intestin, on retrouve un grand nombre de sous-populations de DCs réparties différemment. La classification de ces sous-populations repose sur l'expression de différents récepteurs cellulaires à leur surface. Ainsi, on en retrouve principalement trois sous-populations dans les PPs qui

possèdent des fonctions et des localisations propres. Les DCs myéloïdes, $CD11c^+ CD11b^+ CD8^-$, sont majoritairement présentes au niveau du dôme sous-épithélial et une fois activées, sécrètent surtout du TGF- β et de l'IL-10 (55, 56). Cette dernière est une importante cytokine anti-inflammatoire inhibant partiellement la production de cytokines Th1, l'expression du CMH classe II et les molécules de costimulations sur les CPAs (57). De plus, l'IL-10 est essentielle au maintien de la tolérance des cellules T envers les bactéries de la flore commensale. L'absence d'IL-10 provoque, chez la souris, une colite létale (58). Le TGF- β est aussi un acteur important dans l'induction de la tolérance orale en favorisant la conversion des cellules T en cellules Treg (59). À l'opposé de ces dernières DCs, les DCs dites doubles négatives (DN), $CD11c^+ CD11b^- CD8^-$, localisées dans le dôme sous-épithélial, produisent davantage d'IL-12, une cytokine pro-inflammatoire favorisant l'activation des lymphocytes T et la sécrétion IFN- γ par ceux-ci (55, 56). On retrouve aussi ces DCs, en faible proportion, associées à l'EAF et aux espaces interfolliculaires (52). Les DCs lymphoïdes, $CD11c^+ CD8^+ CD11b^-$, présentes surtout au niveau des espaces interfolliculaires, sécrètent aussi principalement de l'IL-12 (55, 56). Cette ressemblance avec les DN n'est pas anodine. En effet, lors d'une infection au réovirus, les DN captent les Ags viraux provenant des cellules épithéliales infectées mortes et induisent une réponse Th1 (60). Or, bien qu'absentes du dôme sous-épithélial, les DCs lymphoïdes présentent aussi les peptides viraux (60). Pour certains, ceci peut signifier que les DCs $CD8^+$ proviennent de la maturation des DN, alors que d'autres mentionnent que ces dernières transfèrent les Ags viraux aux $CD11c^+ CD8^+$.

Au niveau de la LP, certains auteurs prétendent qu'on retrouve sensiblement les mêmes trois sous-populations de DCs que celles présentes dans les PPs (61). Or, certaines études rapportent l'absence de CD11c⁺ CD8⁺ dans la LP et démontrent qu'elles proviennent des follicules lymphoïdes isolés, des structures similaires aux PPs intégrés au petit intestin qu'on ne peut retirer facilement contrairement aux PPs. Cependant, les auteurs s'accordent pour affirmer que les DCs de la LP sécrètent d'importantes quantités de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IFN- β (39, 52, 54). Les DCs de la LP sont reconnues comme les principales responsables de l'induction de la tolérance orale face aux Ags alimentaires (62). Cependant, les PPs sont associées à la tolérance envers les bactéries de la flore commensale (52). D'autre part, des études récentes indiquent qu'une sous-population de DCs intestinales expriment le marqueur de surface CD103 et le CD11b, un marqueur des DCs myéloïdes. Les DCs CD103⁺ sont retrouvées principalement dans la LP et elles sont impliquées dans la présentation des Ags oraux et l'induction de cellules T effectrices (63).

Les MLNs sont le siège de la réponse immunitaire intestinale. Par conséquent, il n'est pas surprenant qu'on y retrouve des DCs provenant à la fois de la LP, des PPs et de la circulation sanguine. Effectivement, Jang et coll. ont démontré que principalement 2 sous-populations de la LP migrent vers les MLNs, soit les CD11c⁺CD8 α ^{int}CD11b⁻ α L^{lo} β 7^{hi} et les CD11c⁺CD8 α ⁻CD11b^{hi} α L^{lo} β 7^{hi}, et que cette migration est CCR7 dépendante (64). Par ailleurs, ils démontrent aussi que les DCs CD11b⁺ (CD11c⁺CD8 α ⁻CD11b^{hi} α L^{lo} β 7^{lo}) et les DCs CD8⁺ (CD11c⁺CD8 α ^{int}CD11b⁻ α L^{int} β 7^{int}) provenant des PPs migrent aussi vers les MLNs, mais cette fois ce

phénomène n'est que partiellement contrôlé par le CCR7 (64). Outre les DCs décrites, il y a de plus en plus d'évidence de l'existence d'une autre sous-population de DCs non myéloïdes présente au niveau de la LP, des les PPs et des MLNs. Les DCs plasmacytoïdes (pDCs), découvertes initialement chez l'homme, contribuent à l'immunité innée antivirale via la production d'IFN de type 1 (65, 66). De plus, elles peuvent participer à la réponse immune adaptative tant Th1 que Th2 en fonction de l'environnement local (67). Les pDCs ne semblent cependant pas circuler de l'intestin vers les MLNs, Mise à part leur rôle important dans la protection contre l'asthme, leur contribution dans la tolérance orale est méconnue (68).

Les mécanismes de la tolérance orale

Les mécanismes cellulaires permettant l'induction de la tolérance orale sont les mêmes que ceux utilisés lors de l'induction de la tolérance périphérique envers les Ags du soi. Ainsi, en absence de signaux de costimulations lors de la présentation de l'Ag aux cellules T, ces dernières deviennent anergiques. L'induction des cellules T anergiques dépend surtout des différentes sous-populations de DCs intestinales immatures, mais aussi des cellules épithéliales de l'intestin (34, 46). En effet, les entérocytes expriment à leur surface des molécules de classe II du CMH, leur permettant de présenter des Ags de la lumière intestinale, mais n'expriment aucune molécule de costimulation permettant l'activation des cellules T présentes au niveau de la LP (39, 44).

La réponse immunitaire intestinale est aussi balancée par la présence de cellules T régulatrices. Au niveau de l'intestin, plusieurs populations de cellules régulatrices

interagissent. Leur classification repose principalement sur leur profil de sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et le TGF- β . Ainsi, les T reg dites Th3 sécrètent davantage de TGF- β , IL-10 et d'IL-4 ce qui a pour effet de supprimer l'activation tant des cellules Th1 que Th2 et de favoriser la production d'IgA par les cellules B (69, 70). Les régulatrices Tr1, qui sécrètent davantage d'IL-10, semblent jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire contre la flore commensale (69). Par contre, ces deux types de cellules régulatrices demeurent peu étudiés et leur implication dans l'induction et le maintien de la tolérance orale sont incertains. À l'inverse, les Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ sont essentielles au maintien de la tolérance à la flore bactérienne et aux Ags oraux (71, 72). De récentes découvertes ont démontré que les DCs CD103⁺, et non les CD103⁻ des MLNs, sont capables d'induire la conversion de cellules T naïves en cellules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, probablement via TGF- β (73). Par ailleurs, le transfert de Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ permet la guérison d'une forme expérimentale de colite induite par le transfert de cellules T CD4⁺CD25⁻ chez la souris. Lors de la guérison, il y a une forte concentration de cellules régulatrices dans la LP (74, 75).

CD47

L'inhibition de l'activation et de la prolifération des cellules T semble aussi associée à la glycoprotéine de surface CD47. La liaison de cette dernière par un anticorps monoclonal ou par la thrombospondine (TSP), un ligand naturel de CD47, induit l'anergie des cellules T humaines naïves (76). Par ailleurs, cette interaction à la

surface des cellules T favorise la conversion des cellules T mémoires et naïves en cellules T régulatrices CD25⁺CD44⁺Foxp3⁺ (77).

Exprimée de façon ubiquitaire, la molécule CD47, une glycoprotéine membranaire d'environ 50 kDa, demeure relativement méconnue d'un point de vue fonctionnel. Membre de la superfamille des immunoglobulines, CD47 possède un domaine extracellulaire, fortement glycosilé, caractérisé par sa ressemblance à la région variable des immunoglobulines, un domaine transmembranaire à 5 passages et une courte extrémité C-terminale de taille variable, entre 3 et 36 acides aminés (76). Cette extrémité peut, selon un phénomène d'épissage alternatif, être présente sous 4 isoformes. La forme 2, exprimée principalement par les cellules hématopoïétiques, est la plus fréquente (78). Outre l'isoforme exprimé, le mode d'engagement du CD47 (ligands fixes ou solubles), sa localisation à la surface cellulaire et sa conformation avec ses ligands (cis ou trans) influencent le rôle du CD47 (76).

Connu, aussi, sous le nom d'IAP (*Integrin associated protein*), CD47 est physiquement et fonctionnellement associé à diverses intégrines dont le récepteur de la vitronectine, $\alpha_v\beta_3$ (79). CD47 possède trois ligands, soit les protéines transmembranaires régulatrices de signaux SIRP- α et SIRP- γ et la TSP-1, une protéine de la matrice extracellulaire (80, 81). SIRP- α est exprimée par les cellules de lignées myéloïdes et neuronales et SIRP- γ est exprimée par les cellules lymphocytaires et NK (82). L'interaction entre CD47 et ces différents ligands engendre différentes activités anti-inflammatoires. En effet, il a été démontré que l'engagement de CD47 par la TSP, chez des cellules humaines purifiées, induit la suppression de la production d'interleukine 12 (IL-12) par les DCs et les monocytes

(83). De plus, la réponse des cellules T à l'IL-12 est inhibée ainsi que le développement des cellules Th1 (84). Cette inhibition ne favorise cependant pas le développement d'une réponse immune de type Th2 (84). À l'inverse, l'absence de CD47 sur des splénocytes murins conduit à une production accrue d'IL-12 par les DCs et d'IFN- γ par les cellules T (85). CD47 permet, aussi, l'activation d'un phénomène de mort cellulaire programmée, de type III, indépendante de l'action des caspases. Découverts dans notre laboratoire, suite à l'engagement, par la TSP, du CD47 exprimé sur des cellules B associées aux leucémies lymphocytaires chroniques (B-CLL), les mécanismes régulant cette mort cellulaire programmée de type III sont peu connus (86-88).

