

Université de Montréal

# **Rôle de la molécule CD47 dans l'homéostasie du système immunitaire**

par

Vu Quang Van

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de Médecine

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

Février 2010

© Vu Quang Van, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

## **Rôle de la molécule CD47 dans l'homéostasie du système immunitaire**

Présentée par :

Vu Quang Van

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Petronela Ancuta, président rapporteur

Dr Marika Sarfati, directeur de recherche

Dr Johanne Poudrier, membre du jury

Dr Sylvie Fournier, examinateur externe

## Résumé

Les travaux antérieurs du laboratoire ont démontré le rôle du CD47 dans la fonction des cellules dendritiques ainsi que dans l'induction des lymphocytes T régulateurs (Tregs) chez l'humain *in vitro*.

Notre premier objectif était de déterminer le rôle de CD47 sur la fonction des DCs *in vivo*. Nos travaux démontrent que le CD47 contrôle sélectivement la migration des DCs au travers des vaisseaux lymphatiques et des barrières cellulaires endothéliales *in vivo* sans interférer avec celle des lymphocytes T et B. Des expériences de migration compétitive et d'immunisation active avec des DCs myéloïdes démontrent que la migration des DCs est dépendante de l'expression du CD47 sur les DCs et non sur les cellules endothéliales. Ce défaut de migration est corrélé avec l'absence de DCs spléniques dans la zone marginale chez nos souris CD47<sup>-/-</sup>.

Notre second objectif était de déterminer le rôle de CD47 dans l'homéostasie et la fonction des Tregs. Nous démontrons que l'expression du CD47 contrôle sélectivement l'homéostasie d'une sous-population de Tregs CD103<sup>+</sup> à l'état de base. La proportion de cellules activées/mémoires (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>) Foxp3<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> augmente rapidement au cours du vieillissement chez nos souris CD47<sup>-/-</sup> comparée aux souris CD47<sup>+/+</sup> du même âge, tandis que le pourcentage de cellules (CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>) Foxp3<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> reste comparable entre les deux souches de souris.

---

<sup>1</sup> « hi » représente des niveaux élevés d'expression de la molécule

<sup>2</sup> « lo » représente des niveaux faibles d'expression de la molécule

En conclusion, le CD47 inhibe la prolifération excessive des Tregs CD103<sup>+</sup> empêchant ainsi l'accumulation de ces cellules en absence d'inflammation.

Les DCs et les Tregs sont étroitement régulées de manière réciproque. Cette régulation croisée contribue au maintien d'un équilibre entre l'immunité protectrice et la tolérance. La perspective de nos travaux est d'approfondir nos connaissances sur le rôle du CD47 et de ses ligands dans la régulation des DCs par les Tregs et vice et versa. Les DCs et les Tregs étant impliqués dans la pathogenèse de multiples maladies telles que le cancer, les maladies infectieuses et les maladies auto-immunes. Par conséquent, nos études pourraient ouvrir des portes à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### **Les mots clefs**

Cellules dendritiques, migration, lymphocytes T régulateurs, CD47, Sirp- $\alpha^+$ , CD103

## Abstract

Previous work in the laboratory have demonstrated the role of CD47 in the function of dendritic cells and in the induction of regulatory T cells in humans.

Here, we show that the ubiquitous self-marker CD47 selectively regulates DC, but not T and B cell trafficking across lymphatic vessels and endothelial barriers *in vivo*. Competitive DC migration assays and active immunization with myeloid DCs demonstrate that CD47 expression is required on DCs but not on the endothelium and not vice and versa for efficient DC trafficking and T-cell responses. This migratory defect correlates with the quasi-disappearance of splenic marginal zone DCs in non manipulated CD47-deficient mice. Our data reveal that CD47 on DCs is a critical factor in controlling migration and efficient initiation of the immune response.

Mutual or reciprocal regulation exists between DCs and Tregs. For instance, DCs efficiently induce Tregs *in vivo*. We here examine how CD47 deficiency that selectively decrease myeloid DCs impact on Treg homeostasis.

We here show that CD47 expression, selectively regulated CD103<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg homeostasis. The proportion of effector/memory-like (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>) CD103<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs rapidly augmented with age in CD47-deficient mice (CD47<sup>-/-</sup>) as compared with age-matched control littermates. Yet, the percentage of quiescent (CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>) CD103<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs remained stable. Thus, sustained CD47 expression throughout life is critical to avoid an excessive expansion of CD103<sup>+</sup> Tregs that may overwhelmingly inhibit Ag specific T cell responses.

DCs and Tregs are closely regulated to maintain the balance between protective immunity and tolerance. When that balance is broken, several diseases such as cancer, infectious diseases and autoimmune diseases may develop. Our ultimate goal is to understand how CD47 regulates DCs and Tregs function. Manipulation of the two cells types may open to the door to unexplored therapeutic avenues.

**Key words:** dendritic cell, regulatory cell, CD47, Sirp- $\alpha^+$ , CD103, migration

## Table des matières

<b>Université de Montréal</b> .....	<b>1</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux et des figures</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>12</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Généralités</b> .....	<b>17</b>
<b>2. Les cellules Dendritiques</b> .....	<b>19</b>
2.1. <i>Les Différentes sous-populations de cellules dendritiques</i> .....	19
2.1.1 Les DCs des organes non lymphoïdes .....	20
2.1.2. Les DCs des organes lymphoïdes .....	23
2.2. <i>Le développement des DCs</i> .....	25
2.2.1. Les cytokines impliquées.....	26
2.2.2. L'hématopoïèse des DCs .....	28
2.3. <i>La circulation des DCs</i> .....	31
2.3.1. La migration des DCs du sang vers les tissus non lymphoïdes .....	33
2.3.2. La migration des DCs du sang vers les organes lymphoïdes secondaires (SLO) .....	37
2.3.3. Migration de tissus périphériques vers les SLO .....	38
2.3.3.1. La reconnaissance des pathogènes et la maturation des DCs .....	38
2.3.3.2. Détachement.....	43
2.3.3.3. La migration interstitielle .....	43
2.3.3.4. La migration dans le réseau lymphatique.....	45
2.3.3.5. Le déplacement dans le ganglion .....	46
2.3.4. La migration vers les organes lymphoïdes primaires .....	48
2.4. <i>La capture et la présentation d'antigène</i> .....	49
2.4.1. La présentation d'antigène via CMH classe II (CMH-II).....	50
2.4.2. La présentation d'antigène via le CMH de la classe I (CMH-I).....	51
2.4.3. La présentation croisée d'antigène .....	53
<b>3. La polarisation Th1, Th2 et Th17</b> .....	<b>59</b>
<b>4. Des lymphocytes T régulateurs</b> .....	<b>64</b>
4.1. <i>Les lymphocytes T régulateurs naturels</i> .....	65
4.2. <i>Les lymphocytes T régulateurs induits</i> .....	70
4.3. <i>L'induction des Tregs par des DCs</i> .....	73

4.4. Les mécanismes de suppression .....	76
4.4.1. La suppression par le contact cellulaire .....	76
4.4.2. La suppression par les cytokines .....	78
4.4.3. La suppression par la cytolyse .....	80
4.4.4. La suppression par la rupture métabolique .....	81
<b>5. CD47 ou protéine associée à l'intégrine .....</b>	<b>83</b>
5.1. CD47/TSP-1/SIRP- $\alpha$ : Propriété immunorégulatrice.....	86
5.2. CD47/SIRP- $\alpha$ : Inhibition de la phagocytose .....	88
5.3. CD47/SIRP- $\alpha$ : La migration.....	90
<b>6. Résultats.....</b>	<b>92</b>
6.1. Article 1 : Le CD47 exprimé sur les cellules dendritiques gouverne leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires .....	94
6.2. Article 2 : Le CD47 contrôle la prolifération et l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> .....	132
<b>7. Discussion.....</b>	<b>155</b>
7.1. L'importance de l'étude de DCs et des Tregs.....	155
7.2. Rôle des DCs dans l'immunopathologie.....	156
7.2.1. Rôle des DCs dans les maladies auto-immunes et maladies inflammatoires chroniques .....	156
7.2.2. Le rôle des DCs dans les maladies infectieuses.....	160
7.2.3. Le rôle des DCs dans la transplantation .....	162
7.2.4. Le rôle des DCs dans le cancer.....	163
7.3. Peut-on et faut-il interférer avec la migration des DCs?.....	164
7.4. Est-il dangereux de contrôler sélectivement la migration des DCs SIRP- $\alpha$ <sup>+</sup> ?.....	172
7.5. Rôle des Tregs dans le système immunitaire : ennemis ou amis?.....	176
7.5.1. Tregs et immunosénescence .....	179
7.5.2. Le rôle des Tregs dans le cancer.....	184
7.5.3. Le rôle des Tregs dans les maladies auto-immunes.....	188
7.5.4. Le rôle des Tregs dans les maladies inflammatoires chroniques .....	189
7.6. La régulation croisée entre les DCs et les Tregs .....	190
<b>8. Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>193</b>
<b>9. ANNEXES.....</b>	<b>195</b>
<b>9. Références .....</b>	<b>200</b>



## Liste des tableaux et des figures

Table 1: Différentes sous-populations de DCs dans des divers organes .....	24
Figure 1: Le développement des différentes sous populations de DCs .....	25
Figure 2: Les molécules impliquées dans la migration des DCs vers de divers organes .....	36
Figure 3: Les PAMPS des DCs.....	42
Figure 4: La migration des DCs hors de la peau.....	47
Figure 5: Présentation d'antigènes de CMH classe I et II.....	53
Figure 6: La présentation croisée .....	56
Figure 7: La voie alternative vacuolaire .....	57
Figure 8: La différenciation de Th1 et Th2.....	62
Figure 9: La différenciation Th17.....	63
Figure 10: La différenciation des Tregs.....	72
Figure 11: Les mécanismes de suppression par des Tregs.....	82
Figure 12: L'interaction CD47/Sirp- $\alpha$ + favorise la migration des DCs .....	166
Figure 13: Le développement des DCs modifié.....	171
Figure 14: Modèle de conversion des Tregs .....	184
Figure 15: La régulation croisée entre les DCs et les Tregs .....	192
Figure 16: Une DTH exubérante induite par les lymphocytes T CD47 KO (Modèle DNFB).....	195
Figure 17: Une DTH exubérante chez nos souris CD47 KO (Modèle FITC) .....	196
Figure 18: L'anticorps anti-CD47 inhibe la migration des DCs cutanées .....	198

Figure 19: La migration compétitive ..... 199

## Article 1

Figure 1 : Effect of CD47 deficiency on distribution and mobilization of LCs and skin DCs .....117.

Figure 2: Impaired T cell response in CD47<sup>-/-</sup> mice under homeostatic and inflammatory conditions.....119.

Figure 3: CD47/SIRP- $\alpha$  requirement for skin DC migration under inflammatory conditions. ....120.

Figure 4: Decreased CD47<sup>-/-</sup> DC trafficking across lymphatic vessels.....121.

Figure 5: Selective altered CD47<sup>-/-</sup> DC transendothelial migration. ....123.

Figure 6: Depletion of myeloid CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> DC subset in the spleen of CD47-deficient mice.....124

## Article 2

Figure 1: Increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> (effector/memory like-cells) T cells with aging in CD47-deficient mice. ....151.

Figure 2: The proportion of activated Foxp3<sup>+</sup> Tregs that express CD103 is increased in CD47 deficient mice. ....152.

Figure 3: Increased proliferation and accumulation of activated CD103+ Tregs in CD47-deficient mice. ....153.

Figure 4: Regulatory function of CD47<sup>-/-</sup> Tregs in vitro and in vivo. ....154.

## Liste des abréviations

DCs :	Cellules dendritiques
cDCs :	DCs conventionnelles
CDP :	progéniteurs communs de DCs
cKit :	un récepteur pour le facteur de croissance des cellules souches SCF (stem cell factors)
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTL :	Lymphocyte T cytotoxique.
dDCs :	DCs dermales
DTH :	Delayed-type hypersensitivity
EAE :	Experimental autoimmune encephalomyelitis
E.R. :	Réticulum endoplasmique
Flt3:	Fms-like tyrosine kinase
Flt3L :	Fms-like tyrosine kinase ligand
HEV :	High endothelial venules
HSP60-70 :	Heat shock protein
HSPCs :	Cellules souches hématopoïétiques et progénitrices
IBD :	Inflammatory bowel disease
ICAM :	Inter-Cellular Adhesion Molecule
iDCs :	DCs immatures
l'IDO :	Indoleamine 2,3-dioxygenase
d'IPEX :	Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
I.V. :	Intra veineux
GM-CSF :	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GM-CSFR :	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor
GVHD :	Graft versus host disease

LCs :	Cellules de Langerhans
LFA-1 :	Lymphocyte function-associated antigen 1
Mac-1 :	Macrophage 1 antigen
MAdCAM-1 :	Mucosal addressin cellular adhesion molecule-1
MDA5 :	Melanoma differentiation-associated gene 5
M-CSF :	CSF de macrophage
mDCs :	DCs matures
MMPs :	Mmatrix metalloproteinase
MPs :	Cellules myéloïdes progénitrices
MDPs :	macrophages/monocytes dendritiques précurseurs
mTECs :	Medullary thymic epithelial cells
MyD88 :	Myeloid differentiation primary response gene 88
NK :	Cellules Natural Killer
NLRs :	NOD-like receptor
PAMPS :	Pathogen-associated molecular patterns
pDCs :	DCs plasmacytoïdes
PNAd :	L-selectine peripheral node addressin
PRRs :	Patterns-recognition receptor
PSGL-1 :	P-selectin glycoprotein ligand-1
S.C. :	Sous cutané
Sca-1 :	stem cell factor antigen 1
SED :	Sclérose en plaque
Sirp- $\alpha$ :	Signal inhibitory regulatory protein $\alpha$
TGF- $\beta$ :	Transforming growth factor
TIM :	Inhibitors of metalloproteinases
Th1 :	Cellules effectrices auxiliaires de type 1
Th2 :	Cellules effectrices auxiliaires de type 2

Tregs :	Cellules T régulatrices (lymphocytes T régulatrices)
TLRs :	Toll-like receptors
TRIF :	TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- $\beta$
TSLP :	Thymic stromal lymphopoietin
VCAM :	Vascular cell adhesion molecule
VLA :	Very late antigen
CD47 <sup>hi</sup> :	Le « hi » représente des niveaux <u>élevés</u> d'expression de la molécule
CD47 <sup>lo</sup> :	Le « lo » représente des niveaux <u>faibles</u> d'expression de la molécule
CD47 <sup>int</sup> :	Le « int » représente des niveaux <u>intermédiaire</u> d'expression de la molécule

## **Remerciements**

J'exprime mes profonds remerciements à ma directrice de recherche, Dr. Marika Sarfati, pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire. Son admirable encadrement scientifique m'a permis de repousser mes limites et de me perfectionner tant au niveau scientifique que technique. Elle a joué un rôle crucial et déterminant dans le cheminement ma carrière. Elle m'a transmis son amour passionné pour la science et m'a montré qu'en science il existe encore de la place pour l'imagination et la rêverie. Je ne la remercierais jamais assez pour sa grande générosité et pour sa disponibilité.

Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance et mes plus vifs remerciements à Dr. Guy Delespesse pour ses précieux conseils et pour son regard critique. Ses questions étaient toutes simples, mais suscitaient de profondes réflexions. Je le remercie pour son encouragement qui m'a aidé à surmonter de nombreux obstacles. Je suis particulièrement touché par leur manière de diriger l'équipe. Dr. Delespesse et Dr. Sarfati ont pris leurs élèves pour leurs enfants, en apportant amour et attention.

J'aimerais remercier Manuel Rubio pour ses conseils techniques judicieux tout au long de mon doctorat et pour toutes les soirées tardives pendant lesquelles il est resté avec moi. Il n'a jamais hésité à m'aider, peu importe les circonstances.

Mes sincères remerciements aux membres de jury Dre Petronela Ancuta, Dre Johanne Poudrier, Dre Sylvie Fournier et Dr Jean-François Gauchat qui ont accepté de juger mon travail.

Je remercie tous mes collègues de travail avec qui j'ai partagé ma vie quotidienne pendant toutes ces années et avec qui j'ai eu de vifs échanges scientifiques: Un grand merci à Salim Bougermouh, Marianne Raymond, Geneviève Fortin, Jinane Darwiche, Nobuyasu Baba, Zoulfia Allakhverdi, Keiko Wakahara, Sylvie Lesage, Julie Martel, Patrick Gautier Ethier, Martin Levesque, Annie Boisvert, Claudine Beauchamp, Philippe Grimbert, et Sébastien Nguyen.

Je remercie aux membres de ma famille qui ont cru en moi et qui m'ont supporté tout le long de mes études.



## 1. Généralités

Les cellules dendritiques (DCs) font partie de la famille des cellules présentatrices d'antigènes. Elles ont été identifiées pour la première fois par Steinman en 1973 dans la rate des souris (1). Par la suite, plusieurs groupes ont rapporté que ces cellules contribuent au rejet de greffes cardiaques et rénales (2). Leur petit nombre et le manque de marqueurs spécifiques ont restreint considérablement les progrès de la recherche. Il aura fallu attendre jusqu'aux années 90 pour pouvoir les isoler et les cultiver à partir du sang périphérique et de la moelle osseuse, respectivement (3, 4). Suite à ces découvertes, la connaissance sur les DCs a progressé d'une façon fulgurante, aboutissant à des notions qui aujourd'hui ont des applications cliniques.

Les DCs sont appelées les sentinelles du système immunitaire. Elles appartiennent au système leucocytaire et sont distribuées dans tous les organes, spécialement dans les tissus lymphoïdes, muqueux et dans la peau. Elles seules sont capables d'initier la réponse immunitaire et de promouvoir la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type 1, 2, 17 ou T régulateurs (Tregs). De ce fait, elles sont dénommées « les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles ». À l'état de base ou en conditions non-inflammatoires, les cellules dendritiques immatures (iDCs) patrouillent les organes périphériques où elles captent les antigènes du soi pour ensuite migrer vers les ganglions où elles induisent la tolérance. Par contre, lorsque les iDCs reçoivent des signaux de dangers provenant de pathogènes, soit des bactéries ou des virus, elles initient un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles activent les cellules T

naïves et induisent leur différenciation en cellules T effectrices qui, à leur tour, migreront vers le site infectieux pour éliminer le pathogène. Il existe plusieurs sous-populations de DCs caractérisées par des différences morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles, dépendamment de la localisation anatomique et de l'interaction avec l'environnement. Récemment, le domaine de recherche sur les DCs suscite énormément d'intérêt auprès de la communauté scientifique et des laboratoires cliniques en raison de leurs propriétés immunogéniques donc de leurs implications thérapeutiques potentielles dans les maladies infectieuses et tumorales. De plus, leurs propriétés tolérogéniques capables d'induire *de novo* des Tregs sont extrêmement intéressantes dans les pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques. Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes sous-populations de DCs, leur développement, leur homéostasie, leurs fonctions, leurs contributions dans la réponse immunitaire adaptative et leurs aptitudes à induire des Tregs. Mes travaux portent principalement sur le rôle du CD47 dans l'homéostasie des DCs et des Tregs *in vivo* chez la souris. Par conséquent, cette revue de la littérature non exhaustive se limite aux travaux publiés chez la souris.

## 2. Les cellules Dendritiques

### 2.1. Les Différentes sous-populations de cellules dendritiques

Les DCs peuvent être sous-divisées en trois grandes catégories. La première, « les DCs migratoires », est composée de DCs qui se trouvent dans des tissus périphériques et migrent vers les ganglions. La deuxième, communément appelée les « DCs résidentes » ou les « DCs conventionnelles (cDCs) », est formée de DCs qui sont localisées dans les tissus lymphoïdes. La troisième comprend les « DCs plasmacytoïdes (pDCs) » qui résident dans les tissus périphériques et dans les organes lymphoïdes. Les pDCs sont spécialisées dans la production de grandes quantités d'interférons- $\alpha$  en réponse à une infection virale (5) et participent au processus d'induction de tolérance. Par contre, le rôle principal des deux autres sous-populations de DCs est de maintenir la tolérance ou d'induire une réponse immunitaire protectrice.

Il existe deux marqueurs protéiniques de surface communs à toutes les populations de DCs : le CD11c (la chaîne d'intégrine  $\alpha_X$ ) s'associe avec le CD18 ( $\beta_2$ ) pour former une intégrine hétérodimérique. Le CD11c/CD18b fait partie de la famille des intégrines CD18. Cette famille d'intégrines hétérodimériques partage la même chaîne  $\beta_2$ , mais ces dernières se distinguent les unes des autres par la diversité de la chaîne  $\alpha$  (6-8), incluant le CD11a (LFA-1 ou  $\alpha_L$ ), le CD11b (MAC-1 ou  $\alpha_M$ ) et le CD11d ( $\alpha_D$ ). Le CD11c peut se lier à une variété de ligands, tels que l'ICAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire) (9), le lipopolysaccharide (10), le fibrinogène (11) et le collagène (12). Le CD11c est impliqué dans l'opsonisation de l'antigène en se liant aux fragments du complément iC3b.

Le CD11c est aussi connu sous le nom de récepteur 4 du complément (CR4) et est impliqué dans la phagocytose. Meunier & al. ont rapporté que l'engagement du CD11c par un anticorps inhibe la prolifération des T allogéniques dans un système de co-culture avec les DCs de l'épiderme (13). Puisque les DCs sont des cellules présentatrices d'antigènes, elles se caractérisent toutes par l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité classe deux (CMH-II). Nous tenterons de relier les caractéristiques phénotypiques des différentes sous-populations de DCs (Table 1) à leurs principales propriétés biologiques en fonction de leur localisation tissulaire.

### **2.1.1 Les DCs des organes non lymphoïdes**

Les DCs sont réparties dans tous les organes non-lymphoïdes de notre corps incluant le cœur, le foie, les reins, etc.... Elles ont la capacité de migrer<sup>3</sup> vers les organes lymphoïdes pour induire une réponse soit tolérogénique, soit immunogénique, dépendamment de la réception d'un signal de danger. Nous nous intéresserons aux DCs de la peau et des muqueuses, plus particulièrement à celles des intestins et des poumons, principales interfaces avec le monde extérieur. On distingue deux types de muqueuses. La première est recouverte par une couche unicellulaire de cellules épithéliales, et se retrouve dans les intestins, les poumons et l'utérus. Les cellules épithéliales expriment des récepteurs Ig polymériques qui permettent de relarguer les IgA secrétées par des cellules B dans le lumen. Leurs

---

<sup>3</sup> Voir Chapitre « La migration des DCs »

fonctions physiologiques principales sont l'absorption et la respiration. Le deuxième type de muqueuse se retrouve dans la cavité vaginale et buccale tapissée de plusieurs couches de cellules épithéliales épidermoïdes stratifiées. Les cellules épithéliales forment une barrière de protection physique très efficace. Finalement, la peau représente un autre exemple de barrière physique composée de deux types de tissus : l'épiderme (couche multicellulaire de cellules épithéliales) et le derme.

Dans l'intestin, les DCs jouent un rôle critique dans le maintien de l'équilibre entre la réponse tolérogénique aux antigènes du soi, incluant les bactéries commensales, et la réponse immunogénique contre les agents pathogènes. Ces dernières années, 2 sous-populations de DCs ont été étudiées intensivement dans la lamina propria, le tissu conjonctif de la muqueuse. La première exprime l'intégrine  $\alpha_E\beta_7$  (CD103), un ligand de la molécule d'adhésion E-cadherine exprimée par la plupart des cellules épithéliales. À l'état de base, les DCs CD103<sup>+</sup>, en présence d'acide rétinoïque et de TGF- $\beta$  (Transforming growth factor), migrent vers les ganglions et induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en lymphocytes T régulateurs Foxp3<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> (14, 15). La deuxième sous-population, les DCs CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, polarise la réponse pro-inflammatoire des lymphocytes T naïfs vers les lymphocytes T effecteurs (16, 17). De plus, ces DCs expriment le CX<sub>3</sub>CR1, un récepteur du ligand fractalkine (une chémokine transmembranaire exprimée sur les cellules épithéliales au repos) qui leur permet d'étendre leurs dendrites entre les cellules épithéliales jusqu'à l'intérieur du lumen intestinal pour capter les antigènes (18). Dernièrement, notre laboratoire a démontré que les DCs CD103<sup>-</sup> se distinguent des DCs CD103<sup>+</sup> par l'expression de Sirp- $\alpha$ , le récepteur du

CD47 (17); une observation très récemment confirmée par 2 autres groupes d'investigateurs (19, 20).