D'autre part, CD47 est considérée comme un marqueur du soi tant chez les cellules immunologiques et non immunologiques. Son interaction avec SIRP- α , exprimée sur les macrophages et les DCs, induit un signal négatif inhibant l'élimination des cellules hématopoïétiques fonctionnelles (89, 90). Au niveau pulmonaire, CD47 est impliquée dans la maintenance de l'homéostasie, dans la maturation des DCs et dans la production des cytokines pro-inflammatoires (91, 92). L'interaction CD47/SIRP- α est aussi associée à la migration transépithéliale des neutrophiles. D'ailleurs, on observe *in vivo* un retard dans la migration des neutrophiles chez des souris déficientes en CD47 suite à l'inoculation intrapéritoniale d'*Escherichia coli* (93). L'extravasation des neutrophiles dans le cerveau est aussi tributaire de la présence du CD47 et suite à l'induction d'une ischémie cérébrale transitoire chez la souris CD47 déficiente, on observe une réduction de la zone d'infarctus (94). De plus, cette interaction avec SIRP- α inhibe, en conditions inflammatoires, la migration des

cellules de Langerhans (LCs) de l'épiderme aux ganglions drainant la peau ainsi que leur activation et, par conséquent, induit une inhibition de la réponse d'hypersensibilité de contact (95). L'interaction TSP-1 et CD47 est, aussi, associée en période de stress à la régulation de la pression sanguine périphérique et à une activité vasopressive afin de maintenir l'hémodynamie corporelle (96).

C'est dans cette optique que nous formulons l'hypothèse selon laquelle CD47 participe au maintien et, peut-être, à l'établissement de la tolérance. Nous étudierons plus particulièrement le rôle du CD47 dans l'induction de tolérance orale à l'aide de souris déficientes en CD47. De plus, il est probable que cette molécule influence positivement la migration des DCs périphériques et intestinales.

Matériel et méthodes

Souris

Les souris CD47 déficientes (CD47^{-/-}) proviennent d'un croisement de 16^e à 18^e générations de souris BALB/c offertes généreusement par le Dr Oldenborg (Department of Integrative Medical Biology, Section for Histology and Cell Biology, Umeå University, Umeå, Sweden). Les souris BALB/c exprimant le TCR DO11.10, lequel est spécifique pour les résidus peptidiques 323-339 de l'ovalbumine (OVA), proviennent, comme les souris BALB/c CD47^{+/+}, des Laboratoires Charles-Rivers. Les souris BALB/c CD47^{-/-} DO11.10 proviennent d'un croisement que nous avons réalisé. Toutes les souris avaient entre 8 et 12 semaines et ont été maintenues en absence de pathogènes spécifiques (*SPF conditions*). Tous les protocoles ont été approuvés par le conseil canadien de protection des animaux et le centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

Purification des leucocytes de la rate, des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques, et cytométrie en flux

Les différents organes ont été injectés avec 1 ml de libérase à 0,4 mg/L (Roche) et/ou émincés et mis en présence de libérase à 0,4 mg/L pendant 15 minutes à 37 °C, puis ils ont été filtrés avec un filtre de nylon de 70 µm. Afin d'induire la lyse des globules rouges de la rate, nous avons utilisé du NH₄Cl. La caractérisation des cellules par cytométrie en flux a été faite avec un appareil FACSCalibur (Becton Dickinson) et analysée avec le logiciel CellQuest. Les anticorps proviennent de chez Becton

Dickinson, sauf l'anti-I-E (14.4.4S3) et l'anti-CD11c (N418) qui ont été purifiés au laboratoire. L'anti KJ1.26, servant à l'identification des cellules T DO11.10 provient des Laboratoires Caltag.

Sensibilisation active au FITC

L'abdomen des souris a été rasé puis 100 μ L d'une solution de FITC (Sigma-Aldrich) à 1 % ou de la solution contrôle (1:1 v/v acétone et dibutylphtalate) ont été appliqués. 24 ou 72 heures après, les ganglions lymphatiques inguinaux ont été analysés par cytométrie en flux. Les colorations nécessaires à l'identification des cellules B, T et dendritiques ont été réalisées. Lors des expériences utilisant le CD47-Fc, les souris ont reçu 50 μ g de la protéine de fusion CD47-Fc ou Ctrl-Fc 1 heure avant la sensibilisation au FITC.

Transfert adoptif

Nous avons préparé une suspension cellulaire à partir de la rate et des ganglions lymphatiques périphériques provenant de souris DO11.10 CD47^{+/+} ou CD47^{-/-}. Nous avons, ensuite, purifié les cellules T CD4⁺ par sélection positive en utilisant des billes immunomagnétiques (EasySep; StemCell Technologies). La pureté est > 96 % telle que déterminée par cytométrie en flux. Les cellules CD4⁺ sont par la suite marquées au CFSE et 3 x 10⁶ de ces dernières provenant de souris DO11.10 CD47^{+/+} ou CD47^{-/-} sont injectées i.v. à des souris BALB/c ou CD47 déficientes. 24h post-injection, les souris ont reçu par voie intragastrique (i.g.) 100 mg d'OVA (Sigma-

Aldrich) dans 300 μ L de PBS ou 300 μ L de PBS. Une aiguille à gavage incurvée de 20 G en métal à bout arrondi a été utilisée. 40 ou 64h post gavage, les MLNs, les ganglions périphériques et la rate ont été prélevés et analysés par cytométrie en flux.

Hypersensibilité de type retardée à l'OVA

Les souris BALB/c et CD47 déficientes ont reçu par voie i.g. 100 mg d'OVA dans 300 μ L d'PBS ou 300 μ L d'PBS. 19 jours après, 300 μ g d'OVA dans 200 μ L de CFA (MP Biomedicals)/H₂O (1:1) ont été injectés s.c.. 12 jours suivant cette immunisation, une injection de rappel a été réalisée par voie s.c. au niveau du coussinet plantaire droit avec 50 μ g d'OVA dans 20 μ L d'H₂O et au niveau du coussinet gauche avec 20 μ L de d'H₂O. La réponse d'hypersensibilité de type retardée OVA-spécifique est déterminée par l'enflure du coussinet plantaire 50 heures post immunisation. L'épaisseur est mesurée à l'aide d'un micromètre numérique (Mitutoyo).

Immunisation *in vivo* de souris non manipulées

Réponse humorale *in vivo* : Le niveau de différentes immunoglobulines OVA spécifiques ou non, en conditions non inflammatoires ou post-immunisation, provenant de souris CD47^{+/+} ou CD47^{-/-} a été quantifié par ELISA. L'induction de la réponse immune primaire et secondaire a été réalisée par l'administration i.p., aux jours 0 et 35, respectivement, de 50 μ g d'OVA dans du CFA ou avec de l'alum (Pierce). Les Acs IgG1 et IgG2a OVA spécifiques induits lors de la réponse primaire

et secondaire ont été quantifiés par ELISA à partir du sérum collecté 35 jours post immunisation primaire et 8 jours post immunisation secondaire respectivement.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel InStat de GraphPad Software. Sauf en cas d'avis contraire, les barres d'erreur représentent la déviation standard (SD).

Résultats

La migration des DCs de la peau est dépendante de l'expression du CD47

Il a été démontré que les interactions CD47/CD47 et CD47/SIRP- α ont un rôle au niveau de la migration des leucocytes (97, 98). Ces interactions pourraient aussi être impliquées dans l'activation et la migration des DCs (CD11c⁺IE^{high}) présentes au niveau de l'épiderme (LCs) et du derme (dDC) (92, 98). Afin de démontrer l'influence réelle de CD47 dans la migration de celles-ci vers les ganglions drainants lymphatiques, nous avons déterminé leur proportion et leur nombre dans les ganglions drainants la peau chez la souris CD47^{-/-}. Nous avons observé une diminution d'environ 67 % du nombre de CD11c⁺IE^{high} et leur proportion a diminué dans une commune mesure (0,3 % à 0,1 %) chez la souris CD47^{-/-} (figure 1A et B). Par ailleurs, l'expression de CCR7, une protéine impliquée dans la migration des DCs, n'est pas influencée significativement par l'absence de CD47 sur les cellules CD11c⁺IE^{high} (figure 1A).

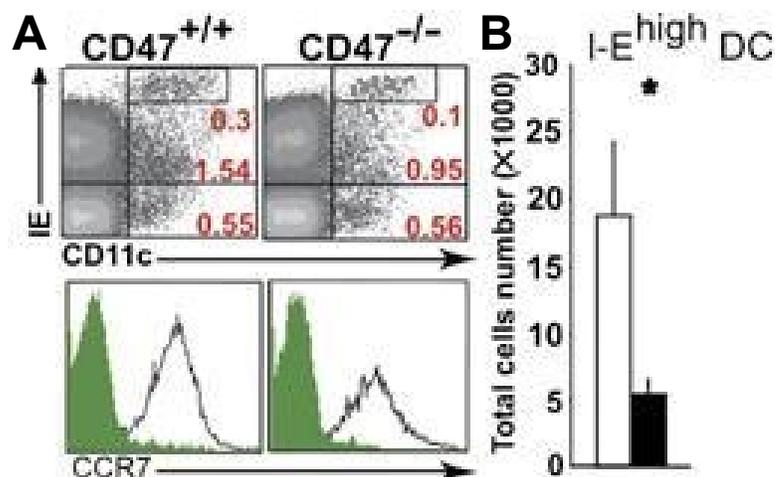


Figure 1 : L'effet associé à une déficience en CD47 sur la migration des DCs de la peau. (A) L'analyse d'une suspension cellulaire provenant des ganglions drainants la peau en fonction de l'expression de CD11c, I-E et CCR7. (B) La proportion de DCs I-E^{high} dans les ganglions drainants la peau. Les données montrées sont représentatives de 5 analyses distinctes faites à partir de suspensions cellulaires provenant de souris différentes. *p < 0,05.

Afin d'évaluer les conséquences de l'absence de CD47 en condition inflammatoires, des souris sont sensibilisées par l'application sur l'abdomen de fluorescéine isothiocyanate (FITC). Cette technique est souvent utilisée pour induire une migration des DCs de la peau vers les ganglions lymphatiques drainants. Tout d'abord, contrairement à ce qui a été observé chez la souris BALB/c, nous n'avons pas constaté de recrutement significatif de cellules dans les ganglions drainants lymphatiques prélevés chez les souris CD47 déficientes sensibilisées au FITC (figure 2A). De même, l'absence de CD47 interfère avec le recrutement des lymphocytes T et B (figure 2A). La diminution significative de la proportion relative des DCs transportant le FITC aux ganglions drainants s'accompagne d'une réduction du nombre absolu de ces cellules (figure 2B). Le défaut précoce (24h) de migration observé et le défaut tardif (72h) sont secondaires à la diminution respective du

recrutement des dDCs et LCs (99). La diminution du nombre de DCs $CD11c^+IE^+FITC^+$ est plus marquée à 72h qu'après 24h (3,1 vs 5,1) (figure 2B). Ces résultats suggèrent que l'absence de CD47 affecte de manière prédominante la migration des LCs.