Deux populations de DCs (CD103<sup>+</sup> et CD103<sup>-</sup>) sont également détectées dans les poumons. Les cellules épithéliales des tissus conjonctifs péribronchiolaires sont étroitement associées avec les DCs CD103<sup>+</sup>. Juste au-dessous de la couche de cellules épithéliales, la lamina propria du tissu conjonctif péribronchiolaire contient les DCs CD103<sup>-</sup> qui expriment le CD11b. L'espace alvéolaire contient principalement des DCs CD103<sup>+</sup> qui sont facilement accessibles par lavage bronchio-alveolaire. Raymond et al. ont récemment rapporté que les DCs CD103<sup>-</sup> du poumon expriment le Sirp- $\alpha$ , de manière comparable à celles de l'intestin (21).

En général, les DCs migrent constamment des tissus périphériques vers les ganglions drainants et doivent donc être rapidement remplacées. L'expérience de reconstruction chimérique de la moelle osseuse nous démontre que les DCs de l'intestin et des poumons sont remplacées après 7 à 13 jours (22). En revanche, la dynamique du renouvellement des DCs de la peau est complètement différente. En effet, les DCs qui se trouvent dans l'épiderme résistent à une dose d'irradiation mortelle et sont retrouvées dans l'hôte 18 mois après la reconstruction chimérique de la moelle osseuse (23). Ces DCs sont appelées « les cellules de Langerhans (LCs) ». Elles expriment constitutivement les molécules d'adhésion, comme l'E-cadhérine et EpCAM, ce qui leur permet de s'attacher aux cellules épithéliales voisines (24). Les LCs expriment aussi une quantité élevée de CMH-II, de CD11b, de DEC205, de Sirp- $\alpha$  et de langerine, une lectine de type II, formant les granules de Birbeck intracytoplasmiques (24, 25). Des publications récentes ont cependant établi que la

langerine n'est pas un marqueur spécifique aux LCs. Cette molécule se retrouve également en faible quantité à la surface des DCs CD8<sup>+</sup> résidentes de la rate, du thymus et des ganglions drainants la peau. Elle est aussi exprimée par une sous-population de DCs retrouvée dans le poumon et dans le derme (langerine<sup>+</sup> dermales DCs (dDCs)) (26, 27). Les langerines<sup>+</sup> dDCs expriment le CD103 et une faible quantité de CD11b. Le deuxième type de DCs présent dans le derme est caractérisé par l'absence de langerine (langerine<sup>-</sup> dDCs) et de CD103 et est Sirp- $\alpha^+$ . Toutes les populations de DCs cutanées présentent de manière efficace les antigènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais seules les dDCs CD103<sup>+</sup> ont l'aptitude à présenter les antigènes viraux et les antigènes de soi exprimés par les kératinocytes aux lymphocytes CD8<sup>+</sup> (20, 28).

### **2.1.2. Les DCs des organes lymphoïdes**

Dans la rate et les ganglions, les DCs sont divisées principalement en deux grandes sous-populations : les DCs conventionnelles (cDCs), incluant CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (DCs CD8<sup>-</sup>) et les DCs CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> (DCs CD8<sup>+</sup>), et les pDC. Les DCs CD8<sup>-</sup> se retrouvent principalement dans la zone marginale, alors que les DCs CD8<sup>+</sup> et les pDCs se localisent dans la zone T. Il existe une minorité de doubles négatifs cDCs (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) qui semblent jouer un rôle régulateur. Les sous-populations de DCs dans les ganglions sont beaucoup plus diversifiées, puisque l'on y trouve non seulement les trois sous-populations de DCs mentionnées plus haut, mais aussi des DCs migratoires qui varient selon le tissu drainé par le ganglion.

Dans le thymus, La majorité des DCs sont CD8<sup>+</sup> et se retrouvent dans la médulla. Elles proviennent de progéniteurs intra-thymiques, alors que les DCs CD8<sup>-</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>, population minoritaire, sont issues des progéniteurs extra-thymiques (29). Les DCs CD8<sup>+</sup> jouent un rôle important pour la sélection négative. Des études récentes nous suggèrent que les DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> périphériques peuvent entrer dans le thymus pour induire la tolérance centrale et des cellules T régulatrices (22).

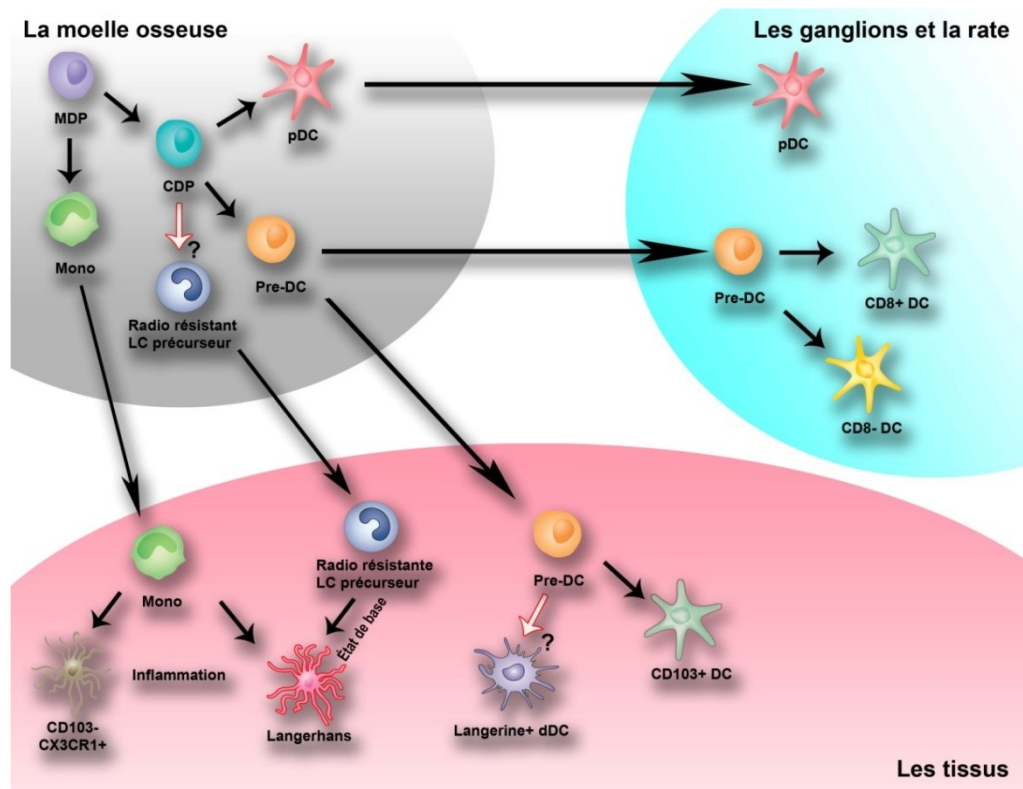
Les pDCs se situent dans les organes lymphoïdes et non-lymphoïdes. Leur expression de l'intégrine CD11c est beaucoup plus faible. Elles n'expriment pas le CD11b, mais plutôt le CD45RA/B220, ly6c/GR1+, PDCA1 et siglec-H, membre de la famille des acides sialiques. Le marquage au BrDU a permis de constater que les pDCs prolifèrent très lentement *in situ*. Par contre, leur renouvellement par le sang est rapide et s'effectue en seulement 3 jours.

**Table 1: Différentes sous-populations de DCs dans des diverses organes**

Lymphoïdes		Non-lymphoïdes			
Primaire	Secondaires	Épiderme	Derme	Intestin	Poumon
CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>	CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>	Langerine <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup>  CD11b <sup>+</sup> CD205 <sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>	Langerine <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup>	CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup>	CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup>
CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup>		Langerine <sup>-</sup> CD103 <sup>-</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>	CD103 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> CX3CR1 <sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>	CD103 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>
	CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>				
pDC	pDC		pDC	pDC	pDC



**Figure 1: Le développement des différentes sous-populations de DCs**



La différenciation des DCs à partir des cellules souches commence dans la moelle osseuse. Les DCs précurseurs quittent la moelle osseuse et finissent leur différenciation dans les tissus. Les pDCs sont les seules à terminer leur transformation dans la moelle osseuse.

## 2.2. Le développement des DCs

Le développement des DCs commence dans la moelle osseuse. Sous l'influence de son environnement, les cellules souches hématopoïétiques et progénitrices (HSPCs) se transforment, se différencient en précurseurs qui génèrent

des DCs fonctionnelles. Dans ce chapitre, nous détaillerons ce processus de transformation qui caractérise les DCs que nous connaissons (Fig.1).

### **2.2.1. Les cytokines impliquées**

La découverte du GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) comme cytokine-clé pour la différenciation *in vitro* des cellules de la moelle osseuse en cellules dendritiques a accéléré les études phénotypiques et fonctionnelles sur les DCs (3, 4). Étonnamment, les résultats des études *in vivo* sont apparemment contradictoires. Les DCs des souris déficientes pour le GM-CSF ou pour son récepteur (GM-CSFR) ont amené de nouveaux concepts sur le développement des DCs. Le nombre de DCs générées n'est pas affecté (30), soit après l'injection du GM-CSF, soit dans des souris transgéniques qui surexpriment la molécule GM-CSF. C'est seulement lors de l'administration d'un adénovirus exprimant le GM-CSF qu'on a réussi à générer une grande quantité de DCs CD8<sup>-</sup>. Le GM-CSF est produit par les cellules stromales, par les cellules NK et par les lymphocytes T activés. On ne détecte le GM-CSF que dans des conditions inflammatoires. À partir de ces données, on a conclu que la cytokine GM-CSF n'est pas essentielle pour le développement des DCs *in vivo* à l'état de base, mais pourrait jouer un rôle durant la réponse inflammatoire.

Contrairement au GM-CSF, le Flt3L (Fms-like tyrosine kinase ligand) est essentiel au développement des DCs *in vivo*, puisque les souris qui sont déficientes pour le gène ou qui ont été traitées avec l'inhibiteur de Flt3 (CD135) ont dix fois moins de DCs dans les organes lymphoïdes que les souris sauvages. Par contre, le

nombre de LCs n'est pas affecté. Les LCs semblent donc dépendre d'une voie de différenciation différente des autres DCs. De même, l'injection de Flt3L augmente massivement les pDC et les DCs dans les organes lymphoïdes et non-lymphoïdes. *In vitro*, le Flt3L permet de différencier les précurseurs de la moelle osseuse de toutes les sous-populations de DCs. Le Flt3L existe sous forme soluble et membranaire et est sécrété par des cellules stromales et les lymphocytes activés. Sa présence est détectable dans le sérum à l'état de base et augmente lors d'une inflammation (31).

Le CSF de macrophage (M-CSF) ou CSF-1 est un facteur de croissance important pour les macrophages. On avait cru initialement que cette cytokine n'était pas impliquée dans la différenciation des DCs car les DCs des souris déficientes pour cette molécule se développent normalement (32). Plus tard, Ginhoux F. et al. ont rapporté que les LCs de ces souris étaient présentes chez les adultes, mais absentes chez les nouveau-nés. Par contre, les souris déficientes pour le récepteur de CSF-1 (CSF-1R ou CD115), nouveau-nés ou adultes, n'ont pas de LCs (33), même lors d'une inflammation de la peau. Comment expliquer que le CSF-1 n'ait aucun impact majeur sur le développement des LCs, tandis que son récepteur en a un? Le groupe de Lin H. a répondu à cette question en montrant que l'interleukine 34 peut se lier également au CSF-1R (34), ce qui pourrait expliquer cette disparité. En 2008, Onai et al. ont démontré que le progéniteur (Flt3<sup>+</sup>M-CSFR<sup>+</sup>) (CD135<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>) génère aussi bien des pDCs que des cDCs et que le CSF-1 à lui seul n'a pas d'effet, mais que combiné avec le Flt3L, il contribue au développement des DCs (35). Un an plus tard, le groupe de Fancke B. a rapporté le contraire montrant que seul le CSF-1 peut induire la différenciation des progéniteurs en pDCs et cDCs (36). Le CSF-1 est

exprimé par des cellules endothéliales, stromales, ostéoblastes et des macrophages. Il est détectable à l'état de base et augmente lors d'une inflammation. Ce qui est clair, c'est que le CSF-1 est important pour le développement des monocytes et qu'en son absence, les monocytes ainsi que les DCs, qui sont dérivées de la lignée des monocytes, sont grandement réduites(37).

Les monocytes ont besoin de CSF-1 et de TGF- $\beta$  pour se différencier en LCs. Dans la peau, les kératinocytes sont une grande source de TGF- $\beta$ , mais dernièrement, Kaplan et al. ont rapporté que le TGF- $\beta$  secrété par les LCs jouerait un rôle autocrine et contrôlerait leur propre développement (38).

### **2.2.2. L'hématopoïèse des DCs.**

L'hématopoïèse est hiérarchiquement très bien structurée. Une toute petite fraction de cellules souches hématopoïétiques et progénitrices (HSPCs) dans la moelle osseuse génère des progéniteurs multipotents qui, à leur tour, se différencient en d'autres cellules progénitrices. Graduellement, ces cellules deviennent de plus en plus spécialisées et perdent leur capacité multipotente. Les cellules HSPCs sont caractérisées par les marqueurs Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>hi</sup>. Lin<sup>-</sup> désigne l'absence de marqueurs des lignées suivantes : CD19 (lymphocyte B), CD3 CD4 CD8 (lymphocytes T et les NKT), NK1.1 (Natural killer), Ter119 (érythrocytes) CD11b CD11c B220 (mono/macro/DCs). Les HSPCs expriment une grande quantité de c-Kit, un récepteur pour le facteur de croissance des cellules souches SCF (stem cell factors) et le Sca-1 (stem cell factor antigen 1), un marqueur spécifique pour des

cellules souches hématopoïétiques. Ce marqueur disparaîtra progressivement lorsque les HSPCs se différencieront davantage en d'autres types de cellules.

Existe-t-il un précurseur de la lignée dendritique dans la moelle osseuse? Les immunologistes ont longtemps cherché l'existence d'une lignée cellulaire dédiée au développement des DCs et l'ont finalement identifiée et caractérisée dans la moelle osseuse (Fig.1). Les HSPCs, qui ont une grande capacité de prolifération, perdent leur marqueur Sca-1 et acquièrent le Flt3 (CD135) pour devenir des cellules myéloïdes progénitrices (MPs :  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{CX}_3\text{CR1}^- \text{Flt3}^+$ ). Ces MPs deviennent à leur tour des macrophages/monocytes dendritiques précurseurs (MDPs :  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^{\text{hi}} \text{CX}_3\text{CR1}^+ \text{Flt3}^+$ ) en acquérant la molécule  $\text{CX}_3\text{CR1}^+$ . Les MDPs généreront alors soit les monocytes ( $\text{SSC}^{\text{lo}} \text{CD11b}^{\text{hi}} \text{CSF-1R}^+ \text{Gr-1}^{+/-} \text{CX}_3\text{CR1}^+$ ) soit des progéniteurs communs de DCs (CDPs :  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{CX}_3\text{CR1}^+ \text{Flt3}^+ \text{CSF-1R}^+$ ). Ces CDPs généreront finalement les pDCs et les pré-DCs ( $\text{I-A}^- \text{CD11c}^+ \text{Flt3}^+$ ) qui, en migrant vers les organes lymphoïdes secondaires, généreront uniquement les cDCs ( $\text{I-A}^+ \text{CD11c}^{\text{hi}}$ ) sous l'influence de Flt3L (35, 39, 40). Les pDCs et les monocytes qui ont été générés dans la moelle peuvent migrer vers les tissus.

L'origine des DCs des tissus semble différente de celle des organes lymphoïdes secondaires. Dans les muqueuses (intestin, poumon etc...), les deux populations de DCs  $\text{CD103}^+$  et  $\text{CD103}^-$  ont une origine distincte. Dans l'intestin, les DCs  $\text{CD103}^- \text{CX}_3\text{CR1}^+$  proviennent des monocytes du sang sous l'influence de CSF-1 et de Flt3L, alors que les DCs  $\text{CD103}^+ \text{CX}_3\text{CR1}^-$  sont engendrées par les pré-DCs sous le contrôle de Flt3L et de GM-CSF (41). Le poumon est un autre exemple. Il a été suggéré que les DCs  $\text{CD103}^+ \text{CD11b}^-$  proviennent des monocytes  $\text{CCR2}^{\text{hi}} \text{Ly6C}^{\text{hi}}$

et que les DCs CD103<sup>-</sup> CD11b<sup>hi</sup> proviendraient des monocytes CCR2<sup>lo</sup> Ly6C<sup>lo</sup>. Par contre, les DCs interstitielles du poumon sont dépendantes de FLT3 pour leur développement et sont fortement diminuées dans une souris déficiente pour l'expression de Flt3 (42). Ces DCs péribronchiques ne sont pas affectées en nombre dans une souris déficiente pour la molécule Flt3L, ce qui suggère que leur développement provient d'une autre branche que celle des cDCs (37).

Finalement, les immunologistes ont identifié les précurseurs des LCs à l'état de base en absence d'inflammation. Le fait qu'elles résistent à l'irradiation et qu'elles appartiennent à l'hôte original après une très longue période de parasymbiose suggère que les précurseurs des LCs se trouvent directement dans la peau. La parasymbiose est une technique qui consiste à rattacher deux souris congéniques de façon à ce qu'elles partagent la même circulation sanguine. Ainsi, si les précurseurs des LCs provenaient du sang, après un certain temps, l'épiderme contiendrait 50% de LCs provenant du donneur et 50% de l'hôte. Les follicules pileux dans le derme servent de niche pour les progéniteurs de kératinocytes, de mélanocytes et de mastocytes. Il y a des évidences montrant que cette niche pourrait également être celle des progéniteurs de LCs (24). Ceci n'exclut pas le fait que les LCs peuvent se renouveler de manière autonome en se divisant. Dernièrement, le groupe de Geissmann a analysé les LCs néonatales et a découvert qu'au 18<sup>ème</sup> jour de la grossesse, les précurseurs des LCs migrent vers l'épiderme et expriment les molécules telles que le CX<sub>3</sub>CR1, le CSF-1R, le CD11b et le CD45 mais pas encore le Ly6C (Gr-1), le cKit, le Flt3, le CD11c, le CMH-II et la langerine. Entre le jour 0 et 2 post-natals, les précurseurs de LCs acquièrent les phénotypes de LCs, c. à. d. la

langerine, le MHCII, et le CD11c. Les LCs perdent progressivement l'expression du CX<sub>3</sub>CR1 et au 4<sup>ème</sup> jour, les LCs prolifèrent et finissent par exprimer les phénotypes observés chez des souris adultes (43). Contrairement aux LCs, les précurseurs des langerine<sup>+</sup> dDCs proviennent du sang et leur développement ne requiert ni du TGF-β1 ni du CFS-1 (24), mais plutôt du Flt3 et du GM-CSF (44). La nature exacte de ces précurseurs en circulation n'est pas encore identifiée. Quant aux langerine<sup>-</sup> dDCs, elles n'atteignent pas l'équilibre (50/50) après 6 mois de parasymbiose, ce qui suggère qu'une proportion de langerine<sup>-</sup> dDCs prolifère *in situ*. Un an après le transfert adoptif de la moelle osseuse dans une souris irradiée léthalement, 25% des langerine<sup>-</sup> dDCs restent celles de l'hôte. Cette expérience prouve qu'elles sont résistantes à l'irradiation (45).

### **2.3. La circulation des DCs.**

Les DCs circulent dans tous les tissus de l'organisme. Tout commence dans la moelle osseuse où les cellules telles que les HSPCs, les monocytes, pré-DCs et les pDCs sont générées. Elles quittent cet organe lymphoïde primaire par le sang pour se redistribuer dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes primaires/secondaires. Une fois arrivées dans les tissus, elles se différencient en DCs, si ce n'est pas déjà fait. Ensuite, elles patrouillent leur environnement, captent des antigènes et quittent les organes en empruntant les vaisseaux lymphatiques afférents, pour rejoindre les ganglions drainants où elles induisent une réponse immunitaire. Quelques groupes ont rapporté que les DCs peuvent de nouveau quitter les ganglions

par la voie efférente lymphatique et rejoindre la circulation sanguine via le canal thoracique veineux et se redistribuer dans tous les organes. À partir du sang, les DCs peuvent entrer directement dans les ganglions, la rate et le thymus, ou bien retourner dans la moelle osseuse. Pour parvenir à migrer adéquatement, les DCs doivent franchir une série d'étapes séquentielles d'interactions moléculaires et cellulaires analogues à celles démontrées pour l'extravasation des leucocytes. Ces étapes sont constituées par: le roulement, l'activation par les chémokines, l'adhésion et la migration transendothéliale.

Le roulement est la première étape au cours de laquelle les leucocytes s'attachent de manière intermittente à l'endothélium par une interaction de faible affinité (carbohydre-sélectine). Les sélectines sont des protéines membranaires semblables à des lectines. La famille des sélectines inclut trois molécules désignées par les lettres L, E et P. La plupart des leucocytes circulants expriment la sélectine-L, tandis que les sélectines –E et –P sont à la surface des cellules endothéliales. Ces sélectines se lient au lactosaminoglycane sialylé, appelé Sialyl-lewisx. Cette interaction permet aux leucocytes de s'attacher brièvement aux cellules endothéliales, mais la force tangentielle du sang circulant détache rapidement les leucocytes. Les molécules de sélectine d'une autre cellule endothéliale se fixent alors de nouveau aux leucocytes et ce processus se répète de manière à ce que le leucocyte culbute le long de l'endothélium.

Lorsque le leucocyte roule, il est activé par divers chémoattractants membranaires exprimés à la surface des cellules endothéliales, ou solubles secrétés lors d'une réponse inflammatoire. La plupart de ces chémoattractants délivrent des



signaux intracellulaires aux leucocytes via un récepteur couplé à une protéine G (GPCRs) sensible à la toxine *pertusis*, causant le regroupement et l'activation conformationnelle des intégrines. Les intégrines activées, plus particulièrement LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ), VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ), Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ) et  $\alpha 4\beta 7$ , permettent aux leucocytes de s'arrêter fermement en se liant aux cellules endothéliales par l'intermédiaire des molécules de la super famille des immunoglobulines telles que l'ICAM-1, l'ICAM-2, le VCAM-1 et le MAdCAM-1. Une fois adhérents solidement, les leucocytes suivent le gradient de chémokines et migrent à travers les cellules endothéliales, un processus appelé diapédèse (46).

Dans ce chapitre, nous introduirons les mécanismes utilisés par les DCs pour migrer vers les divers organes. Ces mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la migration des DCs ou des précurseurs des DCs ne sont pas totalement caractérisés. L'information présentée ici sera donc partielle, fragmentaire et incomplète (Fig.2).