Dans le but d'évaluer l'importance de l'interaction CD47/SIRP- α dans la migration des DCs chez les souris BALB/c, des injections intradermiques de CD47-Fc et de protéines de fusion contrôles ont été faites une heure avant la sensibilisation au FITC. Le traitement au CD47-Fc a permis une réduction significative du nombre de DCs $CD11c^+IE^+FITC^+$ épidermiques (72h) et dermiques (24h) (figure 2C). Ces résultats sont exprimés selon le ratio DCs $CD11c^+IE^+FITC^+/CD11c^+IE^+$ totales afin d'éliminer la variabilité initialement observée qui était causée par la différence de cellules contenues dans les ganglions drainants provenant des souris BALB/c $CD47^{+/+}$ et $CD47^{-/-}$. À l'inverse des résultats obtenus chez la souris BALB/c $CD47^{+/+}$, l'injection au préalable de la protéine de fusion CD47-Fc n'est pas associée à une inhibition de la migration des DCs à 24 et 72h dans la souris $CD47^{-/-}$ (figure 2C et données non montrées). Ces résultats suggèrent que CD47-Fc vient probablement briser la liaison CD47/SIRP- α établie entre les DCs et leur environnement plutôt que d'engager directement le SIRP- α et de délivrer un signal inhibiteur.

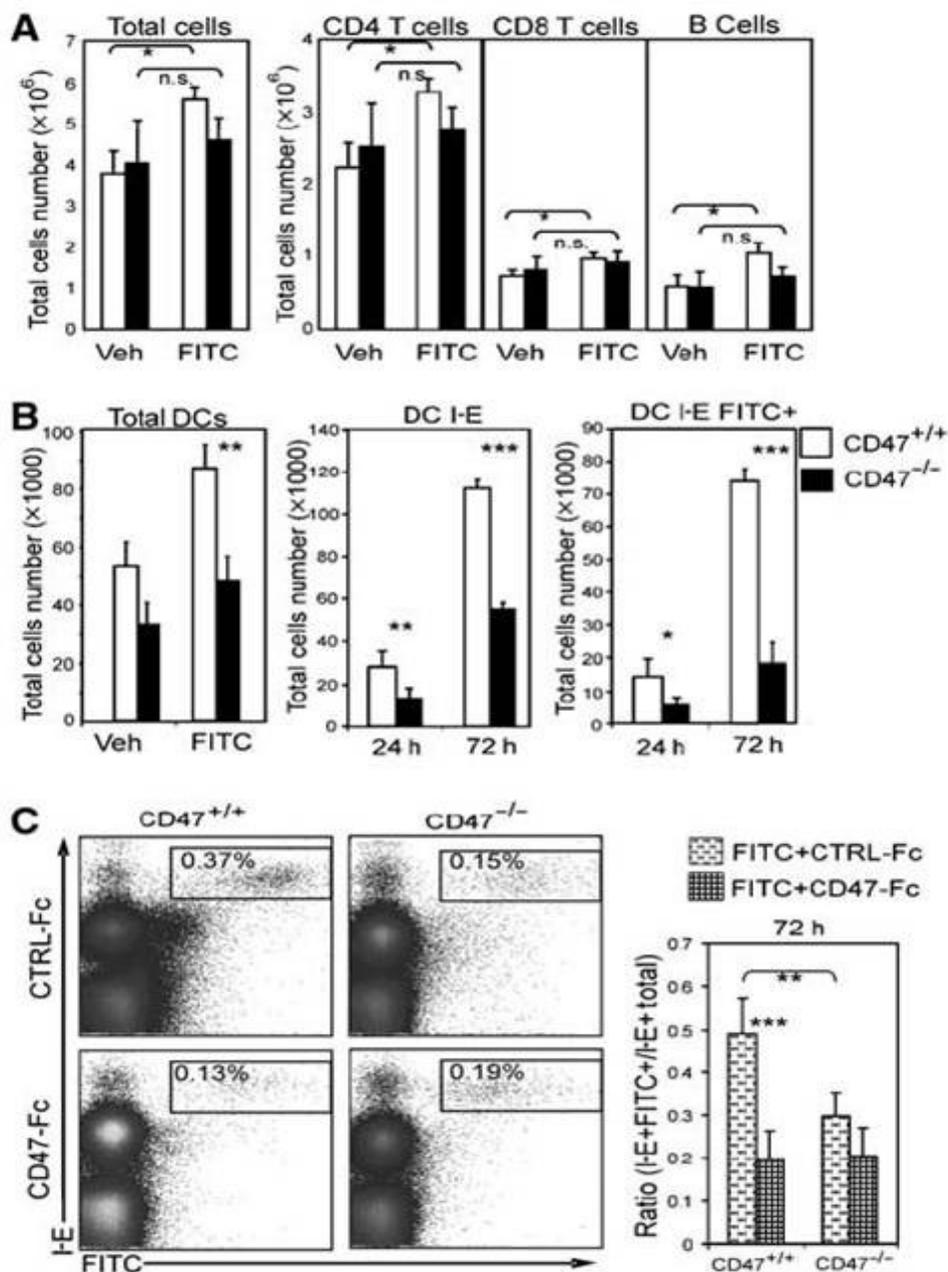


Figure 2 : En conditions inflammatoires, l'interaction entre CD47 et SIRP- α est nécessaire à la migration des DCs de la peau. (A) Représentation des différentes populations cellulaires retrouvées dans les ganglions drainants 24h après une sensibilisation au FITC. (B) Nombre total de DCs dans les ganglions drainant (24h) et le nombre de DCs CMH-I-E⁺ et CMH-I-E⁺ exprimant le FITC. (C) Proportion des DCs CMH-I-E⁺ FITC⁺ dans les ganglions (72h) suite à l'administration intradermique de CD47-FC ou CTRL-FC 60 minutes avant la sensibilisation au FITC. Les données présentées sont représentatives d'un minimum de 5 analyses distinctes de ganglions provenant de souris différentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

L'absence de CD47 influence négativement la prolifération des cellules T dans les MLNs

Nous avons postulé que les défauts de migration des DCs démontrés au niveau cutané, qui étaient observés chez la souris déficiente en CD47 à l'homéostasie et en conditions inflammatoires (sensibilisation au FITC), pouvaient être également mis en évidence au niveau intestinal. En effet, l'activation d'une réponse immunitaire protectrice et l'induction de tolérance orale dépendent largement de la migration des DCs entre la LP et les MLNs (48). Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle, l'absence de CD47 interfère avec le transport des antigènes intestinaux vers les ganglions drainants et par conséquent avec l'activation des cellules T Ag spécifiques présentes dans les MLNs, nous avons procédé au transfert adoptif de cellules T OVA-spécifiques, exprimant le transgène DO11.10, puis analysé leur prolifération suite à l'administration d'OVA par gavage (i.g.). À 64h après le gavage, une proportion plus importante de cellules T CD47^{+/+}CD4⁺ OVA-spécifiques non divisées, indiquant une prolifération cellulaire diminuée, est observée lorsqu'elles sont transférées dans un hôte déficient en CD47 comparé à un hôte BALB/c (figure 3A). L'observation d'une absence de prolifération, 40h après gavage, dans les hôtes CD47^{+/+} et CD47^{-/-}, indique que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD47^{+/+} dans un hôte CD47^{-/-} ne résulte pas d'une induction précoce de la division cellulaire dans ce dernier (données non montrées). De plus, la vitesse de division cellulaire est comparable dans les deux hôtes (données non montrées). Cependant, lorsqu'on transfère des cellules T CD47^{-/-} OVA-spécifiques dans un hôte déficient en CD47, on observe un profil de division similaire à celui obtenu lors du transfert des

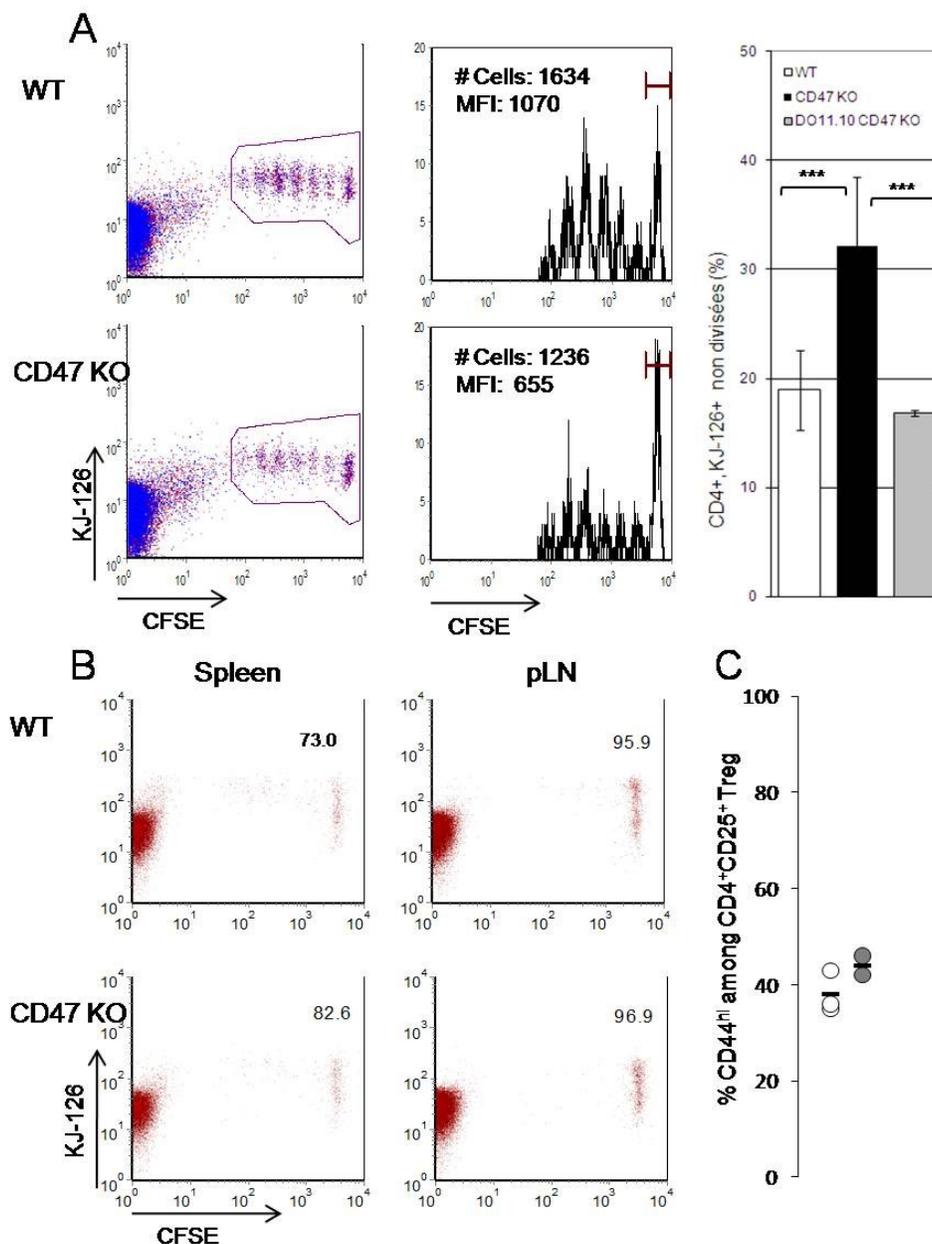


Figure 3 : L'absence de CD47 est associée à une diminution de la prolifération des cellules T CD4⁺ DO11.10 Ag-spécifiques dans les MLNs suite à l'administration orale d'Ag. Représentation des cycles de division cellulaire des lymphocytes T OVA-spécifiques marquées au CFSE retrouvées (A) dans les MLNs, (B) la rate et les ganglions périphériques, 64 h après l'administration intragastrique d'OVA. Le transfert adoptif des cellules T CD4⁺ DO11.10 a été fait 24 h avant l'administration de l'OVA. Les données présentées sont représentatives (A) de 8 ou (B) 2 analyses distinctes de MLNs provenant de souris différentes. (C) Proportions des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ exprimant le CD44^{hi} dans les MLNs. Le nombre de souris par groupe est de 3. ***p < 0,001.

cellules CD47^{+/+} dans un hôte BALB/c CD47^{+/+} (figure 3A et données non montrées). Alors que les cellules CD47^{-/-} sont immédiatement éliminées dans un hôte CD47^{+/+}, elles présentent une survie prolongée dans un hôte CD47^{-/-} (données non montrées, (100)). En outre, certains auteurs prétendent que l'établissement de la tolérance orale se fait au niveau de l'ensemble des organes lymphoïdes (101, 102). Nos observations démontrent cependant une prolifération cellulaire négligeable au niveau de la rate et des ganglions périphériques non drainants 64h après l'administration i.g. d'OVA (figure 3B). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de Worbs et coll., qui a démontré que la réponse aux antigènes intestinaux est initiée dans les MLN. Elle se propage ensuite rapidement dans la rate et les ganglions périphériques suite à la recirculation des lymphocytes T activés dans les MLNs (48). Nous n'avons pas observé de différence quant à la proportion de cellules T régulatrices CD45⁺CD44^{Hi}, retrouvée dans les MLNs des hôtes CD47^{+/+} et CD47^{-/-} (figure 3C). Ces résultats suggèrent, sans le démontrer, qu'un défaut de migration des DCs vers les MLNs pourrait être responsable de la diminution de l'activation des cellules T Ags spécifiques.

CD47 n'est pas essentielle à l'induction de la tolérance orale

Afin de vérifier l'influence d'une diminution de l'activation des lymphocytes T Ags spécifiques observée dans un hôte CD47^{-/-} sur l'induction d'une tolérance orale, nous avons utilisé un modèle classique de réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) à l'OVA. Ce modèle repose essentiellement sur l'activité des cellules T CD4⁺ OVA-

spécifiques chez des souris gavées avec de l'OVA et ensuite immunisées s.c avec du CFA-OVA. Une seconde immunisation à l'OVA s'effectue au niveau du coussinet plantaire selon le protocole d'immunisation établie (figure 4A). L'administration i.g. de 100 mg d'OVA permet d'inhiber de manière importante la réponse d'hypersensibilité dans les deux groupes de souris. Des diminutions significatives moyennes de 71 % et 64 % ont été observées en présence et en absence de CD47 respectivement (figure 4B). Nous avons démontré que l'absence de CD47 n'induit pas de bris de tolérance orale.

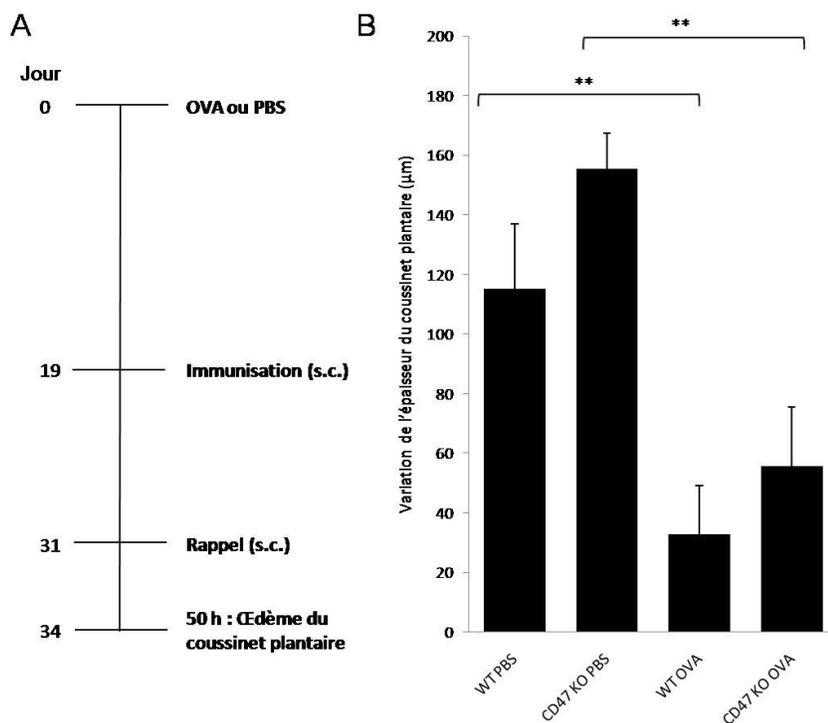


Figure 4 : La présence de CD47 n'est pas essentielle à l'induction de la tolérance orale. Les souris ont reçu 100 mg d'OVA dilués dans du PBS ou uniquement du PBS. 19 jours plus tard, les souris ont été immunisées via l'injection s.c. d'OVA dans une émulsion de CFA/H₂O, puis elles ont été restimulées au jour 31 (voir matériel et méthodes). L'induction de la tolérance orale a été analysée par la mesure de la réaction d'hypersensibilité de type retardée 50 h après le rappel. (A) Représentation schématique du protocole expérimental. (B) Mesure de la réaction d'hypersensibilité. Le nombre de souris par groupe varie entre 4 et 7.

CD47 influence la présence de certaines sous populations de DCs retrouvées dans les MLNs

Les DCs sont la pierre angulaire de l'activation des cellules T naïves et de leur prolifération en réponse aux Ags (103). Elles sont aussi essentielles à l'élaboration de la tolérance orale (39). Étant donné que le CD47 est impliqué positivement dans la migration des DCs de la peau vers les ganglions lymphatiques drainant et influence la prolifération des cellules T OVA-spécifiques dans les MLNs en réponse à l'Ag administré par voie orale, la caractérisation des populations de DCs intestinales s'avère pertinente chez l'hôte BALB/c déficient ou non en CD47.

Suite à la purification des MLNs, nous avons procédé à différents marquages (CD11c, CD8 α , CD11b) afin d'identifier les sous-populations de DCs. Globalement, il n'y pas de différence significative entre le nombre total de DCs dans les MLNs de souris CD47^{+/+} ($1,99 \times 10^5 \pm 1,47 \times 10^5$) et ceux de souris CD47^{-/-} ($1,08 \times 10^5 \pm 0,27 \times 10^5$) (figure 5A). Nous avons, aussi, constaté que la proportion de la population de DCs exprimant le CD8 demeure inchangée dans les deux groupes de souris (figure 5B). À l'inverse, on note une diminution significative de la proportion des DCs exprimant le CD11b (CD47^{+/+} 27,1% \pm 3,5 vs CD47^{-/-} 19,5% \pm 4,2) (figure 5B). Cette diminution se traduit par une hausse significative de la proportion des DN (CD47^{+/+} 49,8% \pm 4,8 vs CD47^{-/-} 60,3% \pm 4,8) (figure 5B). On observe, aussi, une augmentation significative de la proportion pDCs mésentériques CD11c⁺B220⁺ en absence de CD47 (34,5% \pm 9,1 vs 45,6% \pm 9,2) (figure 5D).