### **2.3.1. La migration des DCs du sang vers les tissus non lymphoïdes.**

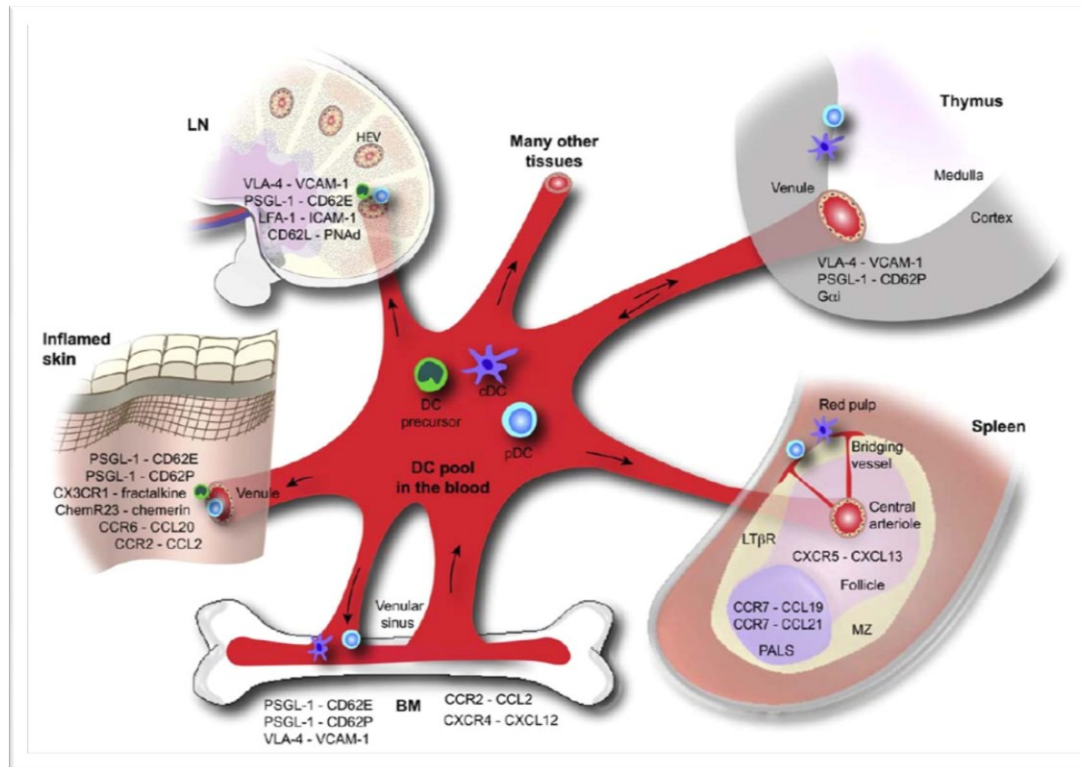
La plupart de nos connaissances est basée sur le transfert adoptif par la voie intraveineuse (i.v.) des DCs immatures (iDCs) et matures (mDCs) marquées à la fluorescence ainsi que par des études des souris déficientes pour l'expression d'une molécule donnée impliquée dans la migration des DCs. L'arrivée de nouvelles technologies telles que la parasymbiose et les souris chimériques ont poussé plus loin notre compréhension de la migration des DCs. Ces méthodes ont permis de

déterminer que les iDCs utilisent les sélectines –E et –P sur l’endothélium pour leur extravasation vers la peau inflammatoire. Par contre, ce processus est indépendant de la molécule PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) exprimée sur les iDCs, ce qui suggère fortement qu’il y a d’autres ligands pour les sélectines (47). Ceci n’exclut pas le fait que le PSGL-1 peut être utilisé par les monocytes ou les HSC afin d’adhérer aux cellules endothéliales. D’autres groupes ont démontré qu’*in vitro*, l’ICAM-2 est impliqué dans la transmigration des iDCs à travers les cellules endothéliales (48), mais que son ligand connu, l’intégrine  $\beta 2$ , n’est pas requis. Ils proposent que l’ICAM-2 sur l’endothélium se lie au DC-SIGN, une liaison connue chez l’humain. Bref, les sélectines –E et –P semblent être des molécules que les DCs, les monocytes et les précurseurs des DCs n’utilisent que pour la première étape de l’adhésion endothéliale.

La migration des précurseurs des DCs, à l’exception des monocytes, a été principalement étudiée dans les organes lymphoïdes secondaires car le recrutement de ces cellules vers les tissus périphériques est un événement rare. En revanche, le recrutement des monocytes vers les tissus non-lymphoïdes a été rapporté dans plusieurs tissus tels que la peau, les intestins et les poumons, principalement lors d’une inflammation. Les chémokines-clés impliquées dans le recrutement des précurseurs des LCs (monocytes) vers l’épiderme sont le CCR2 et le CCR6, des récepteurs de chémokines à motif C-C. Mais ceci n’est vrai que lors d’une inflammation. En effet, à l’état de base, les cellules endothéliales produisent très peu de CCL2 et CCL7 (ligands de CCR2) et de CCL20 (ligand de CCR6) (23). En ce qui concerne les langerine<sup>+</sup> dDCs, seul le CCR2 est indispensable à leur recrutement. À

l'état de base, les langerine<sup>-</sup> dDCs se divisent *in situ*, mais lors d'une inflammation, leur recrutement dépend totalement, encore une fois, du CCR2 (45). En général, le CCR2 semble être le récepteur impliqué dans le recrutement des monocytes inflammatoires CCR2<sup>hi</sup>Ly6C<sup>hi</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>lo</sup> vers les sites infectieux incluant les intestins et les poumons où ils se transforment en DCs (33, 49, 50). Or, Serbina et al. ont rapporté que le CCR2 est plutôt nécessaire pour l'émigration des monocytes hors de la moelle osseuse et non pour le recrutement vers l'intestin après l'infection à la *Listeria monocytogène* (51). Une deuxième sous-population de monocytes, CCR2<sup>lo/-</sup>Ly6C<sup>-</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup>, patrouille à la surface du lumen des micro-vaisseaux, prête à entrer dans les tissus lors d'une inflammation (52). Quant aux pré-DCs, la chémokine responsable de leur recrutement dans l'intestin n'a pas encore été décrite. En ce qui concerne les pDCs, il est difficile de déterminer leur provenance. Néanmoins, elles utilisent le CCL25, ligand de CCR9, pour pénétrer et s'accumuler dans la lamina propria intestinale. Il existe une autre molécule chémoattractante, la « chemerin », générée par l'action d'une protéase sérine activée durant la coagulation, la fibrinolyse et l'inflammation. Le chemerin est absent de la peau au repos, mais son expression augmente lors d'une inflammation. Il recrute les pDCs via la serpentine.

**Figure 2: Les molécules impliquées dans la migration des DCs vers de divers organes**



Les cDCs et les DCs précurseurs migrent vers les tissus en empruntant la circulation sanguine. Elles peuvent entrer directement dans les tissus non-lymphoïdes, les ganglions, la rate et le thymus, ou bien retourner à la moelle osseuse. Pour parvenir à migrer adéquatement, les DCs doivent franchir une série d'étapes séquentielles d'interactions moléculaires et cellulaires. David Alvarez et al. *Immunity* 2008

### 2.3.2. La migration des DCs du sang vers les organes lymphoïdes secondaires (SLO)

Les expériences avec les souris chimériques nous ont montré que les DCs résidentes des ganglions sont constamment renouvelées par l'arrivée de pré-DCs. Par contre, le mécanisme décrivant le passage de ces cellules à travers les HEV (high endothelial venules) pour accéder aux ganglions est encore obscur. Ce passage semble dépendre de la molécule sélectine-L. Des cDCs différenciées *in vitro* et injectées par la voie intraveineuse s'accumulent dans la plupart des organes lymphoïdes, à l'exception des ganglions (53). Contrairement aux cDCs, les pDCs provenant de la moelle osseuse expriment une grande quantité de sélectines-L. Ces pDCs utilisent les interactions telles que la sélectine-L avec PNAd (L-selectine peripheral node addressin) et la sélectine-E avec le PSGL-1 pour s'attacher au HEVs. Elles utilisent également le LFA-1 et le VLA-4 qui leur permettent de s'arrêter et de s'attacher fermement. Les pDCs sont fortement attirées par le CCL19 et le CCL21 qui sont exprimées constamment par les SLO. Les HEVs expriment également la chémokine CCL2, le PNAd et la sélectine-E pour recruter les monocytes CCR2<sup>+</sup>. Une très petite sous-population de monocytes utilise le CXCR3, ligand de CXCL9, pour accéder au SLO. En ce qui concerne la rate, les molécules impliquées pour l'entrée des DCs ne sont pas encore connues. Nos travaux indiquent que les DCs Sirp- $\alpha^+$  utilisent le CD47 pour s'accumuler dans la zone marginale de la rate.

### **2.3.3. Migration de tissus périphériques vers les SLO**

La réponse immunitaire est basée principalement sur le processus d'émigration tissulaire des DCs vers les SLO qui est divisé en 5 étapes : 1) l'activation et la maturation, 2) le détachement, 3) la migration interstitielle, 4) l'entrée dans le système lymphatique afférent et 5) le transit via la lymphe. La plupart de nos connaissances sur ces étapes proviennent des données obtenues à partir des expériences faites sur la migration des DCs de la peau. Par conséquent, dans cette section, nous nous limiterons à l'émigration des DCs de la peau vers les SLO (Fig.4).

#### **2.3.3.1. La reconnaissance des pathogènes et la maturation des DCs**

Les DCs établissent un lien entre le système immunitaire inné et adaptatif. Elles deviennent matures suite à la reconnaissance directe des pathogènes via des motifs exprimés par ces derniers, appelés « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPS) en réponse aux cytokines inflammatoires produites par les cellules immunitaires innées. Les récepteurs de DCs participant à leur maturation sont répartis en 4 grandes catégories : les PRRs (patterns-recognition receptor) qui reconnaissent les PAMPS, les récepteurs de cytokines, les récepteurs des fragments Fc (FcR) et les récepteurs détectant des cellules mortes (Fig3).

Pour reconnaître une panoplie de pathogènes différents, les DCs emploient une série de récepteurs qui reconnaissent chacun un type ou un groupe de molécules

immunogéniques microbiennes. Parmi les PRRs, les TLRs (toll-like receptors) sont les plus étudiés. Ils font partie de la famille des TIR (toll/IL1 receptor). Chez les mammifères, on compte treize TLRs différents qui sont spécifiques de structures microbiennes hautement conservées. Les TLRs sont caractérisés par les molécules adaptatrices intracellulaires qu'ils recrutent par leurs agonistes et par leur localisation. La première catégorie de TLRs est composée des molécules 1, 2, 4, 5 et 6 qui se tiennent à la surface de la cellule, leur permettant la détection de molécules extracellulaires, tandis que la deuxième catégorie comprend les TLR 3, 7, 8 et 9 qui sont localisées à l'intérieur de la cellule, se regroupent à la surface des endosomes, ce qui confère à la DC l'aptitude à reconnaître et discriminer les acides nucléiques microbiens et ceux de l'hôte (54). Le TLR4 répond aux bactéries GRAM négatives en se liant au LPS. Les données récentes montrent que le TLR4 reconnaît aussi plusieurs autres ligands non reliés au LPS tels que le *Taxol*, la protéine de fusion du virus syncytial respiratoire, le fibronectine, le HSP60-70 (heat shock protéin) et le hyaluronan (54). Le fait que le TLR puisse reconnaître des protéines endogènes comme le fibronectine et le HSP nous suggère que le TLR joue le rôle d'un détecteur de danger plutôt qu'un simple récepteur des microbes. Le TLR2 est impliqué dans la réponse contre les mycobactéries, le zymosan (un composant de la paroi des champignons) et la paroi bactérienne des agents GRAM positifs. Le TLR2 forme un hétérodimère avec le TLR1 qui se lie au peptidoglycane et au triacyl-lipoprotéine (55), ou avec le TLR6 qui détecte la diacyl-lipoprotéine des mycoplasmes. Le TLR5 reconnaît les flagelles bactériennes GRAM positifs aussi bien que les GRAM négatifs. Le deuxième groupe de TLRs reconnaît les acides nucléiques microbiens.

Le TLR3 se spécialise dans la reconnaissance des doubles brins d'ARN, alors que les TLR7/8 détectent les simples brins ARN. Le ligand du TLR9 est le CpG non-méthylé qui représente moins de 1% chez les mammifères. Autres que les TLRs, le RIG-I (retinoic acid inducible gene I) et le MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) reconnaissent également l'ARN viral. Le TLR11 est impliqué dans la reconnaissance des bactéries uropathogéniques (56). La signalisation intracellulaire de TLR menant à l'activation des DCs est classifiée en deux voies : la voie MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) dépendante et indépendante. Tous les TLRs utilisent le médiateur MyD88 excepté le TLR3 qui recrute le médiateur TRIF (TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- $\beta$ ). Le résultat final de ces signalisations contrôle la viabilité et l'inflammation des DCs. Les TLRs ne sont pas uniquement exprimés sur des DCs. Ils se retrouvent aussi sur d'autres leucocytes et sur les cellules épithéliales. Suite à l'engagement des TLR, ces cellules sécrètent une panoplie de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1  $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le PGE2 qui peuvent activer les DCs.

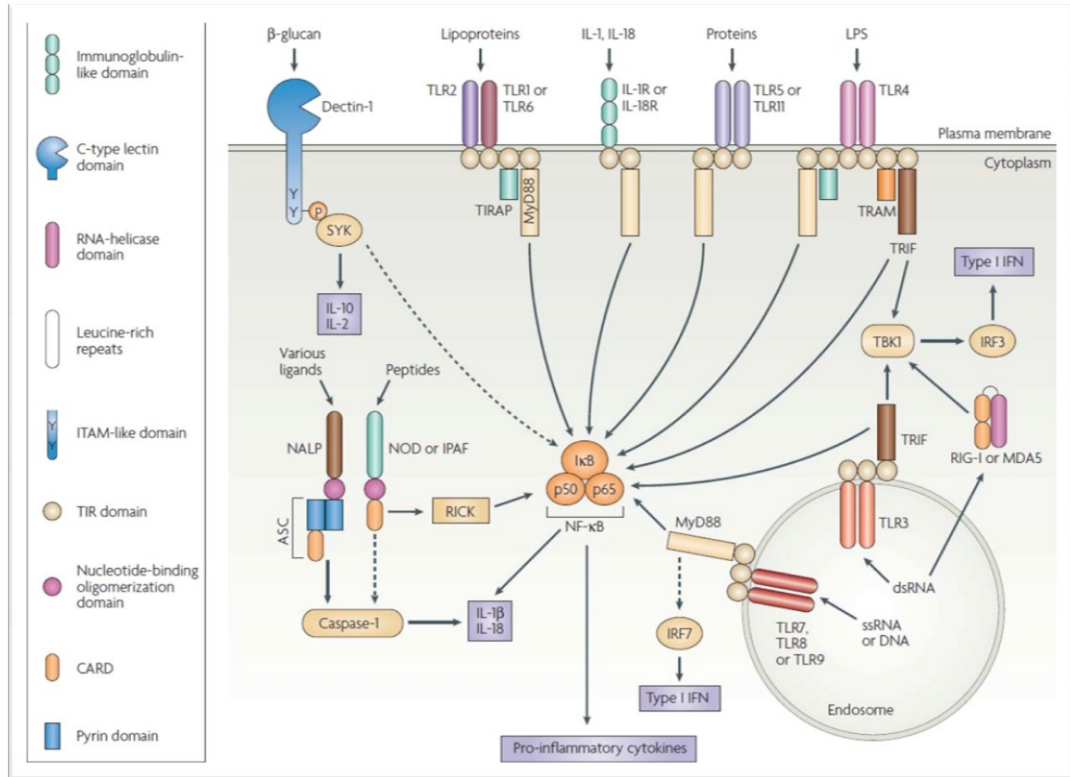
Contrairement aux TLRs qui se situent à la surface de la membrane cellulaire, les NLRs (NOD-like receptor) sont des détecteurs de motifs pathogènes dans le cytosol et leur fonction principale est de régulariser la production de cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (57). Les NLRs sont classés en deux catégories. La première, NODs, dépend de la signalisation via le NF- $\kappa$ B, tandis que la seconde, NALPs, rassemble un complexe connu sous le nom « inflammasome » qui active par le clivage via les caspases des pro-cytokines telles que le pro-IL-1 $\beta$  et le pro-IL18. Le NOD1 reconnaît D- $\gamma$ -glutamylmeso-DAP et le NOD2, muramyl dipeptide. Quant



au NALP1, il détecte la toxine de l'anthrax et le NALP3, la *Listeria Monocytogenes*, le *S. aureus*, l'adjuvant aluminium et l'acide urique (58).

Le récepteur CD40 qui fait partie de la famille du TNF peut se lier au ligand de CD40 (CD40L) exprimé sur les cellules T activées ou les cellules T centrales mémoires. Cette liaison permet aux DCs d'augmenter leur survie, de produire des cytokines et de compléter leur maturation. Les DCs peuvent également capter les complexes d'anticorps via les récepteurs Fc incluant Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII, Fc $\gamma$ RI, et Fc $\gamma$ R. Lors d'une inflammation, les cellules nécrotiques (non apoptotiques) relâchent dans le milieu des facteurs tels que les nucléotides (ATP et UTP) et les Hsp (heat shock protein) qui activent les DCs.

**Figure 3: Les PAMPS des DCs**



Les DCs reconnaissent les pathogènes via les PAMPS, ce qui se traduit par l'activation de la voie NF-κB conduisant à la production de cytokines proinflammatoires. Les PAMPS sont divisés en deux catégories caractérisées par leur localisation. La première est composée de TLRs qui se situent sur la membrane (membrane plasmique ou membrane endosomale). La deuxième est formée de détecteur intra-cytosol. Giorgio Trinchieri et Alan Sher, Nature Review 2007.

### **2.3.3.2. Détachement**

Suite à une exposition aux agents pathogènes (via les récepteurs Toll-like (TLR)) ou à des cytokines inflammatoires (telles que IL-1  $\beta$  et TNF- $\alpha$ ), les DCs s'activent, réarrangent leur répertoires de récepteurs aux chémokines, augmentent leur capacité à présenter l'Ag et éventuellement migrent vers les ganglions. La première étape indispensable à ce processus passe par le détachement de la DC de son environnement. Les LCs sont attachées aux cellules kératinocytes par E-cadhérine. Il suffit de rompre sélectivement cette interaction pour que les DCs deviennent matures et migrent vers les ganglions (59). Les cytokines proinflammatoires mentionnées plus haut comptent parmi les facteurs qui induisent la diminution de l'expression d'E-cadhérine ainsi que l'augmentation du CCR7, la principale chémokine responsable de la migration des DCs (60). Contrairement à l'IL-1 $\beta$  et au TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ 1 augmente l'expression d'E-cadhérine et diminue l'expression du récepteur chémokine CCR7 et favorise donc la rétention des DCs dans la peau (61, 62).

### **2.3.3.3. La migration interstitielle**

Une fois détachées, les DCs doivent passer à travers les tissus riches en protéines extra-matricielle, telles que le collagène de type I-IV, le fibronectine et la laminine, avant d'accéder aux vaisseaux lymphatiques. Pour traverser ces obstacles, les DCs sécrètent des enzymes protéolytiques membranaires ou solubles, comme les

MMPs (matrix metalloproteinase) et plus particulièrement le MMP-2 et MMP-9. Ces protéases sont contrôlées par le TIM (inhibitors of metalloproteinases), un enzyme endogène. En devenant matures, les DCs augmentent l'expression de MMP-2 et de MMP-9 et diminuent celle de TIM. Cette balance entre MMP et TIM guide les DCs pendant tout le processus de migration vers le vaisseau lymphatique. De plus, les DCs modifient leur répertoire de récepteurs aux chémokines, dont les ligands sont exprimés sur les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. Le CCR7 est un des récepteurs aux chémokines les plus étudiés. Il se lie à ses ligands, tels que le CCL19 et le CCL21, exprimés tout au long du tissu lymphatique guidant les DCs jusqu'au ganglion drainant. L'expression de ces deux ligands augmente lorsque les cellules endothéliales sont exposées au TNF- $\alpha$ . Étant donné que la migration des DCs cutanées n'est pas abolie à 100 % chez des souris CCR7<sup>-/-</sup>, d'autres molécules, telles que le récepteur chémokine CXCR4 sont impliquées dans le recrutement. En effet, le CXCR4 interagit avec son ligand, le CXCL12, exprimé sur les cellules endothéliales pour permettre aux DCs cutanées de pénétrer dans le vaisseau lymphatique (63, 64). Le sphingosine-1-phosphate (S1P) est également une molécule soluble chémoattractante différente des chémokines classiques impliquée dans la migration des DCs. Sa concentration est élevée dans le fluide lymphatique, mais très basse dans le milieu interstitiel, ce qui permet aux DCs qui possèdent le récepteur de sphingosine-1-phosphate 1 (S1P<sub>1</sub>) de migrer en suivant le gradient de concentration (65). Les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques augmentent leur expression de sélectine-E, de chémokines (CCL5, CCL20 et CXCL5) et de molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) suite à une exposition aux cytokines

pro-inflammatoires, mais l'implication directe de ces molécules dans la migration des DCs n'est pas encore prouvée. Il a été démontré que les anticorps neutralisant ICAM-1 et VCAM-1 bloquent l'adhésion et la transmigration des DCs à travers les cellules endothéliales lymphatiques *in vitro* et *in vivo*. De plus, les souris déficientes pour la molécule ICAM-1 montrent une défaillance dans la migration des DCs. Mais plus récemment, le rôle des intégrines a été révisé. Les DCs déficientes pour toutes les intégrines hétérodimériques ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 7$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_v$  et  $\alpha_x$ ) migrent normalement de la peau vers le SLO, montrant que les DCs peuvent rejoindre les SLO en absence d'intégrine (66). De même, la migration des LCs n'est pas altérée dans les souris déficientes pour les ligands des sélectines, ce qui prouve que les sélectines ne sont pas essentielles à la migration des LCs pour pénétrer dans le vaisseau lymphatique (67). Les DCs doivent traverser une barrière de cellules endothéliales attachées ensemble par plusieurs molécules jonctionnelles, incluant la molécule d'adhésion JAMs. Les DCs migrent mieux dans les souris déficientes pour l'expression de JAM-A, ce qui indique qu'à l'état de base, les DCs ont un accès restreint aux vaisseaux lymphatiques (68).

#### **2.3.3.4. La migration dans le réseau lymphatique**

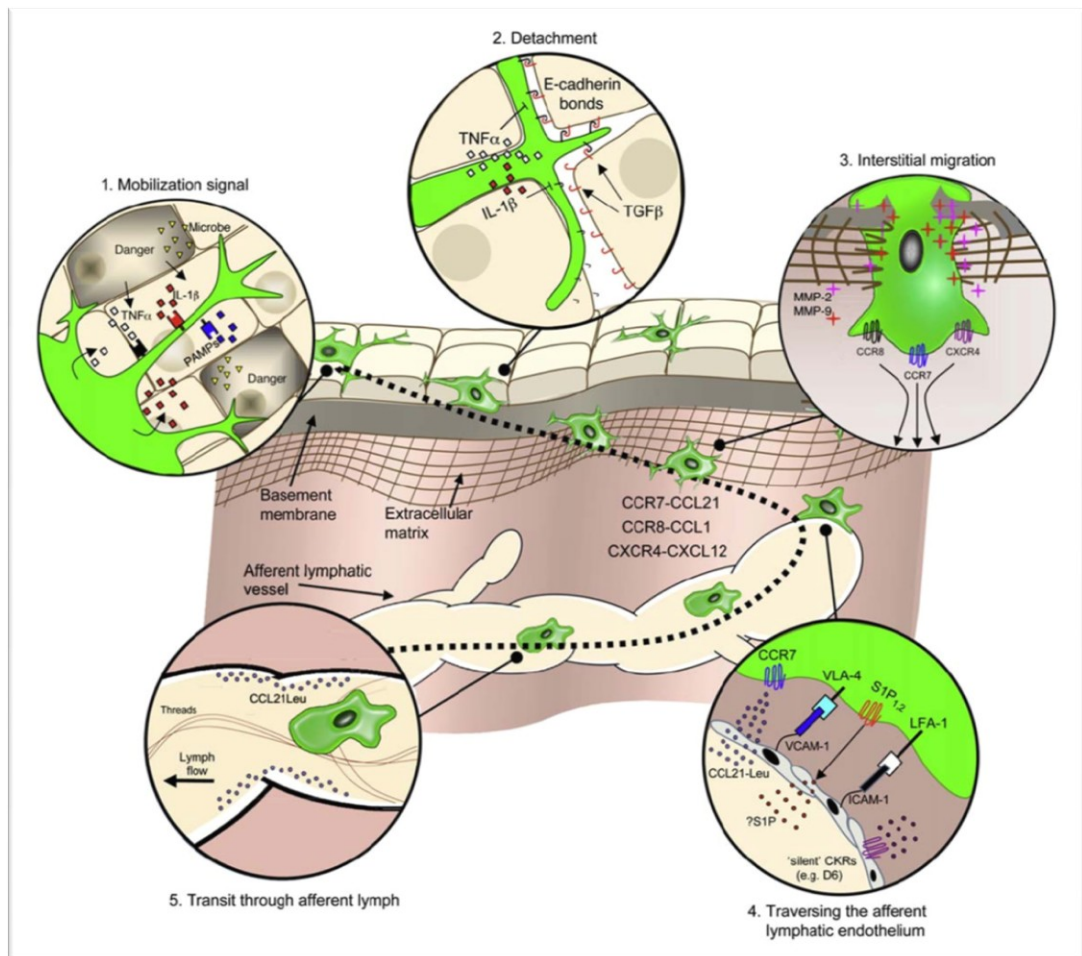
Une fois dans la lymphe, les DCs suivent le courant unidirectionnel du fluide jusqu'aux ganglions. Ce courant est créé par une série de facteurs comme la perméabilité microvasculaire périphérique, le gradient de pression hydrostatique, oncotique et du milieu interstitiel, la pulsation près de vaisseaux sanguins, la

contraction musculaire et les propriétés contractiles intrinsèques des vaisseaux lymphatiques (69).