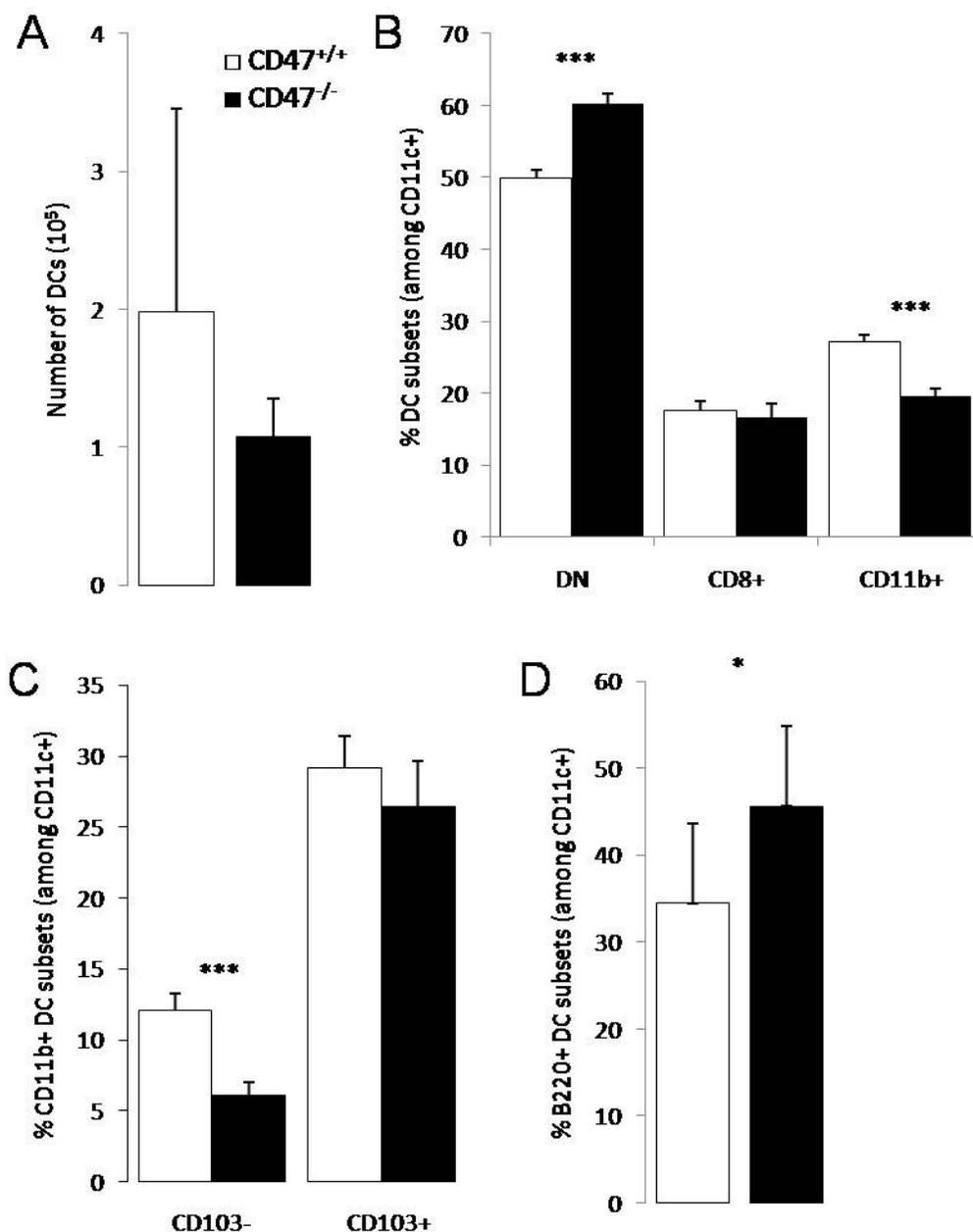


Figure 5 : L'effet associé à une déficience en CD47 sur les différentes populations de DCs présentes dans les MLNs. (A) Nombre total de DCs CD11c⁺. (B) Proportion des cellules DCs CD11c⁺ en fonction de l'expression du CD8 et CD11b. Les DN sont les cellules DCs CD11c⁺CD8⁻CD11b⁻, alors que les DCs CD8⁺ et les CD11b⁺ correspondent aux DCs lymphoïdes (CD8⁺CD11b⁻) et myéloïdes (CD8⁺CD11b⁺) respectivement. (C) Proportion des sous-populations de DCs myéloïde, CD103⁻ ou CD103⁺, et (D) de DCs CD11c⁺ B220⁺ par rapport au nombre total de DCs CD11c⁺ dans les MLNs. Le nombre de souris par groupe varie entre 7 et 15. *p < 0,05, ***p < 0,001.

Parmi les $CD11b^+$, on retrouve en proportion comparable dans les 2 hôtes de DCs $CD11b^+CD103^+$ provenant de la LP et caractérisées par leur forte capacité d'induire des cellules Treg (63). Ces résultats sont en accord avec le pourcentage égal de cellules Treg dans les MLNs provenant d'hôtes $CD47^{+/+}$ et $CD47^{-/-}$. Cependant, on observe une diminution significative de plus de 50 % des DCs $CD11b^+CD103^-$ (figure 5C).

Nous avons démontré, qu'en conditions non inflammatoires, l'absence de CD47 induit dans les MLNs une diminution de la proportion de DCs $CD11b^+$ et, parmi celles-ci, plus particulièrement les DCs $CD11b^+CD103^-$. De plus, une augmentation des DN, comprenant les pDCs, est notée. Alors que nous avons montré une diminution de la prolifération des lymphocytes T Ag spécifiques, nous n'avons, par contre, pas observé de bris de tolérance orale.

L'absence de CD47 induit un biais de type Th1 au niveau de la production Acs

Dans le laboratoire, nous avons aussi rapporté une diminution des DCs $CD4^+CD11b^+$ dans la rate (104). Des études antérieures suggèrent que les DCs dites myéloïdes ($CD4^+CD11b^+$) seraient impliquées dans l'induction d'une réponse de type Th2, alors que les DCs lymphoïdes ($CD8^+$) favorisent le développement d'une réponse Th1. C'est dans ce contexte que nous avons évalué la réponse immunitaire humorale chez les souris déficientes en CD47. Tout d'abord, l'observation des niveaux d'Acs

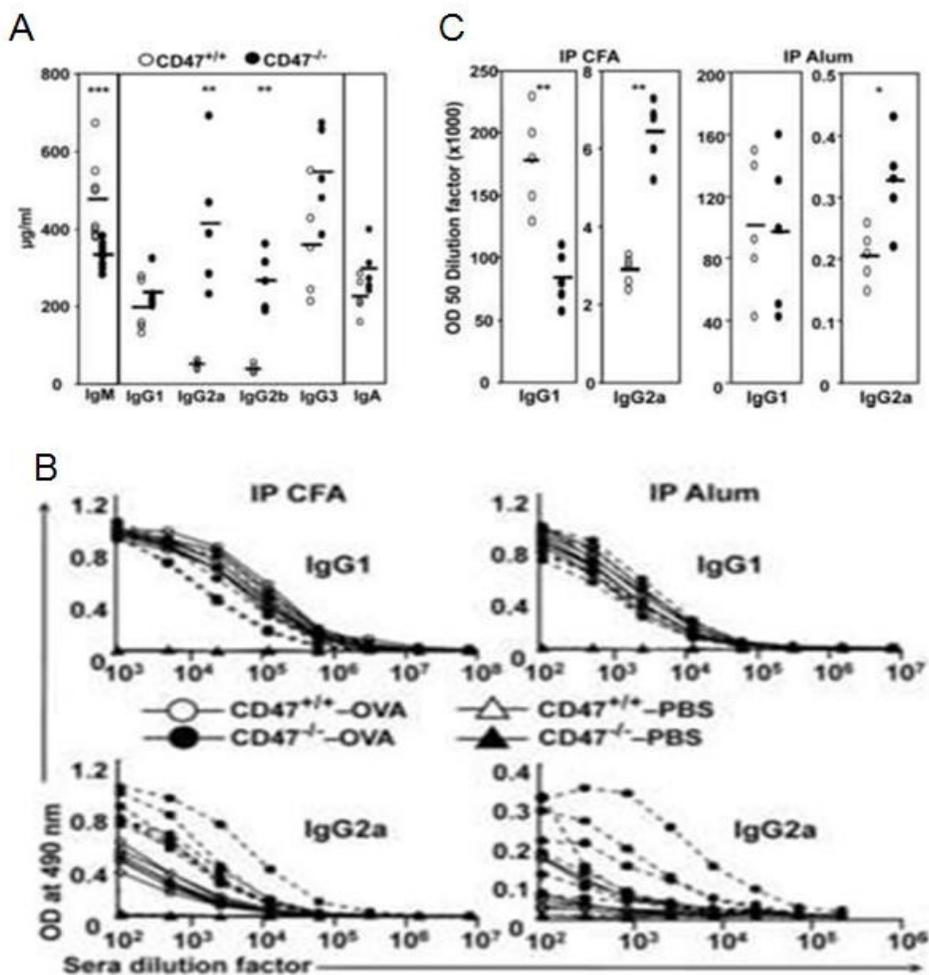


Figure 6 : Présence d'un biais humoral de type Th1 chez la souris CD47^{-/-}. (A) La souris CD47^{-/-} présente une hausse du niveau d'anticorps IgG2a et IgG2b à l'état de base. Le dosage, par ELISA, des différents isotopes d'Igs a été réalisé à partir du sérum de souris femelles âgées entre 6 et 9 semaines. Des données similaires ont aussi été obtenues chez les mâles (données non montrées). La hausse du niveau d'IgG2a est maintenue après immunisation. Des souris femelles ont été immunisées i.p. avec 50 µg d'OVA dans du CFA ou de l'alum. 35 jours plus tard, une seconde immunisation i.p. avec 50 µg d'OVA dans de l'alum ou de l'IFA, si la première immunisation avait été faite avec du CFA, a été réalisée. Le niveau d'Acs OVA-spécifiques présent dans le sérum des souris a été quantifié par ELISA (B) 35 jours après la première immunisation et (C) 7 jours après la dose de rappel. **p < 0,01, ***p < 0,001.

sériques en condition non inflammatoires nous a révélé une augmentation des isotypes IgG2a et IgG2b; 2 isotypes associés à une réponse de type Th1 (figure 6A).

Cependant, les niveaux d'IgG1 et IgG3, Igs associées à un phénotype Th2, mesurés ne diffèrent pas significativement (figure 6A). D'autre part, aucune différence n'a été observée quant à la production IgA sériques présente à l'état de base (figure 6A). Le biais Th1 du profil d'Igs sériques observé à l'état de base est maintenu après immunisation primaire et secondaire (figure 6B et C). En outre, une hausse d'environ 10 fois supérieure au niveau d'Acs IgG2a OVA spécifiques est observée chez les souris CD47^{-/-} par rapport au niveau obtenu chez le modèle CD47^{+/+} lors de l'immunisation par voie i.p. d'OVA dans du CFA (figure 6B). Par ailleurs, ce profil d'Ig Th1 est maintenu suite à l'administration d'OVA dans de l'alum, un adjuvant Th2 (figure 6B). Par contre, des niveaux similaires d'Acs IgG1 Ag spécifiques sont observés 35 jours post immunisation d'une première dose d'OVA combinée avec du CFA ou de l'alum (figure 6B). *In vivo*, l'immunisation primaire d'un Ag soluble entraîne, en absence de CD47, un important biais de la réponse humorale de type Th1, accompagnée d'un retard de la production des Acs de type Th2 (figure 6B et données non montrées).

L'immunisation secondaire d'OVA dans de l'IFA provoque une augmentation du niveau d'IgG2a OVA spécifiques et une diminution significative du niveau IgG1 Ag spécifiques par rapport aux niveaux mesurés en présence de CD47. Ainsi, l'utilisation du CFA suivi de l'IFA comme adjuvant favorise l'établissement d'une réponse de type Th1 et inhibe celle de type Th2 (figure 6C). En outre, l'utilisation de l'alum comme adjuvant permet aussi de favoriser l'établissement d'une réponse

humorale Th1 suite à l'immunisation secondaire d'un Ag soluble. Or, la production d'IgG1 n'est pas affectée lorsqu'on compare les profils d'Abs Ag spécifiques des souris BALB/c CD47^{-/-} à celles CD47^{+/+} (figure 6C). L'absence de CD47 favorise le développement d'une réponse humorale Th1 en conditions non inflammatoires et, aussi, après l'immunisation, avec un Ag soluble, de souris BALB/c reconnues pour leur profil immunologique Th2.

Discussion

Nous avons démontré que la molécule CD47 influence positivement la migration des DCs CD11b⁺, dites myéloïdes, et, par conséquent, cette dernière favorise leur accumulation dans les ganglions drainants la peau. De plus, nos résultats obtenus dans un modèle de transfert adoptif de lymphocytes T suivi d'une immunisation orale suggèrent, de manière indirecte, un défaut de migration des DCs de la muqueuse intestinale vers les MLNs. Par contre, le CD47 n'est pas essentiel pour l'induction de la tolérance orale. L'utilisation d'un modèle de sensibilisation cutanée au FITC a permis de démontrer qu'en conditions inflammatoires, l'absence de CD47 est associée à une diminution de la migration des DCs cutanées. Ce défaut de migration est aussi observé à l'état de base. Par ailleurs, une analyse approfondie effectuée par Van et coll. a démontré que l'expression de CD47 sur les DCs est essentielle au passage de ces cellules au travers des veinules endothéliales et des sinusoides vasculaires permettant leur accumulation dans la rate et les organes lymphoïdes secondaires (104). L'absence de CD47 entraîne une diminution marquée de DCs myéloïdes CD4⁺CD11b⁺ dans la zone marginale de la rate de la souris déficiente en CD47 et une diminution de la proportion des DCs myéloïdes dans les MLNs (104). Dans les ganglions drainants l'intestin, cette diminution affecte particulièrement la sous population de DCs CD103⁻ sans modifier les propriétés migratoire de la sous-population de DCs myéloïdes CD103⁺. La migration des DCs CD103⁺ de la LP vers les MLNs via les vaisseaux lymphatiques est dépendante de l'expression du CCR7 (64, 105). L'absence de CD47 n'a pas d'influence sur l'expression du CCR7 et nous proposons que le passage transendothélial des DCs CD103⁻ requière d'autres

molécules que le CCR7. Jaensson et coll. ont démontré que ces dernières expriment le CD62L et arrivent préférentiellement aux MLNs par la voie hématogène (105). Par ailleurs, il est reconnu que la migration des DCs CD11b⁺ vers le dôme sous-épithélial des PPs se fait via MIP-3 α et que CCR6 est essentiel à leur présence dans les PPs (55, 106). Il serait dès lors opportun de caractériser de manière approfondie le phénotype des sous-populations de DCs dans la muqueuse intestinale des souris CD47^{-/-}. Le CD47 apparaît donc comme une molécule importante permettant aux DCs myéloïdes empruntant la voie hématogène d'atteindre les organes lymphoïdes secondaires périphériques et les MLNs (104).

Nous avons observé une hausse de la proportion des pDCs, soit la principale composante de la population de DNs dans les MLNs, concomitante à la diminution des DCs CD11b⁺ dans les MLNs de la souris déficiente en CD47 (107, 108). Récemment, Goubier et coll. ont démontré, suite à la déplétion systémique des pDCs chez des souris C57BL/6, que ces cellules sont responsables de la tolérance systémique lors d'une réponse DTH induite par un Ag oral (108). Cette tolérance est élaborée par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Par ailleurs, le transfert des pDCs tolérogéniques permet l'inhibition de la réponse DTH suite à l'immunisation à l'OVA de souris jamais exposées à cet Ag (108). Ces auteurs avancent l'hypothèse que la tolérance induite par les pDCs repose davantage sur l'induction de cellules anergiques et sur la déplétion clonale. Ils estiment que ces mécanismes d'action, indépendants de l'action des cellules Treg, inhibent entre 70 à 80 % des cellules T Ag spécifiques (108). Le potentiel cytotoxique de cette population particulière de DCs via la production d'indoléamine (IDO), une enzyme intracellulaire essentielle à

la dégradation du tryptophane, et du TNF- α est connu depuis peu (109-111). Certains auteurs évoquent la ressemblance physiologique entre les pDCs et les DCs immatures, puisqu'ils expriment tous deux peu de molécules de costimulation, afin d'expliquer les mécanismes d'action observés (107-110, 112, 113).

Par ailleurs, un nombre grandissant d'observations semblent remettre à doute le dogme selon lequel l'établissement de la tolérance orale se produit exclusivement à l'échelle du système digestif et en particulier dans les MLNs. En effet, la transplantation du foie provenant d'une souris BALB/c donneuse dans les 24h suivant l'administration i.g. d'une forte dose d'OVA, comparable à la dose utilisée lors de nos expérimentations, permet le transfert de la tolérance induite par l'administration de l'Ag et, aussi, d'inhiber l'établissement d'une réponse DTH (114). En plus de retrouver une forte proportion de pDCs tolérogéniques au niveau hépatique, cet organe est un endroit où les pDCs peuvent induire l'anergie et la déplétion des cellules T Ag spécifiques rapidement après l'administration orale d'un Ag (108). Cette sous-population de DCs représente près du tiers des cellules CD11c⁺ présentes dans le foie. Cependant, la transplantation d'un foie provenant d'une souris ayant reçu une faible dose d'OVA ne permet pas le transfert de la tolérance (114). D'autre part, le foie n'est pas nécessaire au maintien de celle-ci (114). Ces observations confirment celles rapportées par Friedman et coll. spécifiant que la dose d'Ag administrée oralement influe sur le mécanisme d'induction de la tolérance à cet Ag (115). L'importance du foie dans l'induction de la tolérance orale ne remet cependant pas le rôle essentiel des MLNs dans ce phénomène. Pour Goubier et coll., le foie et les MLNs jouent des rôles complémentaires nécessaires à l'établissement

d'un phénomène de tolérance orale efficace (108). Le foie, de par la physiologie du système circulatoire, est exposé à une large quantité d'Ags oraux solubles et permet la déplétion des cellules T Ag spécifiques suite à l'administration de fortes doses d'Ags (108). Exposés aux Ags oraux présentés par les DCs myéloïdes CD103⁺ provenant de la LP, les MLNs favorisent l'activation et la différenciation des cellules T régularises (54, 71, 105). Ce phénomène est principalement observé suite à l'administration de faibles doses d'Ags (114, 115). Les Treg dans les MLNs ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans notre modèle expérimental puisqu'il repose sur l'induction d'une tolérance orale en réponse à l'OVA administrée à fortes doses par voie orale.

De plus, les DCs CD103⁺, impliquées dans la conversion des cellules T naïves en cellules Treg Foxp3⁺, sont retrouvées en proportions égales dans les MLNs des deux groupes de souris. Il n'est donc pas surprenant que nous n'observions pas de variation dans la fréquence des Treg présentes dans les MLNs. Cependant, Huibregtse et coll. rapportent, que lors de l'administration i.g. ou intra-intestinale d'OVA, l'induction de la tolérance orale est dépendante de l'action des cellules Treg CD4⁺CD25⁻ suite à la production de TGF- β (116). Leur modèle expérimental repose sur l'administration intra-intestinale d'une faible dose de *Lactococcus lactis* sécrétant de l'OVA (116).

L'IL-10 est importante au fonctionnement des cellules Treg CD4⁺CD25⁺ et Tr1. Les DCs myéloïdes sont, au niveau du système digestif, une importante source d'IL-10. Cependant, nous avons constaté que la diminution observée des DCs myéloïdes n'est pas associée à un dysfonctionnement des cellules Treg intestinales. Par contre, il

n'existe pas, à ce jour, de marqueur pour identifier les Tr1. La baisse d'IL-10 appréhendée pourrait être contrebalancée de diverses façons. En effet, les cellules épithéliales de l'intestin représentent une source additionnelle d'IL-10 nécessaire à l'induction des Tr1 (117). De plus, les cellules Tr1 peuvent elles-mêmes produire de l'IL-10 (69). Le rôle dans la tolérance orale *in vivo* des cellules Tr1 reste encore méconnu, mais leur absence favorise le développement de colite chez la souris et, *in vitro*, elles peuvent supprimer la prolifération de cellules T CD4⁺ Ag spécifiques (69).

D'autre part, nos résultats démontrent que la suppression de la molécule CD47 dans des souris BALB/c, à laquelle on attribue généralement un phénotype Th2, est suffisante pour promouvoir un biais de type Th1, tant au niveau de la réponse humorale que cellulaire, à l'homéostasie et suite à plusieurs immunisations avec un Ag soluble. En effet, au cours d'investigations complémentaires, Bouguermouh et coll. ont démontré que CD47 est une molécule d'autorégulation négative de la réponse immune Th1 et que le profil Th1 que nous avons observé chez la souris CD47^{-/-} n'est pas dû à un défaut intrinsèque des cellules B. (85). La différenciation des cellules T en cellules effectrices Th1 ou Th2 dépend de nombreux facteurs tels que les molécules de costimulations impliquées, la nature des CPAs, la présence de certaines cytokines extracellulaires ainsi que le mode de présentation des Ags (118-120). Nous avons aussi montré une hausse significative des pDCs dans les MLNs en absence du CD47 à l'état de base. Étant une source importante d'IFN- α , ces cellules favorisent l'induction d'une réponse immune de type Th1 (65, 112, 121). Cependant, les pDCs peuvent aussi induire dans certaines circonstances des cellules Th2, ce qui

peut expliquer leur capacité à inhiber une réponse de type d'hypersensibilité de contact (67, 108, 122). Cette plasticité des pDCs est fortement influencée par le microenvironnement (66, 123). Dès lors, une augmentation de pDCs dans les organes lymphoïdes intestinaux pourrait expliquer l'absence de bris de tolérance, malgré la présence d'un biais Th1, lors de l'induction d'une réponse DTH suite à l'administration i.g. d'OVA. Cependant, Marscarell et coll. ont démontré que les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes isolées des muqueuses buccales de souris BALB/c favorisent naturellement l'état de tolérance via l'induction d'une réponse Th1 et de cellules Treg (124).

Bouguermouh et coll. rapportent que l'absence de CD47 peut, par ailleurs, causer un biais Th1 secondaire à de multiples mécanismes (85). En effet, l'interaction CD47/TSP est une voie de régulation négative de la production autocrine d'IL-12 par les DCs humaines (125). Il a aussi été montré, par notre laboratoire, que les DCs dérivées de la moelle osseuse de souris CD47^{-/-} produisaient plus d'IL12p70 que celles provenant de souris CD47^{+/+} (85). De plus, l'interaction de CD47 avec les DCs et les cellules T via SIRP- α et SIRP- γ respectivement, régule négativement la réponse de ces dernières à l'IL-12 (82, 92). L'absence de CD47 est aussi associée à une augmentation de la production d'IFN- γ qui pourrait être secondaire à une augmentation de la proportion de cellules NK observée chez la souris BALB/c déficiente pour cette molécule (85).