#### **2.3.3.5. Le déplacement dans le ganglion**

Les DCs arrivent aux ganglions par la voie afférente et entrent dans le sinus subcapsulaire. Par la suite, elles doivent passer à travers une série de structures compactes, telles que le cortex, le parenchyme et la médulla. Le mécanisme par lequel les DCs se faufilent entre ces couches de cellules n'est pas tout à fait élucidé. Le CCR7 semble être la chémokine clé guidant des DCs jusqu'à aux zones T. De plus, les ligands de CCR7 sont fortement exprimés autour d'HEV, lieu d'arrivée dans le ganglion des cellules T et des B où les DCs peuvent présenter les antigènes récemment acquis en périphérie aux lymphocytes. Dans la zone T, les DCs produisent elles-mêmes le CCL19 qui établit un gradient de concentration qui attire non seulement les cellules T, mais aussi les autres DCs migratoires. Ce processus est sans doute nécessaire pour le transfert potentiel d'antigènes entre les DCs migratoires et résidentes. Le processus impliqué dans la sortie des DCs du ganglion par la voie lymphatique efférente est complètement inconnu, mais suggéré par plusieurs études.

**Figure 4: La migration des DCs hors de la peau**



Activées par des pathogènes, les DCs augmentent leur récepteurs de chémokines et d'adhésion et dégradent les protéines de matrices extracellulaires pour accéder aux vaisseaux lymphatiques. Une fois dans la lymphe, les DCs migrent vers les ganglions drainant, guidées par un gradient de chémokine. David Alvarez et al. *Immunity* 2008

#### **2.3.4. La migration vers les organes lymphoïdes primaires**

Les DCs en circulation peuvent également circuler dans les organes lymphoïdes primaires. Elles transportent vers la moelle osseuse et le thymus des antigènes provenant de différentes parties du corps. Par contre, l'impact sur la réponse immunitaire est complètement différent. La moelle osseuse est un réservoir pour les lymphocytes T mémoires et peut dans ce sens également jouer le rôle d'organe lymphoïde secondaire. Les DCs activées provenant des autres tissus peuvent induire une réponse des T mémoires extrêmement rapide dans la moelle osseuse (53). Pour accéder à la moelle osseuse, les DCs, qu'elles soient immatures ou matures, utilisent les interactions moléculaires, telles que le PSGL-1 avec le sélectine-E, -P et le VLA-4 avec le VCAM-1. Contrairement à la moelle osseuse, seules les DCs immatures peuvent rentrer dans le thymus. Cette mesure de sécurité permet d'induire la tolérance centrale en éliminant les lymphocytes T par la sélection négative et empêche des DCs matures de transporter des antigènes provenant des agents pathogènes (70).



## 2.4. La capture et la présentation d'antigène

La phagocytose, jusqu'à la présentation d'antigène, est une suite d'évènements bien orchestrée. Les iDCs, en devenant matures, perdent leur capacité endocytaire et augmentent leur faculté de présenter l'antigène. Le système immunitaire utilise trois voies différentes de présentation de l'antigène : les antigènes endogènes sont apprêtés dans la voie cytosolique, puis présentés à la membrane par des molécules de CMH de la classe I (CMH-1). Quant aux antigènes exogènes, ils suivent la voie endocytaire et sont présentés sur la membrane par des molécules du CMH de classe II. La troisième voie, connue sous le nom de « la présentation croisée », consiste à présenter les antigènes captés par l'endocytose via CMH-I. Ces trois processus ont été étudiés en détails depuis les 20 dernières années. Nous survolerons rapidement le sujet.

Les antigènes du milieu sont absorbés par les DCs par un processus de phagocytose ou de macropinocytose. Les deux processus dépendent du remaniement de l'actine et aboutissent à la formation d'une large vacuole intracellulaire. En général, la phagocytose est médiée par des récepteurs spécifiques, tandis que la macropinocytose est un phénomène passif qui permet aux DCs de collecter rapidement et d'une façon non-spécifique les antigènes du milieu.

Le processus de phagocytose commence par la reconnaissance des antigènes tels que des micro-organismes, des molécules solubles, des cellules endomagées ou mortes, des débris cellulaires ou des facteurs de coagulation qui activent les iDCs. Ces antigènes sont reconnus par des récepteurs endocytiques, par exemple, les

récepteurs Fc de l'immunoglobuline, les Hsp, les SR (scavenger receptor), les récepteurs du complément CR3 et CR4, la famille de lectine de type C, tels que le DEC205/33D1 ou le MMR (macrophage manose récepteur). L'engagement des récepteurs induit des protrusions membranaires, appelées pseudopodes, qui s'étendent autour du matériel fixé. Des médiateurs intracellulaires initient des signaux aboutissant au recrutement de clathrine pour former la vésicule endocytaire. La fusion des pseudopodes inclut le matériel dans une structure entourée d'une membrane et nommée phagosome. En se déplaçant à l'intérieur de la cellule, le phagosome fusionne avec le lysosome formant le phagolysosome. Cette vésicule est composée d'enzymes hydrolytiques incluant des protéases, des nucléases, des glycosidases et des phosphatases qui dégradent le matériel ingéré.

#### **2.4.1. La présentation d'antigène via CMH classe II (CMH-II)**

Peu après leur fabrication dans le réticulum endoplasmique (RE), les paires de chaîne  $\alpha\beta$  de la molécule classe II s'associent à la chaîne invariante (Ii) pour former un trimère. En fait, cette chaîne invariante interagit avec la cavité de liaison peptidique de la molécule de classe II, empêchant tous les peptides dérivés des protéines endogènes de se lier au même endroit tant que la molécule de classe II est localisée dans le RE. Le CMH II est alors transporté vers le lysosome en passant par le complexe de Golgi. Ce transport nécessite un signal donné par la chaîne Ii. Une fois arrivée au lysosome, la chaîne Ii est dégradée par plusieurs enzymes protéolytiques de la famille des cathepsines laissant un fragment CLIP qui sera

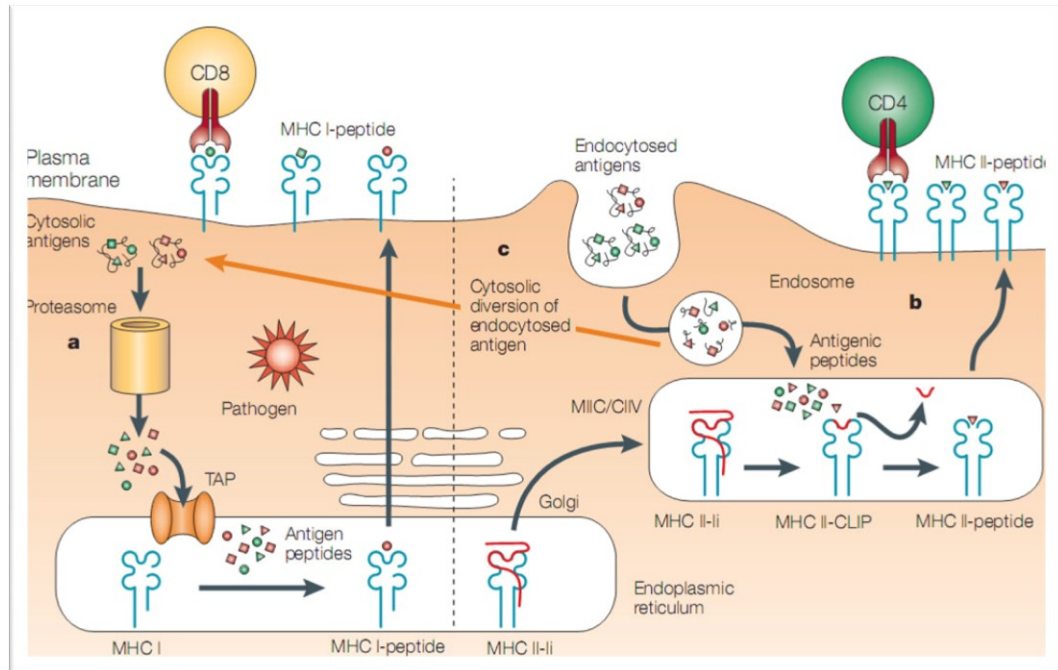
dégradé par le HLA-DM, une molécule CMH non-classique, cédant ainsi la place au peptide antigénique qui se liera à la molécule de classe II. La régulation du CMH II est fortement modulée durant la vie d'une cellule dendritique. Les iDCs expriment peu de CMH II à la surface, mais augmentent leur expression au cours de la maturation. Comparées aux mDCs, les antigènes se dégradent très lentement à l'intérieur des iDCs, ce qui limite énormément la liaison des peptides au CMH-II. Cette lenteur dans le processus de dégradation d'antigène est due à l'inefficacité des protéases, comme le cathepsine B, le Iip41, une variante de la chaîne Ii, connue pour ses activités d'inhibition de la protéase à cystéine. En raison de l'inactivation des protéases, la dégradation de la chaîne Ii peut être incomplète (Ii10). En devenant matures, la capacité endocytaire des DCs diminue, alors que la synthèse des CMH-II et l'activité des protéases sont augmentées. Ces CMH-II chargés de peptides antigéniques sont transportés vers les vésicules endocytiques où se trouvent les molécules de co-stimulation de la famille des B7 et le CMH-I. Cette vésicule est dirigée vers la surface membranaire à l'endroit où se forme la synapse immunologique.

#### **2.4.2. La présentation d'antigène via le CMH de la classe I (CMH-I).**

Les DCs utilisent cette voie pour présenter les peptides endogènes et les antigènes viraux. Les peptides chargés sur le CMH-I sont dégradés dans le cytosol par les protéases. Lorsque les protéines sont destinées à être dégradées, et en raison à leur dénaturation ou d'un défaut de leur repli, elles sont marquées par une petite

protéine ubiquitine. Cette ubiquitination permet au complexe protéasome de reconnaître et de dégrader la protéine en petits peptides de 8 à 13 acides aminés. Ensuite, les peptides sont transportés à travers la membrane du RE par un transporteur ATP-dépendant appelé TAP (transporters associated with antigen processing). La chaîne  $\alpha$  de la classe I du CMH associée à la calnexine se fixe à la  $\beta$ 2-microglobuline. Elle se dissocie ensuite de la calnexine, puis se lie à la calréticuline et à la tapasine associées à la protéine transmembranaire TAP. Ce complexe de classe I du CMH capte ensuite un peptide antigénique, ce qui permet la dissociation du complexe CMH-peptide des chaperons. Finalement, l'ensemble de molécules de classe I du CMH-peptides est transporté du RE, à travers le complexe du Golgi, vers la membrane plasmique. Quand les DCs deviennent matures, la dynamique de la machinerie change : la demi-vie du CMH-I augmente et un changement dans la synthèse des différents types de protéasomes peut favoriser la présentation de certains épitopes et en défavoriser d'autres.

**Figure 5: Présentation d'antigènes de CMH classe I et II**



William R. Heath & Francis R. Carbone, Nature Review Immunology 2001

### 2.4.3. La présentation croisée d'antigène

La présentation croisée est une voie que les DCs utilisent pour présenter via le CMH-I les antigènes exogènes qui sont normalement présentés par le CMH-II. Cette voie est extrêmement importante pour combattre les virus et le cancer et pour induire la tolérance aux antigènes de soi. Lorsque les DCs phagocytent les cellules apoptotiques, cette voie permet aux DCs de présenter les antigènes de soi aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et d'éliminer ainsi les cellules CD8<sup>+</sup> auto-réactifs. Dans le cas d'une infection virale, les DCs captent la cellule infectée, la digèrent et présentent l'antigène viral aux CTL (cytotoxic T lymphocyte).

Plusieurs modèles décrivant la voie de la présentation croisée ont été proposés (Fig.6), mais les débats auprès des scientifiques sur leur validité sont encore très vigoureux. Nous présenterons donc plusieurs de ces modèles qui ont été partiellement validés depuis ces dernières années.

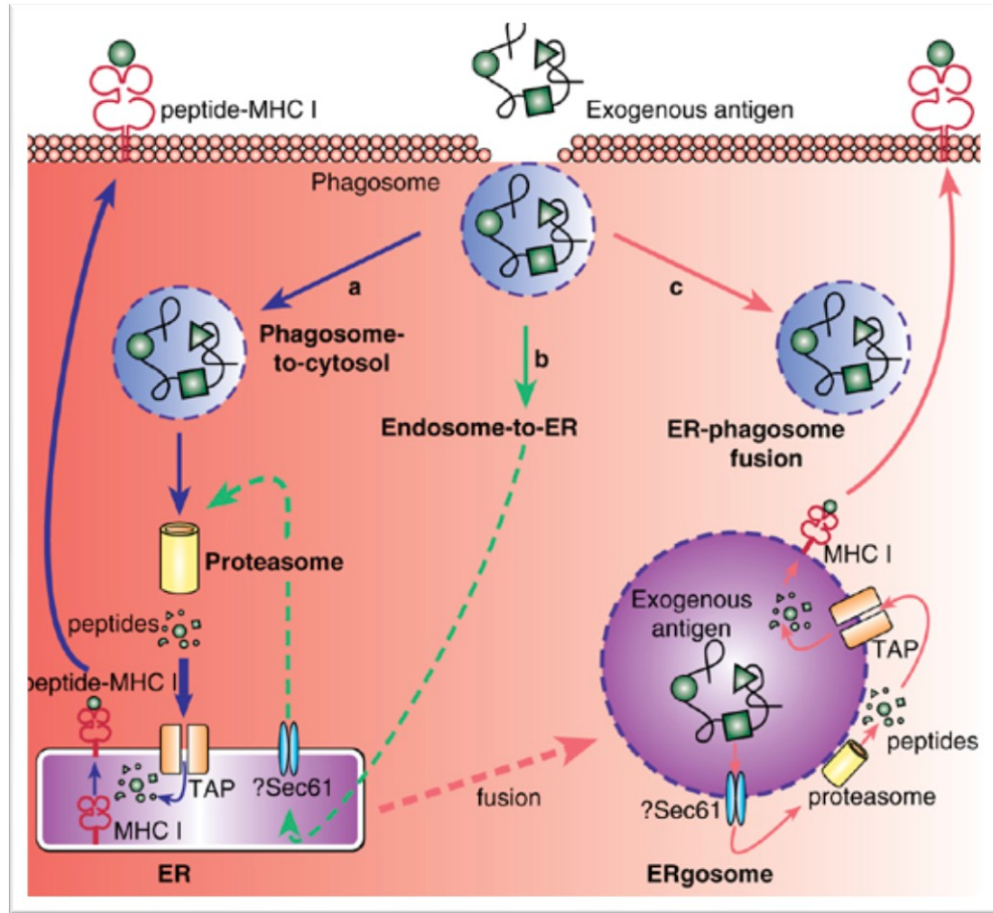
**La voie cytolitique** : lors du déplacement de l'endosome dans la DC, les antigènes peuvent être transloqués vers le cytosol où ils sont dégradés en peptides par le protéasome (71, 72). Les mécanismes par lesquels ces antigènes sont transloqués du phagosome au cytosol sont encore obscurs. Des évidences indiquent que l'antigène interagit avec le translocone Sec61, un ERAD (endoplasmic reticulum(ER) - associated degradation), responsable de la translocation (73) de l'antigène vers le cytosol. Une fois dégradés par les protéasomes, les peptides sont transportés dans l'ER par la protéine TAP. De là, les peptides sont chargés sur les CMH-I. L'acheminement de CMH-I est dépendant de l'appareil de Golgi car cette voie est inhibée lors de l'utilisation de brefedin A. Une des critiques majeures de cette voie est que selon la structure obtenue par la cristallographie, le canal Sec61 serait trop petit pour pouvoir transloquer des grosses protéines. Trois hypothèses sont avancées: 1) le Sec61 peut s'agrandir lors de la translocation, 2) l'antigène est déplié lors du passage dans le Sec61, 3) il existe d'autres voies de translocation non-découvertes. Pour le moment, le mécanisme exact de la translocation reste sans réponse (74).

**La voie de la fusion entre le RE et phagosome** : La fusion de l'ER et du phagosome forme une enveloppe appelée « ERgosome » qui permet de décharger directement les machineries de RE dans le phagosome. Par la suite, le Sec61

transloque vers le cytosol les protéines qui seront dégradées par les protéasomes. Les peptides générés sont retransportés dans le RE par les protéines TAP et sont ensuite chargés sur le CMH-I. Les protéines d'ER et toutes les machineries pour l'assemblage de CMH-I se retrouvent dans le phagosome deux heures seulement après l'internalisation favorisant l'existence de cette voie (75, 76). Néanmoins, ce mécanisme a été remis en question par plusieurs chercheurs. Touret et al. n'ont pas réussi à détecter la fusion entre le RE et le phagosome, même en utilisant un arsenal de combinaison de techniques biochimiques, d'images fluorescentes et de microscopie électronique. Ils ont observé que le phagosome était constitué d'une membrane plasmique et non d'ER (77). Dans la même année, un autre groupe a démontré avec un modèle mathématique que cette voie de la présentation croisée serait extrêmement inefficace (78).

**La voie de l'endosome à RE :** quelques groupes proposent que, lorsque les DCs captent les antigènes solubles, l'endosome déversera directement l'antigène dans l'ER où l'antigène est monté sur le CMH-I. Mais la signification biologique de cette voie est encore inconnue (79).

Figure 6: La présentation croisée

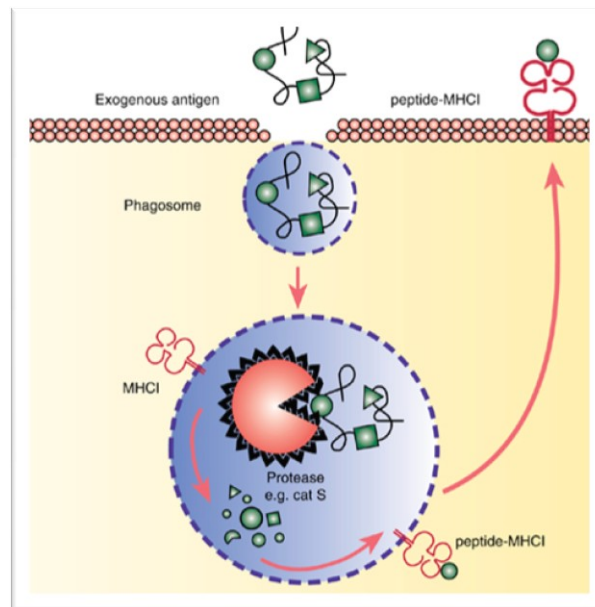


Les modèles de présentation croisée proposés. A) La voie cytotylique B) La voie de l'endosome à RE. C) La voie de la fusion entre le RE et phagosome. Ming-Lee Lin, Yifan Zhan, Jose A Villadangos et Andrew M Lew, Immunology and Cell Biology 2008



**La voie alternative vacuolaire :** Contrairement à toutes les autres voies, celle-ci est indépendante de protéasomes et des protéines TAP. La formation de phagosome englobent également les CMH-I qui sont présents initialement à la surface de la cellule. Ensuite, l'antigène est dégradé à l'intérieur du phagosome, un mécanisme qui requiert la protéase cystéine cathepsin S, les peptides générés sont changés sur le CMH-I recyclé et le tout est transporté à la surface (74). À un pH bas, l'échange entre l'ancien peptide et le nouveau peptide est possible (80). Plusieurs questions demeurent encore sans réponse. Comment les protéasomes lysosomaux peuvent-ils générer les mêmes peptides que les protéasomes cytosoliques? D'autres auteurs ont remarqué que le phagosome contient une trop grande variété d'hydrolases pour dégrader convenablement les antigènes en 8 à 16 acides aminées (74).

**Figure 7: La voie alternative vacuolaire**



Ming-Lee Lin, Yifan Zhan, Jose A Villadangos et Andrew M Lew, Immunology and Cell Biology 2008

Est-ce que toutes les sous-populations de DCs présentent l'antigène de la même façon? La réponse à cette question brûlante définirait le rôle et la limite de chaque sous-population de DCs. Il a été démontré que les pDCs sécrètent une énorme quantité de TFN- $\alpha$  en réponse à une infection virale. Par contre, la présentation d'antigènes exogènes n'est pas sa spécialité et encore moins la présentation croisée (81). Quoique chez l'humain, les pDCs semblent pouvoir présenter les antigènes du VIH via la présentation croisée (82), il reste à montrer si ce phénomène existe *in vivo*. Les cDCs, qui sont divisées en CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup>, possèdent des propriétés de présentation d'antigènes distinctes. Les deux sont capables de présenter les antigènes exogènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les antigènes endogènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, mais seulement les DCs CD8<sup>+</sup> sont efficaces pour la présentation croisée (83). Quant aux DCs migratoires, l'opinion est partagée. Il faut faire une distinction entre la capacité à présenter l'antigène *in vitro* et la présentation réelle *in vivo*. Par exemple, les LCs, qui possèdent un grand potentiel de stimulation des lymphocytes T *in vitro*, ne présentent pas directement l'antigène aux lymphocytes T. Une fois migrées vers les ganglions, elles transfèrent les antigènes aux DCs résidentes (84). Récemment, un groupe a rapporté que les dDCs CD103<sup>+</sup> de la peau représentent la population majeure capable de présentation croisée des antigènes viraux et des antigènes de soi (28). Par contre, dans le poumon, ce sont des DCs CD103<sup>-</sup> qui présentent de façon prolongée les antigènes aux cellules T CD8<sup>+</sup> via la présentation croisée (85).

### 3. La polarisation Th1, Th2 et Th17

Une fois arrivées aux ganglions, les DCs présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs, et induisent leur différenciation en lymphocytes T effecteurs auxiliaires (helper :Th) dans le cas des  $CD4^+$ , et en lymphocytes effecteurs cytotoxiques (CTL) pour les cellules  $CD8^+$ . Pour que les cellules T effectrices se développent efficacement, elles doivent recevoir trois signaux (86). Le premier signal provient de l'interaction du TCR qui reconnaît l'antigène présenté par le CMH, le deuxième signal, des molécules co-stimulatrices et le dernier, des cytokines sécrétées par des DCs ou des cellules du système inné. Les trois populations de Th les plus étudiées sont les Th1, Th2 et Th17 pour les cellules  $CD4^+$  et les CTL pour les cellules  $CD8^+$  (87). Ces cellules sont caractérisées par leur fonction et le profil de cytokines qu'elles sécrètent dépendamment des conditions dans lesquelles les DCs ont été activées. La fonction primaire des Th1 est d'éliminer les parasites intracellulaires envahissants. Les Th2 servent à se débarrasser des microbes extracellulaires en stimulant la réponse des lymphocytes B conduisant la production d'IgE. Quant aux Th17, ils jouent un rôle dans le combat contre les infections fongiques.

**Les effecteurs Th1 (T helper 1) :** Ces effecteurs sont caractérisés par leur sécrétion de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , la lymphotoxine- $\alpha$  et l'IL-2. Très tôt dans la réponse immunitaire innée, suite à l'activation par l'engagement des TLRs, les DCs sécrètent l'IL-12, composée de deux sous unités p40 et p35, qui est la cytokine clef permettant la génération des Th1 (87, 88). Les TLRs ne sont pas tous égaux pour induire la production d'IL-12 et peuvent agir en synergie. Par exemple, le TLR1

combiné avec le TLR2 induit une faible quantité d'IL-12. En revanche, la combinaison, des agonistes TLR3 et TLR4, induit des quantités massives d'IL-12. Quant aux TLR7 et TLR9, exprimés également sur les pDCs, leur stimulation provoque la production d'une énorme quantité d'IFN- $\alpha$  qui, en synergie avec les autres TLRs, augmente davantage la production d'IL-12 par les cDCs. En effet, le groupe TLR7/8/9 agit en synergie avec le TLR3 ou TLR4 pour maximaliser la production d'IL-12 (89). L'IL-12 sécrétée active et recrute les cellules NK et les cellules effectrices produisant une grande quantité d'IFN- $\gamma$  qui remplace le besoin en IFN- $\alpha$ . De plus, l'engagement de CD40 sur la DC par le CD40L exprimé sur les cellules T activées amplifie l'activation des DCs et leur sécrétion de cytokines. Finalement, au cours de la réponse adaptative, les lymphocytes CD4<sup>+</sup> effecteurs sécrètent une quantité appréciable d'IFN- $\gamma$  qui sert de cytokine autocrine pour stabiliser davantage la production IFN- $\gamma$  et amplifie la production de l'IL-12 par des DCs (89). Ce ne sont pas toutes les réponses de type Th1 qui sont dépendantes de l'IL-12. Les DCs peuvent exprimer le DDL (Delta-Like) 1 ou 4 qui se lie à Notch3 sur les cellules T (88). Cette interaction seule peut induire la différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> en Th1.

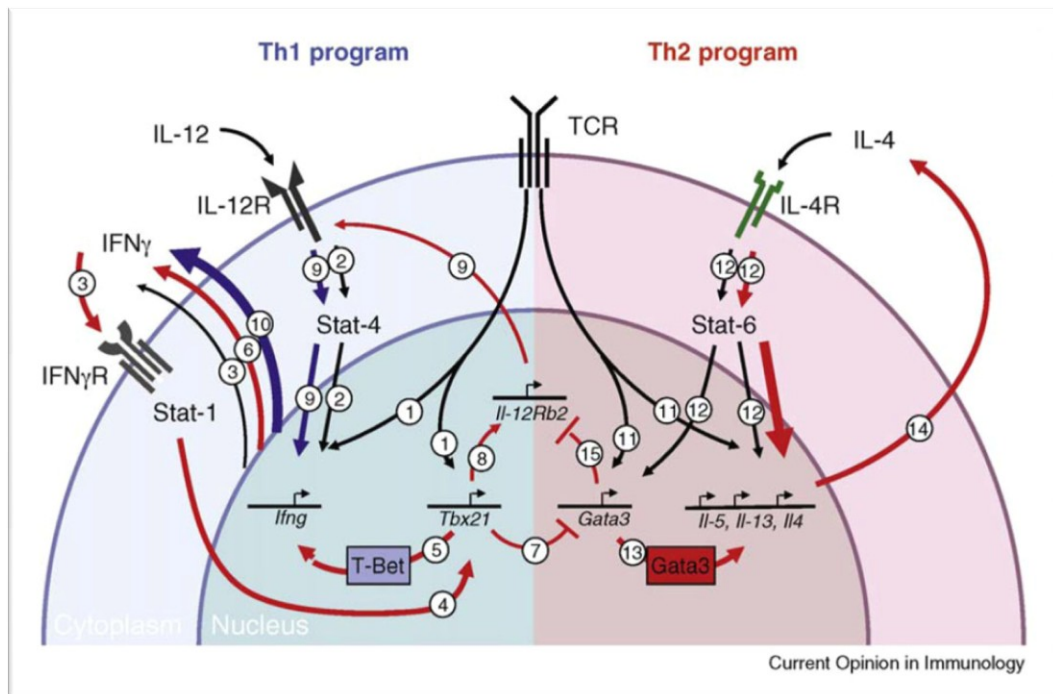
L'engagement du TCR des cellules CD4<sup>+</sup> déclenche la transcription des gènes *ifng* et *Tbx21*. Ce dernier code pour le facteur de transcription T-bet qui déclenche la différenciation en Th1. L'engagement de Notch peut également induire la synthèse de T-bet directement. Le T-bet augmente la transcription d'*ifng* et d'*il-12rb2* engageant ainsi les cellules CD4<sup>+</sup> à produire d'IFN- $\gamma$  et à exprimer l'IL-12R. Ensuite, l'IL-12 produite par les DCs interagit avec l'IL-12R, active le STAT4, en

collaboration avec T-bet et augmente davantage la transcription d'*ifng*. L'IFN- $\gamma$  sécrété sert de cytokine auto/paracrine en se liant au récepteur de l'IFN- $\gamma$  : il active le STAT1 amplifiant ainsi la synthèse de T-bet. De plus, le T-bet prévient la différenciation des Th2 par l'inhibition de Gata3, le facteur de transcription central pour les cellules Th2. Une autre cytokine, l'IL-18, en combinaison avec l'IL-12, peut induire la production d'IFN- $\gamma$  en absence d'engagement du TCR (88).

**Les effecteurs Th2 (T helper 2) :** Ces effecteurs sont caractérisés par leur sécrétion de cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. L'IL-4 est le facteur de différenciation pour les Th2. L'engagement de Notch 1 et 2 par Jagged 1 et 2, exprimé sur les DCs suite à une activation via les produits microbiens favorise la polarisation des cellules CD4<sup>+</sup> vers le Th2 (88, 90). D'autres auteurs ont rapporté que le récepteur de TSLP et l'OX40 joueraient un rôle déterminant dans l'induction de cellules Th2 (91).

L'engagement du TCR active le facteur de transcription Gata3 pour initier très faiblement la transcription des gènes de type Th2 comme l'*il-4*, l'*il-5* et l'*il-13*. L'IL-4 produit en synergie avec celle sécrétée par les cellules pro-Th2 (les lymphocytes T mémoires et les cellules de l'immunité innée) et se lie à l'IL-4R, qui est constutivement exprimé sur les T, activant ainsi le STAT6 qui à son tour augmente la transcription des gènes de type Th2 (87, 88). De plus, le Gata3 inhibe l'expression du gène d'*il-12rb2* et STAT4, empêchant ainsi la différenciation des Th1.

**Figure 8: La différenciation de Th1 et Th2**



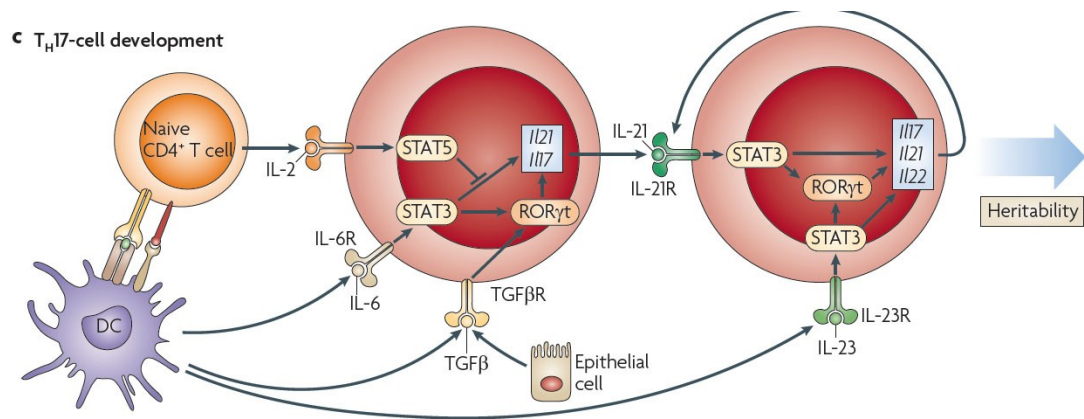
Derk Amsen, Current Opinion in Immunology 2009

**Les effecteurs Th17 (T helper 17) :** Les effecteurs Th17 sont caractérisés par leur sécrétion d'IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 et TNF- $\alpha$ . Normalement, l'IL-17 est importante dans le combat contre les pathogènes extracellulaires tels que le *Klebsiella pneumoniae*, le *Bacteroides fragilis* ou le *Candida albicans*. Son mode d'action consiste à recruter les cellules du système immunitaire inné, comme les neutrophiles. L'IL-17 est également impliquée dans le maintien de l'intégrité des cellules épithéliales de l'intestin.

Les cellules Th17 et les cellules régulatrices (Tregs) partagent certains points en commun. Le TGF- $\beta$  exogène inhibe le développement des Th1 et Th2 et induit la

différenciation des Tregs et des Th17 en promouvant l'expression de Foxp3 (fork head box P3) et RoR $\gamma$ t (retinoic-acid-receptor-related orphan receptor- $\gamma$ t) qui sont les facteurs de transcription clef de leur différenciation respective. La présence d'IL-6 inhibe l'expression de Foxp3, donc la différenciation des Tregs, et favorise l'expression de STAT3 qui interagit avec le RoR $\gamma$ t. Ceci leur permet de produire l'IL-21 et l'IL-17 et d'exprimer le récepteur d'IL-23 (IL-23R) qui les rend sensible à l'IL-23 produite par les DCs. L'IL-21 produite, en combinaison avec l'IL-23, active le STAT3 et stabilise la lignée Th17.

**Figure 9: La différenciation Th17**



Wilson, C. B., E. Rowell, Nature Review 2009

#### 4. Des lymphocytes T régulateurs

Notre système immunitaire est une arme redoutable capable d'anéantir tous les envahisseurs potentiels. Il est donc primordial de garder cette arme sous haute surveillance pour qu'elle ne se retourne pas contre nous-mêmes. Dans les cas où le contrôle est défaillant, nous développons des maladies auto-immunes délétères menant parfois à la mort. Cette surveillance étroite exerçant une activité suppressive est dirigée par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (Tregs) qui peuvent également tempérer l'inflammation lors d'une infection, empêchant ainsi les dommages collatéraux. Il existe deux types de Tregs : naturels (nTregs) et induits (iTregs). Le premier est formé naturellement dans le thymus où la tolérance centrale est induite; le deuxième est généré en périphérie suite aux différentes stimulations du système immunitaire. Ce dernier processus est appelé tolérance périphérique. Pour le moment, il n'y a pas de marqueur spécifique pour chaque type de Tregs. Par contre, ils expriment le CD4<sup>+</sup>, le facteur de transcription Foxp3 et pour la plupart, le CD25. Bien que le mécanisme de différenciation de ces deux types de Tregs soit distinct, il reste à clarifier si leur fonction physiologique respective est différente ou redondante. Leur propriété fonctionnelle s'exerce dans l'ensemble de l'organisme, aussi bien dans les organes lymphoïdes que non-lymphoïdes, dans des conditions basales et inflammatoires. Le marqueur spécifique Foxp3 joue un rôle critique dans la fonction et le développement des Tregs. Une mutation dans le gène *foxp3* chez l'humain entraîne un dysfonctionnement du système immunitaire, une polyendocrinopathie, une entéropathie appelée « l'IPEX (X-linked) syndrome ». Les patients atteints de



l'IPEX souffrent d'entéropathie immunitaire, de diabète, de thyroïdites, d'anémie hémolytique, de thrombocytopénie, d'allergie alimentaire et de dermatite (92-94). Cette pathologie de la peau peut se manifester sous forme de psoriasis ou de dermatite atopique avec une augmentation de production d'IgE. La défaillance fonctionnelle des Tregs a également été rapportée chez les patients atteints de sclérose en plaques (SP) ou de lupus érythémateux disséminé systémique (LED)(94). La souris « scurfy » ayant les mutations équivalentes à celles des patients IPEX a permis de comprendre l'importance du Foxp3 dans les maladies auto-immunes. En effet, les symptômes de ces souris ressemblent énormément à ceux des patients IPEX. Il suffit de transférer les cellules  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  aux souris « scurfy » pour empêcher l'apparition de la plupart des symptômes et éviter la mort. De plus, les Tregs ne contrôlent pas uniquement les maladies auto-immunes; ils sont également impliqués dans des allergies, le rejet de greffes, l'immunité anti-tumorale et la réponse aux microbes (95). La formation de Tregs est étroitement liée à celle des DCs. Dans le thymus, les Tregs sont partiellement dépendants de la présence de DCs, tandis qu'en périphérie, ils sont sous le contrôle total des DCs. Dans ce chapitre, nous explorerons les circonstances dans lesquelles les Tregs sont engendrés en relation avec les DCs, ainsi que leurs mécanismes de suppression.

#### **4.1. Les lymphocytes T régulateurs naturels**

La tolérance centrale s'opère dans le thymus par un processus de sélection négative visant à éliminer des cellules  $CD4^+$  autoréactives. Pour être efficaces, tous

les antigènes du soi, incluant les TSA (tissue-specific antigens), doivent être présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (APC). Cette présentation antigénique s'effectue par le biais des mTECs (medullary thymic epithelial cells) sous l'influence du facteur de transcription AIRE. Ces cellules se localisent dans la région médullaire où la sélection négative prend place. Les DCs  $CD8^+ Sirp-\alpha^-$ , qui expriment également une faible quantité d'AIRE, exercent la même fonction que les mTECs dans la zone médullaire (29, 96). D'autres DCs, comme les  $CD8^- Sirp-\alpha^+$ , captent les antigènes circulants du sang et migrent au thymus pour les présenter aux cellules  $CD4^+$  (97). Certaines études proposent que les DCs migratoires provenant des organes périphériques jouent un rôle dans la sélection négative (70, 98, 99). En effet, l'injection par la voie i.v. d'iDCs chargées de peptide de l'OVA permet d'éliminer les cellules  $CD4^+$  ayant des TCRs spécifiques à l'OVA (70). Dans des modèles d'EAE, les DCs thymiques non-fractionnées (et non-spléniques), chargées de peptides et injectées par la voie i.v., migrent vers le thymus où elles inactivent les lymphocytes T auto-réactifs circulant dans le système. La prévention de la maladie est impossible lorsque la thymectomie est réalisée avant l'administration de DCs thymique (100). Cette expérience démontre que les DCs injectées migrent vers le thymus où elles induisent la tolérance.

Suite à une efficacité incomplète du mécanisme de la sélection négative, quelques cellules autoréactives s'échappent du thymus dotées d'un potentiel d'induction de maladies auto-immunes. Pour remédier à cette situation, le thymus génère donc les cellules T régulatrices naturelles (nTregs) capables de supprimer l'inflammation et l'auto-immunité indésirables en périphérie. Le développement des

nTregs survient peu après la naissance (101), ce qui explique pourquoi la thymectomie néonatale entre 2-4 jours entraîne des désordres autoimmuns sévères chez les souris (95).

La contribution respective des mTECs et des DCs dans l'induction des nTregs n'est pas encore totalement élucidée. Des études ont montré que seules les mTECs étaient suffisantes pour induire les nTregs, tandis que d'autres rapportent une contribution des DCs. Dans une expérience avec des souris chimériques (générées par un transfert de la moelle osseuse CMH-II<sup>-/-</sup> dans une souris irradiée) le nombre de nTreg baisse de 30% (98). Cette simple expérience prouve, si minime qu'elle soit, la contribution des DCs, dans la génération des nTregs au niveau du thymus. Les différentes sous-populations de DCs telles que les pDCs, les DCs CD8<sup>-</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>-</sup> n'ont pas toutes la même origine et ne sont pas toutes égales dans leur aptitude à induire la tolérance. La sélection négative exercée par des pDCs n'a pas été décrite dans la littérature. Par contre, Li et al. suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans l'induction des nTregs (102). Proietto et al. proposent que les DCs CD8<sup>-</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> captent les antigènes de soi dans des organes périphériques et migrent vers le thymus où elles induisent les nTregs (99).

Les DCs et les mTECs induisent des nTregs par la présentation des peptides de soi via le CMH de classe II. Que l'expression de Foxp3 dépende de la signalisation du TCR n'est donc pas une surprise. De plus, l'affinité du TCR pour un peptide du soi des nTregs se situe entre celle de cellules T générées lors de la sélection positive et celle des cellules T issues de la sélection négative. Une fenêtre étroite dans laquelle l'intensité de la signalisation du TCR génère l'expression de

Foxp3 et permet le développement des nTregs (103, 104). En absence de Foxp3, ces « nTregs » peuvent être activées, causant les maladies auto-immunes (105). Cette conclusion est basée sur le fait que le répertoire du TCR des nTregs chez les souris qui présentent une expression normale de Foxp3 est identique à celui des cellules effectrices autoréactives chez les souris déficientes pour l'expression Foxp3 et que les souris qui ont été développées dans un fond génétique déficient pour l'expression de RAG ne peuvent générer de nTregs puisque la recombinaison du TCR est défailante (104).

En plus du TCR, la molécule costimulatrice CD28 joue un rôle intrinsèque dans le développement des nTregs, car les souris déficientes pour la molécule CD28 ou CD80/86 ont vu leur nombre de nTregs diminué (106). De même, la capacité de CD28 à promouvoir le développement des nTregs passe par le domaine intracytoplasmique liant Lck, suggérant de nouveau une coordination entre le TCR et le CD28 pour générer des nTregs (106). Dans la même ligne de pensée, tous les facteurs de transcription tels que le NFAT, le NF- $\kappa$ B, et l'AP-1, dérivant de la voie de signalisation du TCR et du CD28 sont impliqués dans la formation des nTregs.

Le troisième signal nécessaire au développement des nTregs provient des cytokines. Les nTregs expriment de grandes quantités de chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) qui, pendant longtemps, ont été considéré comme le marqueur spécifique des nTregs. En effet, chez les souris déficientes pour l'expression de CD25, le nombre de nTregs est diminué de moitié (107). D'autres récepteurs de cytokines, comme l'IL-7R et l'IL-15R, qui partagent la même chaîne gamma que l'IL-2R, ont également une influence sur la génération des nTregs, mais leur contribution est

minime comparée à celle de l'IL-2R $\alpha$ . La mutation de la chaîne commune gamma aux IL-2R, IL-7R et IL-15R entraîne une disparition des cellules Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus et en périphérie. Les mêmes résultats sont obtenus avec des souris déficientes en IL-2, IL-7 et IL-15 (108). Les études faites par Lio and Hsieh proposent que la formation des nTregs se déroule en deux étapes (109). Le signal du TCR permet d'augmenter l'expression du récepteur à l'IL-2, ce qui accroît sa réponse à la cytokine IL-2. Le facteur de transcription STAT5, activé par la voie de signalisation de l'IL-2 ou par la chaîne  $\gamma$ , est responsable de la régulation de Foxp3 (110). L'ablation de STAT5 entraîne une réduction de nTregs, et l'expression constitutive de STAT5 rétablit les nTregs dans des souris déficientes pour la molécule CD25 (111). Des expériences complémentaires indiquent qu'une expression constitutive de Bcl-2, une molécule antiapoptotique, rétablit les nTregs des souris déficientes pour l'expression de la molécule STAT5 (104). Le STAT5 n'est donc pas requis pour l'expression de Foxp3. Les mécanismes impliquant ces facteurs de transcriptions ne sont pas bien établis. D'autres études seront nécessaires pour élucider la question. Contrairement à son rôle dans l'induction de Tregs en périphérie, le TGF- $\beta$ 1 n'est pas un facteur déterminant pour la formation de nTregs. L'absence de TGF- $\beta$ 1 pourrait être remplacée par l'IL-2. En effet, l'ablation conditionnelle de TGF- $\beta$ 1 diminue le nombre de nTregs, mais seulement 3 à 4 jours après la naissance. Par la suite, le nombre de nTregs revient à la normale (112), secouru par l'IL-2.

## 4.2. Les lymphocytes T régulateurs induits

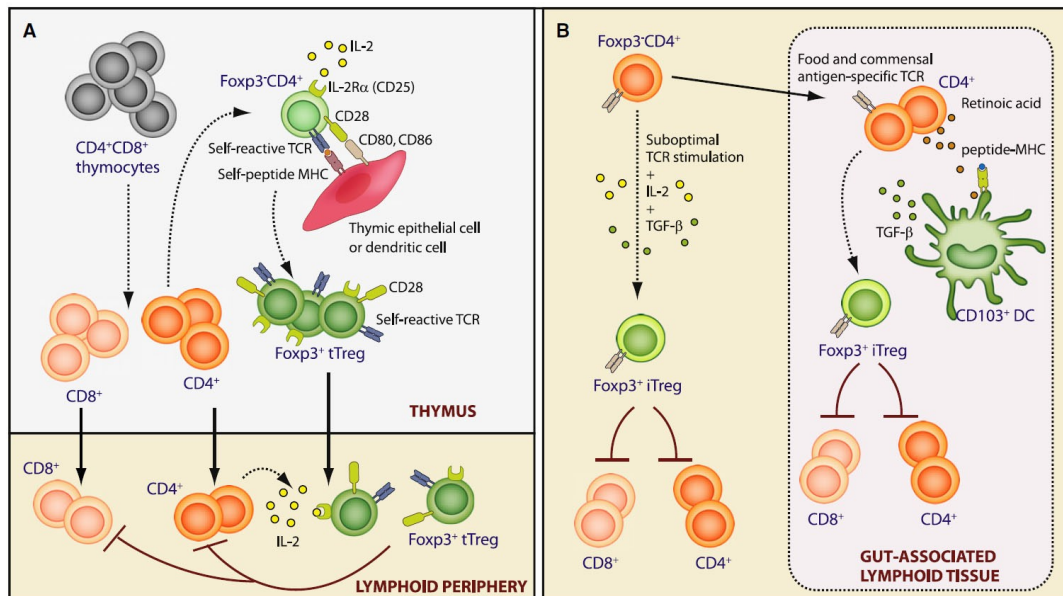
Tel que mentionné, malgré le système sophistiqué et contrôlé de la sélection négative dans le thymus, quelques cellules autoréactives  $CD4^+Foxp3^-$  s'en échappent. L'évolution de notre espèce a fait en sorte que nous développons en plus de la production thymique de nTregs un deuxième point de contrôle pour inhiber ces cellules autoréactives : induction de Tregs en périphérie (iTregs). Ce système de contrôle ressemble beaucoup à celui du thymus dans lequel les DCs immatures (iDCs) présentent l'antigène du soi aux cellules  $CD4^+$  autoréactives via l'interaction du CMH-II et du TCR. Dans ces conditions, les cellules  $CD4^+$  avortent leur processus de prolifération, deviennent anergiques, et meurent par apoptose. Fait intéressant : les conditions préalables pour le développement périphérique d'iTregs  $CD4^+Foxp3^+$  à partir des lymphocytes T naïfs  $CD4^+Foxp3^-$  sont différentes de celles dans le thymus. Quoique l'engagement du TCR reste indispensable dans les deux conditions, la signalisation de CTLA-4 non requise dans le thymus semble indispensable pour l'induction périphérique de Tregs (113). Contrairement à son effet sur les nTregs, l'engagement de CD28 inhibe l'expression de Foxp3 sur les iTregs ainsi que l'activation de NF-kB associée. L'administration de l'anticorps anti-CD3 à une souche de souris pro-diabétiques « NOD » déficientes pour l'expression de CD28 induit des iTregs qui protègent ces souris contre le diabète (114, 115). Finalement, le TGF- $\beta$ 1 est responsable de la plupart, si ce n'est de l'ensemble, des phénomènes de conversion des cellules T naïves en iTregs en périphérie. (104). L'IL-2 agit en synergie avec TGF- $\beta$ 1 pour maintenir l'expression de Foxp3. L'action du TGF- $\beta$ 1 peut être contrée par des cytokines proinflammatoires ou de fortes

stimulations par des molécules co-stimulatrices (CD28) (104). Par exemple, le TGF- $\beta$  en combinaison avec l'IL-6 promouvoit le développement de Th17.