En outre, la greffe de cellules spléniques provenant de souris tolérisées ne permet pas le transfert de la tolérance orale (114). Cette observation est en accord avec le peu de prolifération des cellules T OVA spécifiques marquées au CFSE observée au niveau

de la rate et des ganglions périphériques. En effet, contrairement aux MLNs et au foie, ces organes ne sont pas directement liés à l'élaboration et au maintien de la tolérance orale (48, 108). D'autre part, les DCs myéloïdes CD103⁺ semblent importantes aux transports des Ags intestinaux jusqu'aux MLNs (105). Tel que rapporté précédemment, l'absence de CD47 influe négativement sur la migration des cellules DCs myéloïdes périphériques et intestinales (104). La diminution de la proportion des DCs CD11c⁺CD11b⁺ peut ainsi expliquer la diminution du nombre de cellules T transgéniques activées dans les MLNs. Cependant, la liaison de CD47 avec certains Acs mène à l'activation des cellules T exprimant cette molécule (126, 127). Plus récemment, Seiffert et coll. ont démontré que la liaison du CD47 sur les cellules T avec des DCs exprimant SIRP- α est essentielle à la stimulation des cellules T Ag spécifiques (128). De plus, l'interaction entre SIRP- γ , exprimé essentiellement sur les cellules T et NK, et CD47, exprimée sur des CPAs, favorise le rapprochement DCs-cellules T et la prolifération et l'expression de molécules de costimulation par ces dernières (129). Piccio et coll. rapportent, aussi, que l'utilisation d'Acs anti-CD47 inhibe fortement la prolifération des cellules T, mais aussi la sécrétion d'IFN- γ par les DCs (129). CD47 n'est pas toujours associée à une hausse de la prolifération des cellules T. Sous certaines conditions, il a été démontré que l'activation de CD47 implique l'activation d'une mort rapide des cellules T de manière indépendante aux voies classiques du TNF et de Fas. Cette mort cellulaire induite par CD47 permet probablement de contrôler l'activation des cellules T (130). Par ailleurs, la liaison CD47-TSP permet aussi l'induction d'une mort cellulaire caspase indépendante chez les cellules B provenant de lignées leucémiques(88). L'interaction CD47-TSP permet

aussi de réduire le niveau et la durée de l'inflammation induite par l'administration d'oxazolone. En effet, suite à l'administration de cette substance chez des souris déficientes en CD47, on observe une prolongation de l'inflammation. Cette dernière est secondaire à une diminution locale des niveaux d'apoptose des cellules T (131). Ce phénomène est aussi observé chez des souris déficientes en TSP-1 ou TSP-2 (131). Bouguermouh et coll. montrent également une augmentation de l'hypersensibilité de contact en réponse au DNFB chez la souris CD47^{-/-} (85).

Globalement, nous avons démontré que le CD47 ne semble pas participer de manière significative à l'induction et au maintien de la tolérance orale induite par l'administration de grande quantité d'antigène. Cependant, nos travaux ont permis d'identifier, au niveau de la muqueuse intestinale, la sous-population de DCs myéloïdes, i.e. CD11b⁺CD103⁻, dont la migration vers les MLNs serait contrôlée par le CD47 en conditions non-inflammatoires. Il ne semble donc pas que cette sous-population de DCs soit impliquée dans l'induction de la tolérance orale, bien que les DCs CD103⁻ soient capables d'activer les lymphocytes T dans les MLNs. De plus, en absence d'une étude approfondie des populations de DCs de la muqueuse intestinale, nous ne pouvons pas expliquer les mécanismes qui gouvernent la réduction de l'accumulation des DCs CD11b⁺CD103⁻ dans les MLNs des souris déficientes en CD47 et ni confirmer ou infirmer un défaut de migration tel qu'observé de la peau vers les ganglions drainants. Finalement, l'absence de CD47 induit un biais de la réponse de type Th1 à l'homéostasie, qui est maintenu après immunisation. Le CD47 est impliqué dans l'activation des cellules T Ags spécifiques et favorise une hausse de la proportion des pDCs au niveau des MLNs. Deux hypothèses permettent de

mieux comprendre cette implication du CD47. 1) L'absence de CD47 est associée à une diminution des DCs CD11b⁺ dans la LP. Or ces dernières seraient responsables du transport des Ags délivrés par voie i.g. jusqu'au MLNs et de leur présentation. 2) À l'opposé, le transport de l'Ag jusqu'au MLNs se fait par les DCs CD11b⁺CD103⁺, mais ces dernières ne seraient pas responsables de la présentation de celui-ci. Il y aurait transfert de l'Ag, dans les MLNs, entre les DCs CD103⁺ et les DCs CD11b⁺CD103⁻, qui vont présenter l'Ag. Cependant, l'absence de CD47 serait associée à une diminution de ces dernières dans le sang et par conséquent dans les MLNs. Néanmoins, le rôle de CD47 dans le maintien de l'homéostasie intestinale reste à être démontré, mais nos résultats n'excluent pas son rôle dans l'induction de pathologies inflammatoires de l'intestin. Effectivement, les souris CD47^{-/-} sont protégées de la colite chimique induite par l'injection de TNBS (données non publiées). Les perspectives médicales associées à une meilleure compréhension de l'influence de CD47 au niveau de l'intestin demeurent prometteuses en ce qui concerne diverses maladies intestinales telles que la maladie céliaque et les maladies inflammatoires de l'intestin.

Bibliographie

1. Kreuwel, H. T., and L. A. Sherman. 2001. The T-cell repertoire available for recognition of self-antigens. *Curr Opin Immunol* 13:639-643.
2. Ollila, J., and M. Vihinen. 2005. B cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37:518-523.
3. Allam, A., and D. Kabelitz. 2006. TCR trans-rearrangements: biological significance in antigen recognition vs the role as lymphoma biomarker. *J Immunol* 176:5707-5712.
4. Naparstek, Y., and P. H. Plotz. 1993. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 11:79-104.
5. Bach, J. F. 1995. Organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* 16:353-355.
6. Goodnow, C. C. 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2264-2271.
7. Miller, J. F., and A. Basten. 1996. Mechanisms of tolerance to self. *Curr Opin Immunol* 8:815-821.
8. Romagnani, S. 2006. Immunological tolerance and autoimmunity. *Intern Emerg Med* 1:187-196.
9. Kyewski, B., J. Derbinski, J. Gotter, and L. Klein. 2002. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol* 23:364-371.
10. von Boehmer, H. 1994. Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76:219-228.
11. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-176.
12. Romagnani, S. 2006. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36:1357-1366.
13. Van Parijs, L., and A. K. Abbas. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280:243-248.
14. Walker, L. S., and A. K. Abbas. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2:11-19.
15. Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21:305-334.
16. Powell, J. D. 2006. The induction and maintenance of T cell anergy. *Clin Immunol* 120:239-246.
17. Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, K. Raphael, and et al. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334:676-682.
18. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
19. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182:68-79.
20. Shevach, E. M., C. A. Piccirillo, A. M. Thornton, and R. S. McHugh. 2003. Control of T cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Novartis Found Symp* 252:24-36; discussion 36-44, 106-114.

21. Mottet, C., and D. Golshayan. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly* 137:625-634.
22. Ramsdell, F. 2003. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 19:165-168.
23. Hori, S., and S. Sakaguchi. 2004. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 6:745-751.
24. Nik Tavakoli, N., B. D. Hambly, D. R. Sullivan, and S. Bao. 2008. Forkhead box protein 3: essential immune regulatory role. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2369-2373.
25. Banham, A. H., F. M. Powrie, and E. Suri-Payer. 2006. FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 36:2832-2836.
26. Eagar, T. N., D. M. Turley, J. Padilla, N. J. Karandikar, L. Tan, J. A. Bluestone, and S. D. Miller. 2004. CTLA-4 regulates expansion and differentiation of Th1 cells following induction of peripheral T cell tolerance. *J Immunol* 172:7442-7450.
27. Chatenoud, L., B. Salomon, and J. A. Bluestone. 2001. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 182:149-163.
28. Siegel, R. M., F. K. Chan, H. J. Chun, and M. J. Lenardo. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 1:469-474.
29. Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 33:29-55.
30. Niederkorn, J. Y. 2003. Mechanisms of immune privilege in the eye and hair follicle. *J Invest Dermatol Symp Proc* 8:168-172.
31. Skapenko, A., G. U. Niedobitek, J. R. Kalden, P. E. Lipsky, and H. Schulze-Koops. 2004. Generation and regulation of human Th1-biased immune responses in vivo: a critical role for IL-4 and IL-10. *J Immunol* 172:6427-6434.
32. Abreu-Martin, M. T., and S. R. Targan. 1996. Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Crit Rev Immunol* 16:277-309.
33. Kraal, G., J. N. Samsom, and R. E. Mebius. 2006. The importance of regional lymph nodes for mucosal tolerance. *Immunol Rev* 213:119-130.
34. Iweala, O. I., and C. R. Nagler. 2006. Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora. *Immunol Rev* 213:82-100.
35. Macpherson, A. J., L. Hunziker, K. McCoy, and A. Lamarre. 2001. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 3:1021-1035.
36. Shroff, K. E., K. Meslin, and J. J. Cebra. 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 63:3904-3913.
37. Macpherson, A. J., E. Slack, M. B. Geuking, and K. D. McCoy. 2009. The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. *Semin Immunopathol* 31:145-149.

38. Macpherson, A. J., D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288:2222-2226.
39. Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3:331-341.
40. Sartor, R. B. 2006. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3:390-407.
41. Strobel, S., and A. M. Mowat. 2006. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6:207-213.
42. Wannemuehler, M. J., H. Kiyono, J. L. Babb, S. M. Michalek, and J. R. McGhee. 1982. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J Immunol* 129:959-965.
43. Kiyono, H., J. R. McGhee, M. J. Wannemuehler, and S. M. Michalek. 1982. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 155:605-610.
44. Untersmayr, E., and E. Jensen-Jarolim. 2006. Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacol Ther* 112:787-798.
45. Sonnenburg, J. L., L. T. Angenent, and J. I. Gordon. 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol* 5:569-573.
46. Nagler-Anderson, C. 2001. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* 1:59-67.
47. Azzali, G. 2003. Structure, lymphatic vascularization and lymphocyte migration in mucosa-associated lymphoid tissue. *Immunol Rev* 195:178-189.
48. Worbs, T., U. Bode, S. Yan, M. W. Hoffmann, G. Hintzen, G. Bernhardt, R. Forster, and O. Pabst. 2006. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203:519-527.
49. Alpan, O., G. Rudomen, and P. Matzinger. 2001. The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *J Immunol* 166:4843-4852.
50. Pabst, O., G. Bernhardt, and R. Forster. 2007. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J Leukoc Biol* 82:795-800.
51. Vallon-Eberhard, A., L. Landsman, N. Yogev, B. Verrier, and S. Jung. 2006. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *J Immunol* 176:2465-2469.
52. Iwasaki, A. 2007. Mucosal Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 25:381-418.
53. Novak, N., and T. Bieber. 2008. 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 121:S370-374; quiz S413.
54. Coombes, J. L., and F. Powrie. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8:435-446.
55. Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage

- inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 191:1381-1394.
56. Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 2001. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166:4884-4890.
 57. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
 58. Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.
 59. Faria, A. M., and H. L. Weiner. 2006. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5:179-190.
 60. Fleeton, M. N., N. Contractor, F. Leon, J. D. Wetzel, T. S. Dermody, and B. L. Kelsall. 2004. Peyer's patch dendritic cells process viral antigen from apoptotic epithelial cells in the intestine of reovirus-infected mice. *J Exp Med* 200:235-245.
 61. Chirido, F. G., O. R. Millington, H. Beacock-Sharp, and A. M. Mowat. 2005. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 35:1831-1840.
 62. Faria, A. M., and H. L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev* 206:232-259.
 63. Johansson-Lindbom, B., M. Svensson, O. Pabst, C. Palmqvist, G. Marquez, R. Forster, and W. W. Agace. 2005. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202:1063-1073.
 64. Jang, M. H., N. Sougawa, T. Tanaka, T. Hirata, T. Hiroi, K. Tohya, Z. Guo, E. Umemoto, Y. Ebisuno, B. G. Yang, J. Y. Seoh, M. Lipp, H. Kiyono, and M. Miyasaka. 2006. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 176:803-810.
 65. Fitzgerald-Bocarsly, P. 2002. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques* Suppl:16-20, 22, 24-19.
 66. Billsborough, J., T. C. George, A. Norment, and J. L. Viney. 2003. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108:481-492.
 67. Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu, and A. O'Garra. 2003. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197:101-109.
 68. Yrlid, U., V. Cerovic, S. Milling, C. D. Jenkins, J. Zhang, P. R. Crocker, L. S. Klavinskis, and G. G. MacPherson. 2006. Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph. *J Immunol* 177:6115-6121.
 69. Allez, M., and L. Mayer. 2004. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 10:666-676.