IL existe une autre population de Tregs induites en dehors du thymus, les Tregs de type 1 (Tr1) qui sécrètent l'IL-10, le TGF- $\beta$  et l'IFN- $\gamma$  dépendamment des conditions expérimentales. Ces cellules peuvent être différenciées *in vitro* à partir des CD4<sup>+</sup> naïfs en engageant répétitivement le TCR en présence d'IL-10 exogène (116). Dans un système de coculture, les Tr1 sont induites par des iDCs ou des DCs qui ont été stimulées en présence d'IL-10. L'activation des CD4<sup>+</sup> en présence de vitamine D3 et de dexaméthasone peut également induire des Tr1 (117, 118). De plus, d'autres chercheurs ont rapporté que l'IFN- $\alpha$  et l'engagement de CD2 ou CD46 sont impliqués dans le développement de Tregs sécrétant de l'IL-10 (119). L'IL-10 est une cytokine homodimérique qui présente de vastes propriétés anti-inflammatoires. Elle peut être produite par la plupart des cellules hématopoïétiques et quelques cellules non-hématopoïétiques et agit sur les lymphocytes et les cellules myéloïdes. Malgré ses propriétés anti-inflammatoires dominantes, elle peut augmenter l'activité cytotoxique des CD8<sup>+</sup> et la sécrétion d'IgA par des cellules B (119). Elle semble également être impliquée dans la pathogenèse du lupus érythémateux. Habituellement, les Tregs sécrétant de l'IL-10 se trouvent dans les muqueuses intestinales où elles suppriment une variété de réponse immunitaire suite à des rencontres avec différents antigènes provenant des bactéries commensales (120). La particularité des Tr1 est qu'ils n'expriment pas constitutivement de Foxp3 (118). Beaucoup de cliniciens se sont intéressés aux Tr1 en raison de la facilité à les générer en grande quantité et du fait de leur spécificité antigénique *in vitro* et *in vivo*. Les

souris déficientes pour la production d'IL-10 ne développent pas de maladie auto-immune sévère comme des souris « scurfy », mais développent spontanément une colite. D'autre part, l'injection de Tr1 peut prévenir le développement de colite expérimentale ou d'encéphalite. L'administration *in vivo* de rapamycine et d'IL-10 à des souris diabétiques, qui ont reçu un greffon d'îlots pancréatiques allogéniques, prévient non seulement le rejet aigu, mais établit aussi un état de tolérance à long terme. Malheureusement, dans ce modèle, seule l'injection d'IL-10 n'est pas suffisante pour générer une tolérance à long terme malgré la formation de Tr1. L'ajout de rapamycine permettant d'inhiber la production d'IL-2 par les effecteurs sans empêcher la production l'IL-10 est donc indispensable (121). Les Th3 sont un autre type de Tregs très peu documenté. Ils secrètent de fortes quantités de TGF- $\beta$  et sont induits par la voie orale (122).

**Figure 10: La différenciation des Tregs**



A) Les nTregs sont formées dans les thymus suites aux interactions avec les cellules épithéliales thymiques ou les DCs. B) Les iTregs sont générées en périphérie en



présence des DCs et sous l'influence de TGF- $\beta$ . Josefowicz and Rudensky, *Immunity* 2009.

### 4.3. L'induction des Tregs par des DCs

Plusieurs méthodes ont été développées pour induire l'expansion des Tregs Foxp3<sup>+</sup> (nTregs et iTregs) *in vivo* chez les souris. Elles incluent l'utilisation de DCs immatures (123) et l'administration d'antigènes par la voie orale (124).

Les DCs induisent la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en iTregs *in vitro* et *in vivo*. En effet, les cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> des souris DO11.10 naïves sur fond génétique RAG<sup>-/-</sup> peuvent convertir en cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> lors de leur mise en culture avec des DCs en présence de peptides OVA et de TGF- $\beta$ . Dans ce système, les DCs étaient 100 fois plus efficaces que des APC CD11c<sup>-</sup> à induire des iTregs. L'IL-2 endogène produite par les cellules CD4<sup>+</sup> était suffisante et sa production était dépendante de l'expression des molécules CD80/86 (125). Dans un modèle dans lequel les DCs contribuent à la tolérance orale, certaines sous-populations de DCs telles que les DCs CD103<sup>+</sup> des ganglions mésentériques ou de la lamina propria peuvent induire les iTregs en absence de TGF- $\beta$  exogène (125). En effet, les DCs CD103<sup>+</sup> utilisent le TGF- $\beta$  endogène en tandem avec l'acide rétinoïde (RA), un métabolite de la vitamine A, pour induire des iTregs qui expriment elles-mêmes le CD103 (14, 15). Ce métabolite peut inhiber le développement de cellules Th17 qui nécessitent aussi le TGF- $\beta$  (126). Le RA bloque également la transcription d'*il10*, une caractéristique des Tregs de type 1 (Tr1) (127), ce qui démontre une compétition potentielle entre ces deux lignées de Tregs.

À l'état de base, les iDCs captent les antigènes de soi, migrent vers les organes lymphoïdes et induisent la différenciation des iTregs. Comment vérifier cette hypothèse *in vivo* sans directement manipuler des DCs? Le groupe de Steinman a utilisé deux anticorps particuliers ciblant directement des récepteurs endocytiques capables de déclencher la phagocytose. Ces anticorps peuvent être couplés à n'importe quel antigène donné. Une fois que la phagocytose a lieu, le complexe anticorps-antigène est dégradé et l'antigène est présenté via le CMH en absence totale d'un signal de danger. Ces conditions assurent le maintien de l'immaturation des DCs lors de la présentation d'antigène aux cellules T. Les deux récepteurs visés sont le DEC205<sup>+</sup> qui est exprimé sur les DCs CD8<sup>+</sup>, et le DCIR-2, qui se trouvent sur les DCs CD8<sup>-</sup>. Des expériences de cocultures *in vitro* démontrent que les deux populations de DCs sont capables d'induire les iTregs. Les DCs CD8<sup>+</sup> DEC205<sup>+</sup> sécrètent du TGF- $\beta$  en quantité suffisante pour induire des iTregs, tandis que les DCs CD8<sup>-</sup> DCIR-2<sup>+</sup> ont besoin de TGF- $\beta$  exogène (128). Cette expérience a été confirmée par Wang et al. qui ont montré que la molécule co-inhibitrice, le PD-L1 (programmed death 1 ligand) et non le PD-L2, exprimé sur les DCs CD8<sup>+</sup>, est essentielle à cette conversion (129). Les DCs CD8<sup>+</sup> DEC205<sup>+</sup> sécrètent le TGF- $\beta$  sous la forme latente. Cette cytokine sera par la suite activée par l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 8 à la surface des DCs (130). Lorsqu'elles reçoivent un signal de maturation par le TLR3, les DCs CD8<sup>+</sup> diminuent la production de TGF- $\beta$ , de sorte qu'elles perdent également la capacité à induire les iTregs (128). Les DCs CD8<sup>+</sup> sont supérieures aux DCs CD8<sup>-</sup> pour induire des iTregs *in vivo*; En revanche, les DCs CD8<sup>-</sup> sont meilleures à promouvoir la prolifération des nTregs.

Les pDCs ont des propriétés tolérogéniques dans différents modèles. Par exemple, Ochando et al. montrent que les pDCs sont des cellules présentatrices d'allo-antigènes essentielles à la tolérance lors d'allogreffe cardiaque. Dans ce processus, les pDCs captent l'antigène, migrent vers le ganglion via le sang et induisent les cellules  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ . L'ablation des pDCs ou l'inhibition de leur accès aux ganglions s'oppose à l'induction de la tolérance. Vice versa, le transfert adoptif des pDC prolonge la survie du greffon (131). Hadeiba et al. apportent une précision supplémentaire en montrant que ce sont des pDCs  $CCR9^+$  qui induisent les régulateurs  $Foxp3^+$  *in vitro* et *in vivo*, supprimant ainsi la GVHD (graft-versus-host disease) (132). Les mêmes résultats ont été obtenus dans un modèle d'asthme expérimental chez la souris. L'ablation des pDCs par des anticorps spécifiques (120G8) augmente l'inflammation de type Th2 et la reconstitution des pDCs prévient la maladie. Dans un modèle de tolérance orale, les pDCs captent l'antigène que la souris a reçu par le gavage, migrent vers le foie où elles éliminent les cellules  $CD4^+$  et les cellules  $CD8^+$  spécifiques de l'antigène (133). Les pDCs provenant des ganglions qui drainent les tumeurs activent des Tregs à travers la voie d'IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) (134).

#### **4.4. Les mécanismes de suppression**

Pour exercer leur fonction suppressive, les Tregs doivent être activées via leur TCR, donc de manière spécifique à un antigène. Par contre, elles inhibent l'inflammation de façon non-spécifique à l'antigène. Les Tregs peuvent supprimer la réponse inflammatoire des effecteurs par des voies directes ou indirectes. Ces voies comprennent la suppression par le contact cellulaire, la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité.

##### **4.4.1. La suppression par le contact cellulaire**

Plusieurs efforts ont été déployés pour décortiquer le mécanisme de suppression des Tregs *in vitro* et *in vivo*. Les Tregs suppriment la prolifération et la sécrétion des cytokines des cellules effectrices suite à une activation par le TCR (95). *In vitro*, la suppression est abolie lorsque ces deux types de cellules sont séparés par une membrane semi-perméable, ce qui démontre que la suppression nécessite un contact cellulaire (135). Plusieurs molécules sont impliquées dans la suppression des effecteurs. De nombreux résultats expérimentaux montrent que le CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4) joue un rôle clé dans la suppression immunologique *in vivo* et *in vitro*. Cette molécule est exprimée constitutivement par les Tregs et augmente lors de l'activation. L'inactivation de l'expression du gène *ctla-4* spécifiquement dans les Tregs entraîne une lympho-prolifération systémique et une maladie auto-immune médiée par les cellules T, similaires à celles observées chez une souris déficiente en Tregs (95, 136). Curieusement, l'activité suppressive

des Tregs isolées à partir des souris CTLA-4<sup>-/-</sup> reste intacte *in vitro*. Or, l'abolition des activités suppressives des Tregs déficientes pour la molécule CTLA-4 a lieu seulement quand l'APC est ajoutée dans la culture. En effet, en utilisant la technique de microscope intravital, Tadokoro et Tang ont observé que les Tregs interagissent directement avec des DCs (137, 138). Plusieurs hypothèses ont été proposées. Lors de l'engagement du CTLA-4 par les molécules CD80/86 exprimées par des DCs, ces dernières produisent l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) qui induit la fabrication d'un métabolite pro-apoptotique provenant du catabolisme de tryptophane, qui exerce une activité suppressive sur les T effecteurs. Administrer le 1-MT (1-méthyltryptophane), un inhibiteur pharmacologique d'IDO, à une souris enceinte entraîne le rejet du fœtus allogénique. Dans un modèle de maladie auto-immune telle que l'EAE, les souris traitées au 1-MT développent des symptômes très sévères (139). Les mêmes résultats ont été obtenus dans le modèle de colite. Fallarino et al. ont relevé qu'en présence de catabolite de tryptophane, on peut générer *de novo* à long terme des Tregs (140). Le CTLA-4 sur les Tregs peut lier directement la molécule B7 sur les effecteurs et donner un signal négatif (141). D'autres études confirment que le CTLA-4 réduit la capacité des APC à activer les lymphocytes naïfs en diminuant leur expression de CD80/86 (142) et par conséquent la fonction et la maturation des DCs (143).

La LAG3 (Lymphocyte activation gene 3) est un homologue du CD4 qui se lie au CMH-II avec une très grande affinité. L'engagement de LAG3 au CMH-II exprimé sur les iDCs induit un signal inhibiteur qui supprime la maturation et la fonction immunogénique des DCs (135, 143, 144).

#### 4.4.2. La suppression par les cytokines

Malgré que les Tregs nécessitent un contact cellulaire *in vitro* pour exercer leur activité suppressive, plusieurs études démontrent que les cytokines telles que l'IL-10 et TGF- $\beta$  semblent jouer un rôle essentiel *in vivo*. Par une approche expérimentale classique où l'injection des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup> prévient la colite causée par l'administration de la CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>hi</sup> dans une souris déficiente pour la molécule RAG, les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup> isolées des souris déficientes pour la molécule d'IL-10 ne préviennent pas le développement de la maladie (145). De même, le rejet de greffon est accéléré lorsque un anticorps anti-IL-10 est administré (146). Il est clair que les Tregs Foxp3<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-10 dans la lamina propria et dans le système nerveux central (SNC) contrôlent la colite et l'EAE respectivement (147, 148). Le rôle de l'IL-10 est également testé dans le modèle d'asthme expérimental. Une fois stimulée par des allergènes, la souris est protégée de la maladie si elle avait reçu, des Tregs Foxp3<sup>+</sup>. L'effet est réversible en injectant un anticorps neutralisant anti-IL-10 (149), ce qui concorde avec la nouvelle étude montrant que l'ablation spécifique d'IL-10 par des Tregs entraîne une augmentation de l'inflammation et de l'hyperréactivité bronchique (150).

Le TGF- $\beta$  supprime la prolifération des lymphocytes T en inhibant l'IL-2. Il peut également supprimer la différenciation et la fonction des lymphocytes Th1 et Th2. Des études ont montré que l'expression de GATA3 et de Tbet est inhibée par le TGF- $\beta$ . Cette cytokine est essentielle pour maintenir l'expression de Foxp3 et la

fonction suppressive (120). Le TGF- $\beta$  existe sous deux formes : une forme sécrétée et une forme membranaire. La forme membranaire pourrait être responsable de la suppression par contact cellulaire décrite dans différents modèles. Le rôle du TGF- $\beta$  dans l'induction et le maintien des Tregs est bien établi. En revanche, l'activité suppressive du TGF- $\beta$  sécrété par les Tregs est encore un sujet controversé. Certaines études antérieures ont affirmé que le TGF- $\beta$  sécrété par les Tregs ne jouerait pas un rôle majeur dans la suppression des effecteurs (151), tandis que d'autres démontrent son rôle crucial dans le contrôle de la maladie auto-immune (152, 153). Dans un modèle de colite, les Tregs TGF- $\beta^{-/-}$  ou TGF- $\beta R^{-/-}$  ne suppriment la maladie que si les effecteurs expriment un récepteur du TGF- $\beta$  intact (154). De plus, l'injection d'anticrops anti-TGF- $\beta$  abolit cette protection, ce qui suggère que le TGF- $\beta$  est essentiel dans la prévention de la colite, mais que le TGF- $\beta$  provient d'une autre source que des Tregs (154). Curieusement, le groupe de Flavell a rapporté le contraire en indiquant que le TGF- $\beta$  produit par les Tregs est crucial dans le contrôle de la colite et de l'EAE (155). La différence de résultats obtenue entre ces deux études n'a pas encore été élucidée, mais l'explication pourrait provenir d'une différence de flore intestinale entre les souris utilisées par les deux groupes d'investigateurs (144).

Récemment, une nouvelle cytokine suppressive, l'IL-35, a été décrite comme étant exprimée préférentiellement par les Tregs et requise pour leur activité suppressive optimale (156). L'IL-35 est un nouveau membre de la famille de l'IL12, puisqu'elle est composée d'Ebi3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3) et d'IL-12p35, la chaîne commune à l'IL-12p70 (IL-12p35+p40). Les Tregs déficientes pour la

production d'IL-35 ont une activité suppressive diminuée *in vitro*, et sont incapables de contrôler la prolifération homéostatique des effecteurs et de prévenir la colite.

#### 4.4.3. La suppression par la cytolyse

Chez la souris, le granzyme B et la perforine agissent en concert pour induire l'apoptose de la cellule cible. Tout d'abord, la perforine, un composant cytolytique granulaire, perméabilise la membrane cytoplasmique. Par la suite, granzyme B pénètre dans la cellule par les pores créés par la perforine, et active les caspases intracellulaires entraînant ainsi l'apoptose de la cellule effectrice (143). Gondek et al. ont été les premiers à rapporter que des Tregs déficientes pour le granzyme B ont une activité suppressive diminuée et que la suppression des effecteurs est indépendante de la perforine (157), alors que la suppression des cellules B, NK, CTL dépend de l'expression de la perforine (158, 159). Plus récemment, les études suggèrent que les Tregs activées induisent l'apoptose des effecteurs par l'intermédiaire des TRAIL-D5 (tumeur-necrosis-factor-related Apoptosis-inducing ligand–death receptor 5) et de galectine-1 (160, 161). L'engagement de TRAIL déclenche un changement conformationnel dans le domaine intracellulaire entraînant le recrutement de FADD (Fas-associated protein with death domain) qui se traduit par la mort cellulaire (162). La survie du greffon de la peau induite par des Tregs est abolie par l'administration de l'anticorps l'anti-TRAIL. Quant à la galectine-1, elle est exprimée préférentiellement par des Tregs et son expression augmente suite à l'engagement du TCR. La galectine-1 est sécrétée et se lie à plusieurs glycoprotéines

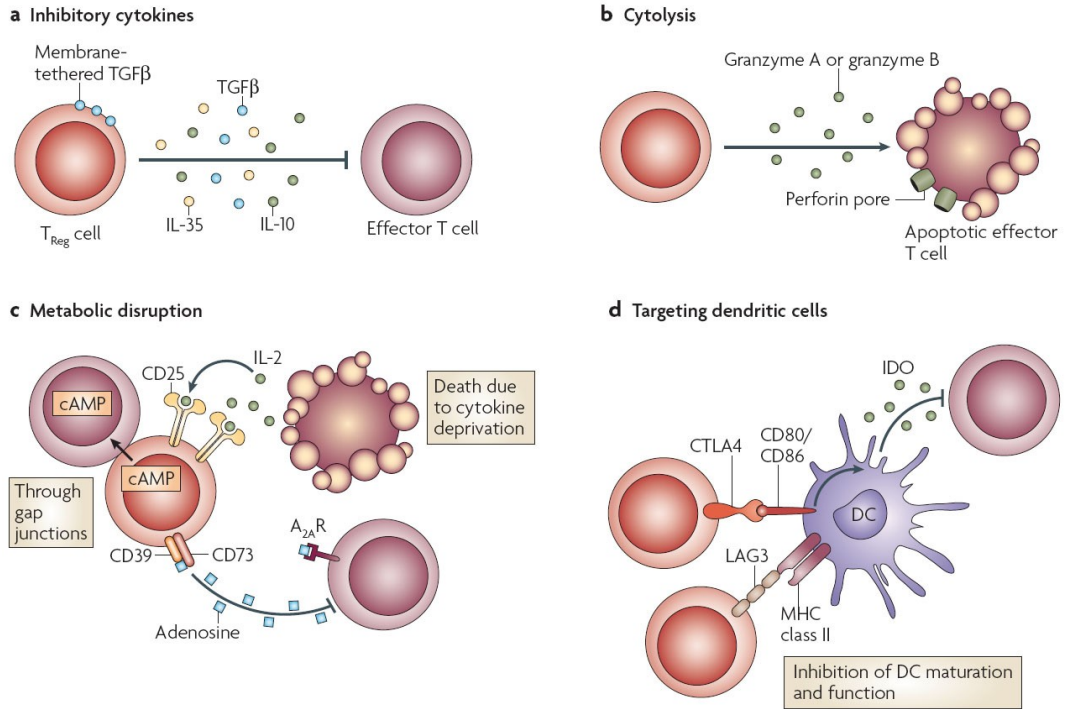


incluant le CD45, CD43 et CD7. La liaison de galectine aux cellules effectrices inhibe la prolifération et la production de cytokines proinflammatoires et induit la mort cellulaire (144).

#### **4.4.4. La suppression par la rupture métabolique**

Les Tregs expriment une grande quantité de CD25, ce qui en fait d'excellentes consommatrices d'IL-2. L'appauvrissement d'IL-2 a pour conséquence d'inhiber la survie et la prolifération des effecteurs (163). Le mécanisme sous-jacent de cette suppression n'est pas encore tout à fait élucidé et les immunologistes continuent à débattre sur le sujet (107, 164). Dernièrement, Pandiyan et al. confirment que le manque d'IL-2 induit l'apoptose des effecteurs par consommation d'IL-2 par les Tregs (165). La co-expression de l'ectoenzyme CD39 et de CD73 par des Tregs entraîne la production d'adénosine péri-cellulaire qui non seulement supprime les effecteurs en se liant à son récepteur A2AR (adénosine A2A receptor), mais induit aussi de nouvelles générations de Tregs par le mécanisme d'inhibition de l'IL-6 et par l'induction de production de TGF- $\beta$  (166, 167).

**Figure 11: Les mécanismes de suppression par des Tregs**



Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, Nature Review immunology 2008

## 5. CD47 ou protéine associée à l'intégrine

Le CD47, connu sous le nom de « protéine associée aux intégrines », est une glycoprotéine hautement hydrophobique composée d'un domaine extracellulaire homologue à la superfamille des immunoglobulines IgV, d'une région pentatransmembranaire (traversant 5 fois la membrane) et d'une courte queue intracytoplasmique dénuée de motifs de signalisation (168). La conformation extracellulaire permettant au CD47 de se lier à l'intégrine est stabilisée par le cholestérol qui interagit avec la région trans-membranaire du CD47 (169, 170). Ces deux régions (IgV et pentatransmembranaires) sont liées par un pont di-sulfure et confèrent au CD47 une conformation nécessaire à la liaison avec ses ligands (171). Le CD47 est exprimé sur les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques et par conséquent les activités biologiques liées au CD47 ne sont pas limitées au système immunitaire (172). Comme son nom l'indique, le CD47 est associé à différentes intégrines en fonction du type cellulaire. Par exemple, il est combiné au  $\alpha v \beta 3$  sur les leucocytes polynucléaires, plaquettes, cellules de mélanome et carcinome ovarienne; au  $\alpha IIb \beta 3$  sur les plaquettes; au  $\alpha 2 \beta 1$  sur les cellules des muscles lisses (173). L'expression de CD47 est considérée comme stable durant toute la vie d'une cellule. De nombreuses études ont montré que l'expression de CD47 peut varier dans des conditions pathologiques. L'expression du CD47 est augmentée sur les plasmocytes isolés de patients atteints du myélome multiple et les cellules cancéreuses de patients atteints de leucémie myéloïde aigue. Son expression est par contre diminuée au niveau des lésions actives du cerveau de patients atteints de sclérose en plaques (174-176).

Le CD47 possède deux principaux ligands. Le premier, le Sirp- $\alpha$  (Signal inhibitory regulatory protein  $\alpha$ ), fait partie d'une famille composée de trois membres, Sirp- $\alpha$ , Sirp- $\beta$  et Sirp- $\gamma$ . On le connaît aussi sous le terme SHPS-1 (Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1). Sa liaison avec le CD47 nécessite une diminution de son état de glycosylation et cette liaison semble être spécifique au type cellulaire et à l'espèce (177). Le SIRP- $\alpha$  est une protéine de la membrane plasmique appartenant à la superfamille des immunoglobulines (IgSF). Elle est formée d'une région extra extracellulaire, d'une région intramembranaire hydrophobe et d'une région cytoplasmique (178). Le domaine intracellulaire possède un motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) qui, lorsqu'il est phosphorylé, recrute les phosphatases SHP-1 et SHP-2 (src homology phosphatase 1 and 2). Ces deux molécules sont responsables de la fonction régulatrice de Sirp- $\alpha$  (178). Sirp- $\alpha$  est exprimé sur les cellules de la lignée cellulaire myéloïde incluant les neutrophiles, les mastocytes, une sous-population de DCs, les macrophages et les monocytes. De plus, il peut se trouver sur des cellules non-hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales du poumon, les cellules endothéliales et les cellules neuronales. En effet, il joue un rôle dans le développement neuronal et le processus de mémorisation. L'expression de Sirp- $\alpha$  peut être augmentée ou diminuée sur des cellules présentatrices d'antigènes comme des DCs ou des macrophages suite à l'engagement des TLRs (179).

Le deuxième ligand de CD47, la thrombospondine-1 (TSP-1), est un composant de la matrice extracellulaire. Cette molécule homotrimérique est composée de nombreux domaines structuraux qui peuvent se lier à une variété de

récepteurs cellulaires. Elle appartient à une famille de cinq membres (TSP-1-5) et se lie au CD47 par son domaine C-terminal globulaire (180). Bien que le CD47 puisse se lier au TSP-2 et 4, il démontre une meilleure activité biologique lorsqu'il se lie TSP-1 (181). Les granules- $\alpha$  des plaquettes sont une source majeure de TSP-1. Parmi les cellules immunitaires, les lymphocytes T, les macrophages et les DCs peuvent produire la TSP-1(182). Néanmoins, les cellules présentatrices d'antigène en sont la source prépondérante (183, 184). Des molécules anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, le PGE<sub>2</sub> et le TGF- $\beta$ , favorisent la sécrétion de TSP-1 par des iDCs et par des mDCs stimulées via les TLRs (185). La TSP-1 est exprimée en faible quantité dans beaucoup de tissus à l'état de base, mais son expression augmente rapidement et de façon transitoire lors d'une blessure et d'un dommage tissulaire, y compris en absence d'agents pathogènes (186).

Dans ce chapitre, nous résumerons les activités biologiques connues du CD47 dans le système immunitaire. Le rôle de CD47 est extrêmement complexe et se situe à plusieurs niveaux. Premièrement, la TSP-1 possède une structure polyvalente permettant de lier plusieurs autres molécules telles que le CD36, les intégrines ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ , et  $\alpha v\beta 3$ ) et la calréticuline (180, 187). Deuxièmement, le CD47 régule les fonctions des intégrines en se liant en *cis* (188, 189), et troisièmement, certaines cellules, telles que les DCs, expriment les trois molécules (CD47/Sirp- $\alpha$ /TSP-1), ce qui rend difficile l'analyse de leur fonction respective (185, 190).

### 5.1. CD47/TSP-1/SIRP- $\alpha$ : Propriété immunorégulatrices

Lors d'une inflammation, le recrutement des cellules du système immunitaire inné ainsi que des cellules effectrices peuvent causer des dommages indésirables, ce qui implique qu'il est extrêmement important de maintenir la réponse inflammatoire sous contrôle. La TSP-1, qui possède des propriétés anti-inflammatoires, est sécrétée en grande quantité au cours d'une inflammation. L'engagement de CD47 par un anticorps ou par le 4N1K, un peptide dérivé du site de liaison du CD47 à la TSP-1, inhibe la production des cytokines (IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF et IL-6) par des iDCs dérivées des monocytes humains stimulés par des bactéries, et rend ces DCs réfractaires à de nouveaux stimuli (191). Il est intéressant de constater que l'effet de l'engagement de Sirp- $\alpha$  par une forme soluble de CD47 (CD47-fc) humain ou par un anticorps anti-Sirp- $\alpha$  agoniste s'apparente à celui de l'engagement du CD47 par un anticorps anti-CD47 ou par TSP1 (192). De plus, ces liaisons bloquent la maturation des DCs, empêchant ainsi leur fonction immunogénique, dont la capacité à stimuler les cellules T naïves. Ces interactions ont un impact anti-inflammatoire non seulement sur les DCs, mais aussi sur les lymphocytes T humains. En effet, l'interaction CD47/TSP-1 inhibe la fonction des cellules T. Dans des conditions non-polarisantes, l'anticorps anti-CD47 ou la TSP-1 supprime la production d'IL-2 et l'expression d'IL-2R $\alpha$ , par conséquent, la réponse à l'IL-2 des cellules T naïves activées (193). Ces cellules anergiques exercent une fonction régulatrice en supprimant des cellules Th1 et Th2. De plus, l'interaction CD47/TSP-1 convertit les cellules mémoires humaines en Tregs. Or l'interaction CD47/TSP-1 s'avère différente de celle de CD47/Sirp- $\alpha$  sur les cellules T humaines. Dans cette dernière

condition, les cellules T ne répondent pas à l'IL-12, mais présentent une réponse à IL-2 normale (170, 194), de sorte que la production d'IFN- $\gamma$  est diminuée, en absence d'inhibition de la prolifération des cellules T en réponse aux DCs allogéniques (192).

Un autre aspect de CD47 est d'induire une mort cellulaire programmée (PCD) de type III qui utilise une voie indépendante des caspase (195, 196). En effet, l'engagement par l'anticorps anti-CD47 immobilisé ou par le TSP-1 induit l'apoptose chez plusieurs types de cellules humaines telles que les lymphocytes T et B, les érythrocytes, les DCs (197-199) en épargnant les cellules souches CD34<sup>+</sup>. De nombreuses études ont ensuite mis en évidence quelques mécanismes moléculaires impliqués dans cette mort cellulaire. Premièrement, l'engagement de CD47 entraîne une réorganisation du réseau de l'actine (170, 200). Deuxièmement, la mort via CD47 régularise le niveau de cAMP par le Gai hétérotrimérique par un effet médié par la protéine kinase A (201). Troisièmement, le CD47 est associé avec Fas, augmentant ainsi l'apoptose médiée par Fas. Finalement, la mort cellulaire des cellules B normales ou isolées des patients souffrant de leucémie lymphoïde chronique via l'engagement CD47 provoque une régulation atypique de l'altération mitochondriale. Ce processus est indépendant de Bax, Bak et Bim (202). La perturbation de F-actine, la réduction du potentiel de la membrane mitochondriale, la dégradation de la mitochondrie et l'exposition de la phosphatidylserine à la surface de la membrane cytoplasmique, sont les caractéristiques de la PCD de type III via l'engagement par le CD47 (203). Ce type de mort cellulaire implique la serpasse qui

fait partie de la famille des sérines protéases et la protéine Drp1, le médiateur-clé de ce processus.

## **5.2. CD47/SIRP- $\alpha$ : Inhibition de la phagocytose**

La molécule CD47 est considérée comme un marqueur de soi pour des raisons suivantes : la liaison de CD47 au Sirp- $\alpha$  exprimé par la cellule phagocytaire délivre un signal négatif, qui entraîne une inhibition de la phagocytose des cellules vivantes. Lorsque le CD47 est absent de la surface des cellules ou lorsque son expression est diminuée, les cellules vivantes sont phagocytées par les cellules Sirp- $\alpha^+$ . Un des exemples les plus convaincants est celui des érythrocytes qui ne possèdent pas de CMH-I. L'absence de CD47 sur des érythrocytes permet leur élimination rapide par les macrophages de la rate.(204). L'expression du CD47 sur les érythrocytes diminue au cours du vieillissement. En éliminant artificiellement les macrophages, les érythrocytes qui expriment faiblement le CD47 s'accumulent dans la rate. Khandelwal et al. proposent que les érythrocytes sénescents perdent leur CD47, provoquant ainsi leur propre élimination (205). De plus, la préservation du sang humain pendant des périodes prolongées induit l'expression de phosphatidylserine et la réduction de CD47 des érythrocytes, entraînant la phagocytose par des macrophages lors de transfusion (206). Cependant, contrairement aux cellules vivantes, les cellules apoptotiques requièrent la présence de CD47 pour être phagocytées par les macrophages (207). En son absence, la



phagocytose des cellules apoptotiques par des macrophages péritonéaux est diminuée.

Les leucocytes sont également affectés par l'absence d'expression de CD47 qui entraîne leur élimination immédiate lorsque transférés dans une souris sauvage. Pourtant, dans un animal déficient pour la molécule CD47, les macrophages ne sont pas capables de phagocyter les cellules CD47<sup>-/-</sup> et la souris reste en bonne santé. Dans le but d'élucider ce phénomène, la moelle osseuse d'un donneur CD47<sup>+/+</sup> est transférée à un hôte CD47<sup>-/-</sup> irradié. Par ce processus, Wang et al. créent une souris chimérique dans laquelle l'hôte déficient pour l'expression du CD47 possède des macrophages CD47<sup>+/+</sup>. Dans cette condition, des cellules spléniques CD47<sup>-/-</sup> transférées dans des souris chimériques ne sont pas éliminées par les macrophages. Par contre, les érythrocytes sont phagocytés. Wang conclut que l'expression de CD47 sur des cellules non-hématopoïétiques est requise pour éduquer le macrophage à phagocyter des cellules CD47<sup>-/-</sup>, à l'exception des érythrocytes (208) et aucune explication n'est donnée à ce jour pour expliquer ce phénomène de tolérance sélective.

Dans une étude récente, on a montré que l'interaction de CD47 avec Sirp- $\alpha$  contrôle la prise de greffe après la transplantation des cellules hématopoïétiques. Particulièrement, le degré de polymorphisme de Sirp- $\alpha$  détermine la capacité des macrophages à se lier aux cellules progénitrices du donneur, et dès ce moment il pourrait contrôler la prise de greffe et l'hématopoïèse (209). Dans un modèle de transplantation de xéno greffe où le Sirp- $\alpha$  humain ne reconnaît pas le CD47 porcine, les cellules porcines sont rapidement phagocytées par les macrophages. L'expression

artificielle du CD47 humain sur des cellules porcines limite cette élimination et favorise la prise de greffon (210). Bien que cette hypothèse semble prometteuse, Barclay vient jeter un doute en confirmant que la région polymorphique de Sirp- $\alpha$  ne se trouve pas dans le site de liaison avec le CD47 (211).

### 5.3. CD47/SIRP- $\alpha$ : La migration

Le rôle de CD47 dans la migration des cellules polymorphonucléaires (PMN) est mis en évidence lorsque les souris CD47<sup>-/-</sup> ont été inoculées avec *Escherichia coli* par la voie intra péritonéale. En deux jours, 100% des souris sont mortes, tandis que toutes les souris sauvages ont survécu. Le mécanisme proposé est l'arrivée tardive des neutrophiles et des monocytes effecteurs indispensables pour empêcher le développement d'une péritonite aigue mortelle. Dans un modèle de maladie où les neutrophiles sont responsables des dommages tissulaires, tels que l'arthrite induite par l'injection de *Staphylococcus*, l'absence de CD47 améliore les signes clinique de la maladie sans doute en retardant la migration des neutrophiles (194).

*In vitro*, le fragment F(ab')<sub>2</sub> de l'anticorps contre le CD47 inhibe la transmigration des neutrophiles à travers une couche unicellulaire de cellules endothéliales suivant un gradient de chimiotactisme: IL-8 (60%), FMLP (76%) et TNF- $\alpha$  (98%) (212). La voie de signalisation de CD47 implique deux tyrosines kinases, Src et Syk, puisque l'utilisation d'inhibiteur des kinases renverse l'effet inhibiteur par l'anticrops anti-CD47 (213). Bien plus, augmenter l'expression de CD47 sur les cellules endothéliales favorise davantage la migration des neutrophiles.

Étrangement, le CD47, connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, agit en synergie avec le TLR-2/6 pour la transmigration et surtout dans les souris déficientes pour les molécules TLR-2 ou MyD88 l'effet inhibiteur de l'anticorps anti-CD47 disparaît (214). Le Sirp- $\alpha$  exprimé sur les neutrophiles joue également un rôle dans la transmigration. En utilisant l'anticorps neutralisant, anti-Sirp- $\alpha$ , la migration des neutrophiles est diminuée de 30 à 60% (212).

La migration des monocytes nécessite également l'interaction CD47/Sirp- $\alpha$ . Cette liaison favorise la transmigration telle que démontrée dans deux modèles, dont un à travers les cellules de l'épithélium cérébrales, et l'autre, à travers les cellules épithéliales alvéolaires (215, 216). Quoique le CD47 soit impliqué, l'expression de Sirp- $\alpha$  sur les monocytes joue un rôle dominant dans la transmigration et l'augmentation de l'expression du CD47 sur les cellules endothéliales cérébrales par des cytokines proinflammatoires (IL-1 $\beta$  et IFN- $\gamma$ ) soutient davantage le processus(216) qui implique la protéine Gi dans la voie de signalisation. Par contre, la transmigration à travers des cellules épithéliales alvéolaires nécessite l'expression de CD47 sur les deux types cellulaires (215), puisque la préincubation soit des monocytes soit des cellules épithéliales alvéolaires avec un anticorps anti-DC47 inhibe de façon égale (90%) la transmigration (215).

## 6. Résultats

L'interaction entre la molécule de CD47 et de Sirp- $\alpha$  gouverne la migration des neutrophiles et des monocytes. De plus, notre laboratoire a démontré, chez l'humain, que l'engagement du CD47 ou de Sirp- $\alpha$  sur les DCs inhibe la maturation, la sécrétion des cytokines et la migration des DCs. L'effet anti-inflammatoire suite à l'engagement du CD47 ne se limite pas seulement aux DCs. En effet, l'interaction CD47/TSP-1 inhibe la fonction effectrice des cellules T et cette liaison peut également convertir les cellules T naïves ou des cellules T mémoires en Tregs. La plupart ces études mentionnées dans la section « introduction » sur le CD47 ont été effectuées *in vitro* chez l'humain. Mon travail avait pour but d'étudier *in vivo*, chez la souris, le rôle du CD47 dans l'homéostasie du système immunitaire et plus particulièrement, son implication dans la migration des DCs et l'homéostasie des Tregs, ainsi de valider *in vivo* les résultats obtenus *in vitro* chez l'humain.

**Ma contribution expérimentale pour les deux articles :**

- Article 1: Figures 1, 2a, 3b et c, 4, 5 et 6a, d et e
- Article 2 : Figures 2, 3, 4b, 4c et 4d

Ces articles ont été publiés dans l'EMBO 2006 et Journal of Immunology 2008 respectivement (63, 217).

**Ma contribution expérimentale pour les data en Annexe:**

- 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.
  - Figure 8
- Fortin, G., M. Raymond, V. Q. Van, M. Rubio, P. Gautier, M. Sarfati, and D. Franchimont. 2009. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells. *J Exp Med* 206:1995-2011
  - Figure 6a

## **6.1. Article 1 : Le CD47 exprimé sur les cellules dendritiques gouverne leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires**

Les cellules dendritiques (DCs) captent et dégradent les antigènes dans les tissus périphériques. Elles migrent par la suite vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes aux lymphocytes. Les DCs sont les seules cellules présentatrices d'antigènes professionnelles capables d'activer efficacement les lymphocytes T naïfs. Le CD47 est un marqueur de soi exprimé de façon ubiquitaire. Lorsqu'il est absent à la surface de la cellule, cette dernière est éliminée rapidement par des cellules phagocytaires Sirp- $\alpha^+$ , le ligand de CD47. Notre premier objectif est de déterminer le rôle de CD47 sur la fonction des DCs *in vivo*. Nos travaux démontrent que le CD47 contrôle sélectivement la migration des DCs et non des lymphocytes T et B, à travers les vaisseaux lymphatiques et les barrières cellulaires endothéliales *in vivo*. Nous observons chez nos souris CD47<sup>-/-</sup> un défaut de migration des DCs cutanées se traduisant par une diminution de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La migration compétitive et l'immunisation active avec des DCs myéloïdes démontrent que la migration des DCs dépend de l'expression du CD47 sur les DCs et non sur les cellules endothéliales. Ce défaut de migration est corrélé avec l'absence de DCs spléniques dans la zone marginale chez nos souris déficientes pour la molécule CD47. L'expression de CCR7 et l'aptitude à migrer en suivant un gradient de chémokine (CCL19) des DCs déficientes pour l'expression de CD47 restent intactes *in vitro*. Nous concluons que le CD47 sur les DCs est un facteur critique contrôlant leur migration et cela a un impact important dans l'activation des lymphocytes T.

# **Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs**

**Running title:** CD47 governs DC migration

Vu Quang Van<sup>\*†</sup>, Sylvie Lesage<sup>†</sup>, Salim Bouguermouh<sup>\*</sup>, Patrick Gautier<sup>\*</sup>, Manuel Rubio<sup>\*</sup>, Martin Levesque<sup>\*</sup>, Sébastien Nguyen<sup>\*</sup>, Laurent Galibert<sup>‡</sup> and Marika Sarfati<sup>\*</sup>.

**\* Immunoregulation Laboratory, CHUM Research Center, University of Montreal, Canada.**

**‡** Serono Pharmaceutical Research Institute, Geneva, Switzerland.

**†**The two authors contributed equally to this work.

**Financial support:** This work was supported by grants from the CIHR. S. Lesage is a recipient of the Senior Research Fellowship Award (CIHR). P. Gautier is a recipient of a COPSE award.

**Corresponding author :** Marika Sarfati  
Centre de recherche du CHUM  
Laboratoire Immunorégulation (M4211K)  
1560, rue Sherbrooke est  
Montréal, Québec, CANADA  
H2L 4M1

## **Abstract**

Dendritic cells (DCs) capture and process Ag in the periphery. Thus, traffic through lymphatic vessels is mandatory before DCs relocate to lymph nodes where they are dedicated to T cell priming. Here, we show that the ubiquitous self-marker CD47 selectively regulates DC but not T and B cell trafficking across lymphatic vessels and endothelial barriers *in vivo*. We find an altered skin DC migration and impaired T cell priming in CD47-deficient mice at steady state and under inflammatory conditions. Competitive DC migration assays and active immunization with myeloid DCs demonstrate that CD47 expression is required on DCs but not on the endothelium for efficient DC trafficking and T cell responses. This migratory defect correlates with the quasi-disappearance of splenic marginal zone DCs in non-manipulated CD47-deficient mice. Nonetheless, CCR7 expression and CCL19-driven chemotaxis remain intact. Our data reveal that CD47 on DC is a critical factor in controlling migration and efficient initiation of the immune response.



## **Introduction**

Dendritic cells (DCs), sentinels of the immune system, are unique in their capacity to coordinate innate and adaptive immune responses. Upon encounter with pathogens or danger signals, DCs adapt their chemokine receptors and migrate to the lymph nodes (LN) where they transfer their information to T cells and initiate T cell differentiation and polarization (Palucka and Banchereau, 2002; Steinman et al., 2003). The trafficking of DCs through lymphatic vessels (LV) is an obligatory route for the accomplishment of their functions (Randolph et al., 2005a). In homeostatic and inflammatory conditions, DC mobilization is under the control of CCR7, although additional signals that include leukotrienes, prostaglandin E2 and CD38 usually found at sites of inflammation, appear to be required to sensitize CCR7 to its ligands (Randolph et al., 2005b). Activated DCs are first attracted to the connective tissue by CCL21 expressed by lymphatic endothelial cells until they enter the afferent lymph and produce CCL19, a chemokine that promotes their final maturation (Bachmann et al., 2006).

Yet, a large gap persists in our understanding of the regulation of DC interactions with the LV, their passage across the endothelial barrier and finally their exit and relocation to LN, where they encounter Ag-specific T cells. Another important issue relates to how DCs egress from the bloodstream to penetrate lymph nodes through high endothelial venules (HEV) (Randolph et al., 2005a). Adhesion (ICAM), junctional (JAMA-1) and extracellular matrix (SPARC) proteins expressed by the host environment or DCs themselves favour DC retention in the peripheral tissues (Cera et al., 2004; Sangaletti et al., 2005; Xu et al., 2001).

A link exists between CD47/SIRP- $\alpha$  interactions and neutrophil transepithelial migration *in vitro* (Liu et al., 2002; Zen and Parkos, 2003). Neutrophil mobilization is delayed *in vivo* in CD47-deficient mice after intra-peritoneal inoculation of *E. coli* (Lindberg et al., 1996). The CD47 Ag (integrin-associated protein/IAP) is a highly hydrophobic and unusual pentaspanning transmembrane protein that is physically and functionally associated with  $\alpha v \beta 3$  integrin, the vitronectin receptor (Brown and Frazier, 2001). Ubiquitously expressed on haematopoietic and non-hematopoietic cells, CD47 serves both as a receptor for the extracellular matrix protein thrombospondin-1 (TSP) and as a ligand for the transmembrane signal regulatory proteins (SIRP)- $\alpha$  and  $\gamma$  (Gao et al., 1996; van Beek et al., 2005). CD47 is considered to be a marker of self in immune and non-immune cells *in vivo*, as it delivers a negative signal to SIRP- $\alpha$  expressed on resident macrophages or DCs, thus inhibiting the clearance of intact haematopoietic cells (Gardai et al., 2005; Oldenborg et al., 2000). Interaction of CD47 with either SIRP- $\alpha$  or TSP molecules regulates several important biological phenomena including cell-cell communication, macrophage multinucleation, neuronal survival, maintenance of lung homeostasis as well as DC maturation and their pro-inflammatory cytokine production (Cant and Ullrich, 2001; Latour et al., 2001).

Considering that interference with CD47/SIRP- $\alpha$  interactions by means of specific antibodies or respective fusion proteins favours Langerhans cell (LC) retention in the epidermis under inflammatory conditions (Fukunaga et al., 2004; Yu et al., 2006), we hypothesized that CD47 deficiency affects the mobilization of SIRP- $\alpha$  expressing myeloid DCs of the immune system, i.e. LC, dermal DCs and

CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells, and thus regulates the T cell priming that ensues (Edwards et al., 2003; Fukunaga et al., 2004). We investigated the impact of CD47 expressed in DCs or as part of the host environment on their trafficking *in vivo*. We report that the lack of CD47 curtails *in vivo* skin DC migration and the Ag-specific T cell response under steady state and inflammatory conditions. We demonstrate that CD47 expression is dispensable on the endothelium but its expression on DCs themselves is essential for their passage across HEV and vascular sinusoids prior their relocation to the LN and the spleen, respectively. *In vivo*, the impaired DC migration is reflected by a profound defect in myeloid CD11b<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> DCs of the splenic marginal zone. Thus, we propose CD47 molecule as a positive self-regulator on myeloid DCs for the control of their trafficking to secondary lymphoid organs.

## Results

### CD47 is required for DC entry into dermal lymphatic vessels

CD47 homophilic and/or CD47/SIRP- $\alpha$  interactions appear to be involved in leukocyte trafficking (Liu et al., 2004b; Rebres et al., 2005). Whether these interactions are also implicated in DC migration and which is the precise step of DC trafficking affected by CD47 deficiency remains to be elucidated. We thus examined the role of CD47 expression for LC emigration from the epidermis to the LN. We quantified the number MHC I-E<sup>+</sup> cells in freshly isolated epidermal sheets and first noticed a slight reduction in LC density (10%) ( $p < 0.01$ ) in CD47<sup>-/-</sup> skin (Fig 1A, top). After *in vitro* culture of the skin, the epidermis was separated from the dermis to examine LC morphology and distribution (Fig 1A, middle and bottom panels). LCs acquired a round shape in the epidermis of both mice. However, while CD47<sup>+/+</sup> DCs accumulated along LV forming dermal cord structures, CD47<sup>-/-</sup> DCs were distributed evenly within the dermis. The absence of dermal cord formation in the CD47-deficient mice suggests that CD47 is required for DC entry into LV. We observed a significant decrease in the accumulation of skin-derived DCs in the CD47<sup>-/-</sup> LN (Fig 1B and C). Since the CD11c<sup>+</sup>IE<sup>high</sup> subset may represent activated resident DCs, we examined CD40 expression and found a significant reduction in the proportion and absolute number of both dermal (CD11c<sup>low</sup>CD40<sup>+</sup>, I) and epidermal (CD11c<sup>high</sup>CD40<sup>+</sup>, II) skin-derived DCs. However, CCR7 expression on CD11c<sup>+</sup>IE<sup>high</sup> and CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>high</sup> DCs was not significantly affected by the lack of CD47 expression. The proportion of resident CD8<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup> DCs was comparable in

both strains of mice but the total DC number was significantly reduced in CD47-deficient mice. This reflected a decrease in CD11c<sup>low</sup>B220 DCs (Fig S1).