70. Weiner, H. L. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 3:947-954.
71. Zhang, X., L. Izikson, L. Liu, and H. L. Weiner. 2001. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 167:4245-4253.
72. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
73. Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204:1757-1764.
74. Mottet, C., H. H. Uhlig, and F. Powrie. 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 170:3939-3943.
75. Uhlig, H. H., J. Coombes, C. Mottet, A. Izcue, C. Thompson, A. Fanger, A. Tannapfel, J. D. Fontenot, F. Ramsdell, and F. Powrie. 2006. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 177:5852-5860.
76. Brown, E. J., and W. A. Frazier. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11:130-135.
77. Van, V. Q., J. Darwiche, M. Raymond, S. Lesage, S. Bouguermouh, M. Rubio, and M. Sarfati. 2008. Cutting edge: CD47 controls the in vivo proliferation and homeostasis of peripheral CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells that express CD103. *J Immunol* 181:5204-5208.
78. Reinhold, M. I., F. P. Lindberg, D. Plas, S. Reynolds, M. G. Peters, and E. J. Brown. 1995. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108 (Pt 11):3419-3425.
79. 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 alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol* 123:485-496.
80. 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* 271:21-24.
81. van Beek, E. M., F. Cochrane, A. N. Barclay, and T. K. van den Berg. 2005. Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol* 175:7781-7787.
82. Barclay, A. N., and M. H. Brown. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 6:457-464.
83. Armant, M., M. N. Avicé, P. Hermann, M. Rubio, M. Kiniwa, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J Exp Med* 190:1175-1182.
84. Avicé, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 165:4624-4631.

85. Bouguermouh, S., V. Q. Van, J. Martel, P. Gautier, M. Rubio, and M. Sarfati. 2008. CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response. *J Immunol* 180:8073-8082.
86. Barbier, S., L. Chatre, M. Bras, P. Sancho, G. Roue, C. Virely, V. J. Yuste, S. Baudet, M. Rubio, J. E. Esquerda, M. Sarfati, H. Merle-Beral, and S. A. Susin. 2009. Caspase-independent type III programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia: the key role of the F-actin cytoskeleton. *Haematologica* 94:507-517.
87. Mateo, V., E. J. Brown, G. Biron, M. Rubio, A. Fischer, F. L. Deist, and M. Sarfati. 2002. Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization. *Blood* 100:2882-2890.
88. Mateo, V., L. Lagneaux, D. Bron, G. Biron, M. Armant, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 5:1277-1284.
89. Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, Y. F. Fang, C. F. Lagenaur, H. D. Gresham, and F. P. Lindberg. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288:2051-2054.
90. Gardai, S. J., D. L. Bratton, C. A. Ogden, and P. M. Henson. 2006. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 79:896-903.
91. Cant, C. A., and A. Ullrich. 2001. Signal regulation by family conspiracy. *Cell Mol Life Sci* 58:117-124.
92. 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. 2001. 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* 167:2547-2554.
93. 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* 274:795-798.
94. Jin, G., K. Tsuji, C. Xing, Y. G. Yang, X. Wang, and E. H. Lo. 2009. CD47 gene knockout protects against transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* 217:165-170.
95. Yu, X., A. Fukunaga, H. Nagai, S. Oniki, N. Honma, M. Ichihashi, T. Matozaki, C. Nishigori, and T. Horikawa. 2006. Engagement of CD47 inhibits the contact hypersensitivity response via the suppression of motility and B7 expression by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 126:797-807.
96. Isenberg, J. S., Y. Qin, J. B. Maxhimer, J. M. Sipes, D. Despres, J. Schnermann, W. A. Frazier, and D. D. Roberts. 2009. Thrombospondin-1 and CD47 regulate blood pressure and cardiac responses to vasoactive stress. *Matrix Biol* 28:110-119.
97. Liu, Y., M. B. O'Connor, K. J. Mandell, K. Zen, A. Ullrich, H. J. Buhning, and C. A. Parkos. 2004. Peptide-mediated inhibition of neutrophil

- transmigration by blocking CD47 interactions with signal regulatory protein alpha. *J Immunol* 172:2578-2585.
98. Rebres, R. A., K. Kajihara, and E. J. Brown. 2005. Novel CD47-dependent intercellular adhesion modulates cell migration. *J Cell Physiol* 205:182-193.
 99. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust, and B. Malissen. 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22:643-654.
 100. Blazar, B. R., F. P. Lindberg, E. Ingulli, A. Panoskaltsis-Mortari, P. A. Oldenborg, K. Iizuka, W. M. Yokoyama, and P. A. Taylor. 2001. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med* 194:541-549.
 101. Gutgemann, I., A. M. Fahrner, J. D. Altman, M. M. Davis, and Y. H. Chien. 1998. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* 8:667-673.
 102. Smith, K. M., J. M. Davidson, and P. Garside. 2002. T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology* 106:144-158.
 103. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
 104. Van, V. Q., S. Lesage, S. Bouguermouh, P. Gautier, M. Rubio, M. Levesque, S. Nguyen, L. Galibert, and M. Sarfati. 2006. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* 25:5560-5568.
 105. Jaensson, E., H. Uronen-Hansson, O. Pabst, B. Eksteen, J. Tian, J. L. Coombes, P. L. Berg, T. Davidsson, F. Powrie, B. Johansson-Lindbom, and W. W. Agace. 2008. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205:2139-2149.
 106. Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp, and S. A. Lira. 2000. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 12:495-503.
 107. Castellaneta, A., M. Abe, A. E. Morelli, and A. W. Thomson. 2004. Identification and characterization of intestinal Peyer's patch interferon-alpha producing (plasmacytoid) dendritic cells. *Hum Immunol* 65:104-113.
 108. Goubier, A., B. Dubois, H. Gheit, G. Joubert, F. Villard-Truc, C. Asselin-Paturel, G. Trinchieri, and D. Kaiserlian. 2008. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29:464-475.

109. Kingham, T. P., U. I. Chaudhry, G. Plitas, S. C. Katz, J. Raab, and R. P. DeMatteo. 2007. Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion. *Hepatology* 45:445-454.
110. Sharma, M. D., B. Baban, P. Chandler, D. Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B. R. Blazar, A. L. Mellor, and D. H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:2570-2582.
111. Chen, W., X. Liang, A. J. Peterson, D. H. Munn, and B. R. Blazar. 2008. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 181:5396-5404.
112. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2:1144-1150.
113. Gett, A. V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4:355-360.
114. Li, W., S. T. Chou, C. Wang, C. S. Kuhr, and J. D. Perkins. 2004. Role of the liver in peripheral tolerance: induction through oral antigen feeding. *Am J Transplant* 4:1574-1582.
115. Friedman, A., and H. L. Weiner. 1994. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6688-6692.
116. Huibregtse, I. L., V. Snoeck, A. de Creus, H. Braat, E. C. De Jong, S. J. Van Deventer, and P. Rottiers. 2007. Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. *Gastroenterology* 133:517-528.
117. De Winter, H., D. Elewaut, O. Turovskaya, M. Huflejt, C. Shimeld, A. Hagenbaugh, S. Binder, I. Takahashi, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2002. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 122:1829-1841.
118. de Jong, E. C., H. H. Smits, and M. L. Kapsenberg. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 26:289-307.
119. O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-283.
120. Imanishi, T., H. Hara, S. Suzuki, N. Suzuki, S. Akira, and T. Saito. 2007. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* 178:6715-6719.
121. Krug, A., R. Veeraswamy, A. Pekosz, O. Kanagawa, E. R. Unanue, M. Colonna, and M. Cella. 2003. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med* 197:899-906.

122. Krieg, A. M. 2003. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 9:831-835.
123. Contractor, N., J. Louten, L. Kim, C. A. Biron, and B. L. Kelsall. 2007. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol* 179:2690-2694.
124. Mascarell, L., V. Lombardi, A. Louise, N. Saint-Lu, H. Chabre, H. Moussu, D. Betbeder, A. M. Balazuc, L. Van Overtvelt, and P. Moingeon. 2008. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 122:603-609 e605.
125. Doyen, V., M. Rubio, D. Braun, T. Nakajima, J. Abe, H. Saito, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2003. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med* 198:1277-1283.
126. Reinhold, M. I., F. P. Lindberg, G. J. Kersh, P. M. Allen, and E. J. Brown. 1997. Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein (CD47) is an adhesion-dependent, CD28-independent signaling pathway. *J Exp Med* 185:1-11.
127. Ticchioni, M., M. Deckert, F. Mary, G. Bernard, E. J. Brown, and A. Bernard. 1997. Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *J Immunol* 158:677-684.
128. Seiffert, M., P. Brossart, C. Cant, M. Cella, M. Colonna, W. Brugger, L. Kanz, A. Ullrich, and H. J. Buhring. 2001. 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* 97:2741-2749.
129. Piccio, L., W. Vermi, K. S. Boles, A. Fuchs, C. A. Strader, F. Facchetti, M. Cella, and M. Colonna. 2005. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* 105:2421-2427.
130. Pettersen, R. D., K. Hestdal, M. K. Olafsen, S. O. Lie, and F. P. Lindberg. 1999. CD47 signals T cell death. *J Immunol* 162:7031-7040.
131. Lamy, L., A. Foussat, E. J. Brown, P. Bornstein, M. Ticchioni, and A. Bernard. 2007. Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation. *J Immunol* 178:5930-5939.