To further clarify the impairment of DC trafficking across the LV to the LN, we examined the impact of CD47 deficiency on the Ag-specific response of passively transferred DO11.10 TCR transgenic CD4<sup>+</sup> T cells following s.c. immunization with OVA protein in the absence of adjuvant (Fig 2A). T cell proliferation, measured by CFSE dilution on day 2, was impaired in the ipsilateral LN in CD47-deficient compared to BALB/c mice. No T cell priming was detected in the contralateral LN owing to specificity of the response (data not shown). The decreased T cell priming was observed at 72h whether mice were immunized with 1 or 10 µg OVA, as demonstrated by the percent of undivided cells. Note that a similar proportion of transferred naïve T cells were recovered in both strains of unmanipulated mice, suggesting that the CD47-deficient environment did not hamper their migration to LN (Fig 2C).

Altogether, the observed impairment of dermal cord formation, decreased accumulation of skin-derived DCs in the LNs and inefficient T cell priming in CD47-deficient mice support the hypothesis of altered skin DC migration.

### **CD47/SIRP- $\alpha$ interactions are required for skin DC migration under inflammatory conditions**

To examine how the absence of CD47 influences DC trafficking under inflammatory conditions, mice were immunized with OVA peptide in IFA one day

after passive transfer of transgenic T cells and T cell priming was examined at day 7 (Fig 2B). At this time point, T cell proliferation continued to be decreased in CD47<sup>-/-</sup> hosts demonstrating that CD47 deficiency has a negative impact on the priming of T cells under inflammatory conditions. By using an OVA peptide, we also ascertained that impaired Ag processing did not account for the altered T cell response.

Cutaneous sensitization with FITC is an inflammatory stimulus commonly used to induce a robust migration of skin DCs, along with other immune cells, into draining LN (Fig 3A). However, LN cellularity as well as T and B cell number remained unchanged in CD47-deficient mice after FITC painting (Fig 3A). The absence of immune cell recruitment to the LN is paralleled by a significant decrease in the proportion and accumulation of DCs carrying FITC (Fig 3B and C). The early (i.e. 24h) and late (i.e. 72h) defects in DC migration delineated a decrease in the accumulation of dermal DCs and LCs, respectively (Kissenpfennig et al., 2005). From 24 to 72h after FITC painting, we observed a 3.1- and 5.3-fold increase in the recovery of CD47<sup>-/-</sup> and CD47<sup>+/+</sup> IE<sup>+</sup> FITC<sup>+</sup> DCs, respectively, in the LN. These data suggest that the defect in migration is more pronounced for LCs than dermal CD47<sup>-/-</sup> DCs.

To examine the contribution of CD47 to SIRP- $\alpha$  interactions in BALB/c mice, intradermal injections of CD47-Fc or control fusion protein were performed one hour before FITC application. CD47-Fc treatment significantly reduced the accumulation of epidermal (72h) and dermal (24h) IE<sup>+</sup> FITC<sup>+</sup> DCs in BALB/c mice (Fig 3C and data not shown). The results were expressed as a ratio of IE<sup>+</sup>FITC<sup>+</sup>DCs/Total IE<sup>+</sup>DCs in the LN to eliminate independent variability due to

differences in LN cellularity in the two strains of mice. In contrast to BALB/c mice, pretreatment with CD47-Fc did not further inhibit DC migration at any time point in CD47-deficient mice (Fig 3C). These data demonstrate that CD47-Fc probably disrupted CD47/SIRP- $\alpha$  interactions between DCs and their environment, rather than delivering a negative signal via SIRP- $\alpha$  ligation on DCs and/or the endothelium.

### **Decreased trafficking of CD47<sup>-/-</sup> DCs across lymphatic vessels**

*In vitro* transepithelial migration of leukocytes requires CD47 to be expressed on the epithelium side and CD47 overexpression enhances this passage (Liu et al., 2004a; Rebres et al., 2005). We thus examined whether a similar requirement applied to *in vivo* transendothelial DC migration. To investigate the importance of CD47 as part of the host environment for DC trafficking, OVA peptide-pulsed bone-marrow-derived (BM) CD47<sup>+/+</sup> DCs were administered s.c. to CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> mice in which CFSE transgenic T cells had been adoptively transferred (Fig 4A). The T cell response was comparable in the two types of mice and directly correlated with the number of injected DCs (Fig 4A, top and middle panels). Indeed, a five-fold reduction in the number of BM-CD47<sup>+/+</sup> DCs (0.05 vs 0.25x10<sup>6</sup>) resulted in an equivalent decrease in T cell response. These results indicated that the absence of CD47 in the host did not influence the efficiency of CD47<sup>+/+</sup> DC migration and the quality of the ensuing T cell response. The next series of experiments were then exclusively performed in CD47-deficient hosts, a mandatory setting considering that

injected CD47<sup>-/-</sup> cells were readily eliminated from BALB/c mice as a result of the lack of an inhibitory signal delivered through SIRP- $\alpha$  (Gardai et al., 2005). When compared to CD47<sup>+/+</sup> BM-DCs, CD47<sup>-/-</sup> BM-DCs yielded a strong decrease in the magnitude of the T cell response in CD47<sup>-/-</sup> mice. In fact, the number of undivided T cells was comparable for CD47<sup>-/-</sup> mice immunized with either 0.25x10<sup>6</sup> CD47<sup>-/-</sup> or 0.05x10<sup>6</sup> CD47<sup>+/+</sup> BM- DCs. Therefore, inefficient T cell priming *in vivo*, is observed only when CD47 is absent on the DC and not on the endothelium or in the micro-environment.

Since CD47<sup>+/+</sup> DCs primed naive transgenic T cells *in vitro* as efficiently as CD47<sup>-/-</sup> DCs (Fig S2), the altered T cell priming observed *in vivo* could result from an impaired DC response to chemokines or transmigration through the endothelial barrier. It was thus essential to ascertain the *in vitro* migratory capacity of these two types of DCs to chemo-attractants. We found that CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> DCs displayed equivalent amounts of CCR7 and chemotaxis to CCL19 (Fig 4B). Sphingosine-1-phosphate (S1P) also controls egress of lymphocytes from the LN and is a CCR7-independent mediator of mature DC migration (Lan et al., 2005). We found no difference in the *in vitro* migratory potential of the two types of DCs toward S1P. Similarly, CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> DCs isolated from *ex vivo* skin explants migrated efficiently toward CCL19. CCR7 expression and cell recovery of CD11c<sup>+</sup>IE<sup>high</sup> cells were comparable in both mice (Fig 4C).

Taken together, these data strongly support the concept of an altered passage of CD47<sup>-/-</sup> DCs through LV rather than a defect in chemotaxis toward CCL19. The following experiments were designed to directly and concomitantly trace the *in vivo*



migration of CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> DCs in CD47-deficient hosts (Fig 4D). Each BM-DC population was labelled with CFSE or CMTMR respectively and *vice versa* before s.c. injection at a 1:1 ratio (top panel). On day 2, DCs were found in the draining LN in the proportion of one CD47<sup>-/-</sup> to two CD47<sup>+/+</sup> DCs (bottom panel). As a complementary approach to visualize the differential DC migration, both types of DCs were labelled with the same red fluorescent vital dye (i.e. PKH-26), co-injected at 1:1 ratio and retraced in the LN by CD47 staining (Fig 4E). On day 2, the recovery of CD11c<sup>+</sup>CD47<sup>+</sup> cells gated on PKH-26 positive cells was 66% ± 4.1 (mean± SD of 4 experiments). These two competitive *in vivo* migration assays performed in a CD47-deficient host demonstrate that CD47 must be expressed on the DC to allow for efficient lymphatic transendothelial trafficking but is dispensable on the endothelium itself.

### **The selective altered CD47<sup>-/-</sup> DC migration is correlated with a depletion of marginal zone DCs in the spleen**

Since CD47 expression on DCs was required to gain entry into the LV and prime T cells in the LN, we hypothesized that it was also critical for DCs to exit the bloodstream and travel across the endothelial barriers to enter the spleen. BM-DCs were administered i.v. into mice passively transferred with transgenic T cells one day before and the T cell response was examined at day 3. As depicted in Fig 5A, CD47 expression was dispensable on the endothelium for migration into the spleen as

CD47<sup>+/+</sup> BM-DCs efficiently primed T cells in both strains of mice. In contrast, i.v. injection of CD47<sup>-/-</sup> DCs resulted in impaired T cell priming in CD47<sup>-/-</sup> mice. Note that no T cell response occurred when CD47<sup>-/-</sup> DCs were injected in BALB/c mice because of their elimination. *In vivo* competitive migration assays in CD47-deficient hosts further showed that the absence of CD47 on DCs led to a decrease in their recovery from the spleen. However, we demonstrated that the altered entry into the spleen was rather selective for CD47<sup>-/-</sup> DCs, as we observed a comparable recovery of CD47<sup>-/-</sup> and CD47<sup>+/+</sup> T and B cells (Fig 5B).

The faulty *in vivo* migration of the *in vitro* generated CD47<sup>-/-</sup> BM-DCs was taken as a strong argument in favor of their inefficient trafficking through vascular sinusoids in the spleen. In support of this concept, we next demonstrated in unmanipulated CD47-deficient mice, a drastic reduction in the proportion and the accumulation of splenic CD11b<sup>high</sup> CD11c<sup>high</sup> myeloid DCs that correlated with a significant increase of immature DC precursors in the blood (Fig 6A). In fact, the absolute number of CD11c<sup>high</sup> DCs was significantly diminished; more specifically, the CD4<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> subset was virtually absent in CD47 deficient mice whereas the number of CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> and plasmacytoid DCs (120G8 positive cells) remained unchanged as it was weighed down by a 30% decrease in the cellularity of the spleen (Fig 6B and C). By immunohistological techniques, we observed that the marginal zone was almost devoid of CD11c staining, the precise location of the CD4<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> subset. The number of DCs in T cell areas, mostly comprised of CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> was similar in both strains of mice (Fig 6D). Of interest, the CD4<sup>+</sup> DC subset expressed the lowest quantity of CD47 in BALB/c mice suggesting that

the regulation of CD47 expression may be critical for the localization of this DC subset (Fig S3).

At this point, one may speculate that there is a selective developmental defect of the CD4<sup>+</sup> DC subset in CD47<sup>-/-</sup> mice. Because BM chimera experiments are not feasible in CD47<sup>-/-</sup> mice (Blazar et al., 2001), we relied on *in vitro* and *in vivo* DC differentiation experiments to disprove such a hypothesis. No defect was observed during BM-DC differentiation *in vitro* with GM-CSF (Fig 4 and data not shown) and the analysis of DC subsets after *in vivo* administration of Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L), known to promote the differentiation and the expansion of both CD4<sup>+</sup>DC and CD8<sup>+</sup> DC subsets, showed that the number of progenitors and total DCs recovered in the BM and blood was comparable in Flt3-L-treated CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> mice. However, the reduction in CD4<sup>+</sup>DCs was maintained in the spleen of Flt-3L-treated CD47 mutants (Fig S4).

Recent studies provided evidence that the pool of splenic myeloid DCs is maintained by a combination of continuous extravasation from the blood of DC precursors and the local proliferation of immediate DC precursors in the spleen (Kabashima et al., 2005). Here we show a similar or increased proportion of BrdU<sup>+</sup> cells among CD11c<sup>high</sup> DCs, as well as the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets, in the two strains of mice 3.5 or 48 h after BrdU administration (Fig 6E and 5S). However, the absolute number of proliferating DC precursors that had previously differentiated into the CD4<sup>+</sup> subset was significantly reduced in the CD47<sup>-/-</sup> spleen mice. Thus, an additional mechanism underlying the quasi-disappearance in CD4<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> DCs in

CD47-deficient mice may be through an altered migration into the spleen of the low frequency immediate DC precursors that otherwise proliferated efficiently.

Collectively, the present results revealed that CD47 expression on DCs positively regulates myeloid DC trafficking and as such may control the pool of marginal zone DCs in the spleen.

## Discussion

At peripheral sites, DCs require direct recognition of pathogens to appreciate the quality of the danger and initiate their migration toward the LN, where they are dedicated to T cell priming. Yet, the integrated signals that lead to DC migration and the elicitation of a protective immune response versus tolerance are not completely identified.

Earlier *in vitro* studies indicated that through the interaction with its counter-receptor SIRP- $\alpha$  on neutrophils or monocytes, CD47 on the epithelium or endothelium controls leukocyte migration (de Vries et al., 2002; Liu et al., 2002; Zen and Parkos, 2003). Here we hypothesized that CD47 expression governs epidermal and dermal skin transendothelial DC trafficking to the LN. In the absence of CD47, there was a decrease in the accumulation of skin-derived DCs in the draining LN under both homeostatic and inflammatory conditions. We have established that CD47 expression on DCs, rather than on the endothelium, is essential for DCs to gain entry into the afferent lymph and for their relocation to the LN, where stimulation of T cells occurs. We propose that after skin DCs have penetrated through the extracellular matrix network into the dermis, their entrance into LV is positively controlled by CD47.

Although it is not yet clear whether CD47/CD47 or CD47/SIRP- $\alpha$  interactions predominantly regulate LC retention in the epidermis, LC emigration is impaired in SIRP- $\alpha$  mutants lacking its intracytoplasmic domain (Fukunaga et al., 2004). In addition, phosphorylated SIRP- $\alpha$  expression on a melanoma cell line

positively controls its migration (Motegi et al., 2003). In contrast, SIRP- $\alpha$  ligation by CD47-Fc fusion protein impairs skin DC migration in BALB/c mice and promotes SIRP- $\alpha$  tyrosine phosphorylation and SHP-1 recruitment under inflammatory conditions (Okazawa et al., 2005). Obviously, in CD47-deficient mice, SIRP- $\alpha$  is not bound by CD47 *in trans* nor *in cis* and the predominant effect appeared to be impaired myeloid cell migration. Here we report that the proportion of CD11c<sup>+</sup> DCs carrying FITC in the LN of mutant mice was not further altered by treatment with CD47-Fc fusion protein. These data suggest that CD47-Fc interrupted a positive interaction between CD47/SIRP- $\alpha$  rather than delivering a negative signal to the DC via SIRP- $\alpha$ . Alternatively, the SIRP- $\alpha$  signalling pathway may not be functional in the absence of CD47 co-expression.

Inflammatory stimuli delivered by contact elicitation or active immunization with OVA peptide in the presence of adjuvant induces less efficient skin DC migration in CD47-deficient mice when compared to BALB/c mice. The general defect in skin DC migration is reminiscent of the phenotype observed in CCR7-deficient mice (Ohl et al., 2004). The latter is much more severe, as there is a near complete absence of naïve T and B cells in the LN, precluding DC/T cell interactions (Forster et al., 1999). In contrast, T and B cell migration were entirely normal in CD47-deficient mice. Moreover, we show that the absence of CD47 did not modulate CCR7 expression nor the chemotaxis toward CCL19. During the revision of this manuscript, Hagnerud et al (Hagnerud et al., 2006) similarly reported on the *in vivo* altered DC migration in CD47<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice with no modulation of CCR7 expression. In contrast to our data, these authors observed a defect in DC chemotaxis

*in vitro*. Since the function of CD47 is partly mediated through interactions with SIRP- $\alpha$ , this apparent controversy may be attributed to the polymorphism in SIRP- $\alpha$  in the two strains of mice (Sano et al., 1999).

We further showed that i.v. injected CD47<sup>-/-</sup> BM-DCs poorly primed T cells in the spleen, due to their inefficient migration across endothelial barriers. Owing to the observed parallel between the cellular distribution of SIRP- $\alpha$  expression (i.e. neutrophils, LCs and dermal DCs) and the defect in cell migration of the corresponding cells in CD47<sup>-/-</sup> mice, we postulated that the absence of CD47 commonly affects the mobilization of SIRP- $\alpha$  expressing cells. This prediction fits with our *in vivo* findings showing a selective depletion of the CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>high</sup> marginal zone DC subset in the spleen. In support of our hypothesis, SIRP- $\alpha$  is not expressed on CD8<sup>+</sup> resident DCs, and their numbers were unaltered in the CD47-deficient spleen and LN.

Other mice carrying mutations for various transcription factors display a deficiency in CD4<sup>+</sup> DC numbers. Indeed, a reduction in the CD4<sup>+</sup>DC subset was demonstrated in Rel-B, PU.1, TRAF-6, IRF-2 and IRF-4-deficient mice as a result of a developmental defect in their DCs (Guerriero et al., 2000; Ichikawa et al., 2004; Kobayashi et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Wu et al., 1998). Specifically, PU.1, Rel-B and IRF-4-deficient mice all show defects in BM-DC differentiation *in vitro*, and in contrast to CD47 deficiency, they show no evidence of altered DC migration. Hence, the decrease in splenic CD4<sup>+</sup>DCs observed in CD47<sup>-/-</sup> mice is most likely linked to a defect in cellular migration rather than differentiation.

Nonetheless, we cannot rule out a DC developmental problem in CD47<sup>-/-</sup> mice although the following observations argued against such a defect. First, Flt-3-L administration yielded a similar recovery of progenitors and total DCs in the BM and blood in CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> mice. Second, the proportion of CD11b<sup>+</sup> I-E<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>DC precursors was increased in the CD47<sup>-/-</sup> blood. Third, intrasplenic DC proliferation, a pathway to maintain DC homeostasis, was not decreased in the mutant mice. Yet, the absolute number of CD4<sup>+</sup> DCs was significantly reduced after BrdU or Flt3-L administration. We thus propose that a lack of CD47 leads to a defective migration of immediate DC precursors into the spleen which results in the quasi-disappearance of marginal zone DCs. Naik et al (Naik et al., 2006) recently identified such a low frequency DC precursor (0.05% total spleen cells), i.e CD11c<sup>int</sup>, CD43<sup>int</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, MHC classII<sup>-</sup> SIRP- $\alpha$ <sup>int</sup> DC, corroborating our hypothesis of a general defect in the mobilization of SIRP- $\alpha$ <sup>+</sup> cells in the absence of CD47.

Taken together, we provide evidence that the CD47 molecule expressed on myeloid DCs controls their ability to efficiently traffic across lymphatic and endothelial vessels, seed in secondary lymphoid organs and participate in T cell priming. Thus, regulating CD47 expression and as such DC migration may have an impact on undesired T cell responses in auto-immune diseases and organ transplantation.



## **Materials and Methods**

### **Mice**

A 16<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> generation BALB/c backcross of CD47-deficient mice was a generous gift from Dr. Oldenborg. BALB/c mice were purchased from Charles River Labs. Eight to 12-week-old mice were used in all experimental protocols as approved by the Canadian Council on Animal Care and maintained under SPF conditions.

### **Preparation of epidermal sheets and skin explant cultures**

The dorsal halves of ear explants were incubated in PBS with 20mM EDTA for 2h. The epidermal and dermal fractions were separated using fine forceps. The tissues were stained with FITC- anti-I-E mAb (14.4.4S3). In some experiments, ear explants were floated on tissue culture medium with or without 100ng/ml of CCL19 (R&D System) for 72h before dermis was separated from epidermis and stained. The images were acquired on a microscope equipped with a mercury lamp, monochrome filter, Kodak camera, and with the Metamorph software. Emigrated cells in the culture supernatant were counted by flow cytometry using latex beads for calibration (Beckman Coulter) and stained for CD11c, I-E and CCR7 expression. The data were acquired on a FACSCalibur and analyzed using Cellquest Software.

### **Preparation of BM-DCs.**

BM-DCs were prepared as previously described (Inaba et al., 1992), with slight modifications. BM cell suspensions were obtained from femurs and tibias and left to

adhere *in vitro* for 6h in serum-free RPMI at  $5 \times 10^6$  cells/ml in 6-well plates. 5ng/ml GM-CSF (Peprotech) was added for 10 to 14 days to  $1 \times 10^7$  non-adherent cells/3 ml to induce DC differentiation. The culture medium was renewed every 3 days. Cell purity: >98% CD11c<sup>+</sup> cells. In some experiments, BM-DCs were activated overnight with 1µg/ml of LPS (*E.coli*, Sigma) and 1µg/ml OVA peptide (323-339, Peptide International).

### ***In vitro* migration assay**

$3 \times 10^5$  activated or not activated BM-DCs in RPMI were placed on the upper compartment of 5µm pore size Transwell plates (ChemoTx, Neuro Probe). 100ng/ml of CCL19 or 1µM of S1P (R&D system) in RPMI were added to the lower chamber. After 3 hours of incubation at 37°C, cells that had transmigrated to the bottom compartment were collected and counted by flow cytometry using latex beads for calibration (Beckman Coulter).

### **Passive transfer experiments**

BALB/c and CD47-deficient mice were injected i.v. with  $5 \times 10^6$  CFSE-labelled CD4<sup>+</sup> T cells from DO11.10 mice. One day later, the mice were immunized s.c in the right footpad with 1µg or 10µg of OVA protein dissolved in 20µl of PBS or 10µg of OVA peptide emulsified in IFA. The left footpad received 20µl of PBS. The draining LN were extracted two, three or seven days after the immunization. In some experiments,

mice were immunized with activated OVA-pulsed BM-DCs s.c or i.v. and the T cell response was examined in the LN or the spleen after 72h.

### **Competitive migration assays**

$2 \times 10^6$  (s.c.) or  $4 \times 10^6$  (i.v.) activated CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> BM-DCs were stained with two different colors, CFSE (Sigma) or CMTMR (Molecular probe) respectively, and injected into CD47<sup>-/-</sup> hosts. 24h later, DCs were retraced in draining LN or spleen by flow cytometry. For some experiments, activated CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> BM-DCs were stained with PKH26 (Sigma), injected s.c and retraced by CD47 staining.

### **Spleen and lymph node staining**

Antibodies were purchased from BD, except for anti-I-E (14.4.4S3) and anti-CD11c (N418), purified in our laboratory, and an antibody which specifically recognizes pDCs, 120G-8 (Asselin-Paturel et al., 2003) which was kindly provided by Dr. G. Trinchieri. Spleens were injected with 1ml liberase at 0.4mg/ml and minced in 2ml (Roche). Axillary, brachial and inguinal LN were minced in 3ml liberase. The tissues were incubated at 37°C for 15min, and passed through a 70µm nylon cell strainer. Spleen cells were then treated with NH<sub>4</sub>Cl for red blood cell lysis.

### **FITC sensitization.**

Mice were shaved and 100µl of a 1% FITC (sigma) solution or vehicle alone (1:1 v/v acetone and dibutylphthalate) was painted on the abdomen. 24 or 72h after painting, the inguinal LN were stained for DCs, T and B cells, and analyzed by flow cytometry. In CD47-Fc experiments, mice received 50µg of CD47-Fc or CTRL-Fc fusion proteins intradermally before FITC sensitization.

### **Spleen immunohistochemistry**

Frozen spleen sections (8µm) were fixed on slides in acetone for 20min at -20°C, blocked with Universal Blocking reagent (DAKO, Mississauga, Ont) and stained with biotin anti-CD11c and either FITC- anti-B220 or anti-Thy1. The biotin-coupled antibody was revealed using Vectastain ABC kit (Vector Labs, Burlingame, CA), followed by DAB, and the FITC- antibodies using alkaline phosphatase-coupled anti-FITC (Roche, Indianapolis, IN) followed by Vector Blue.

### **BrdU staining**

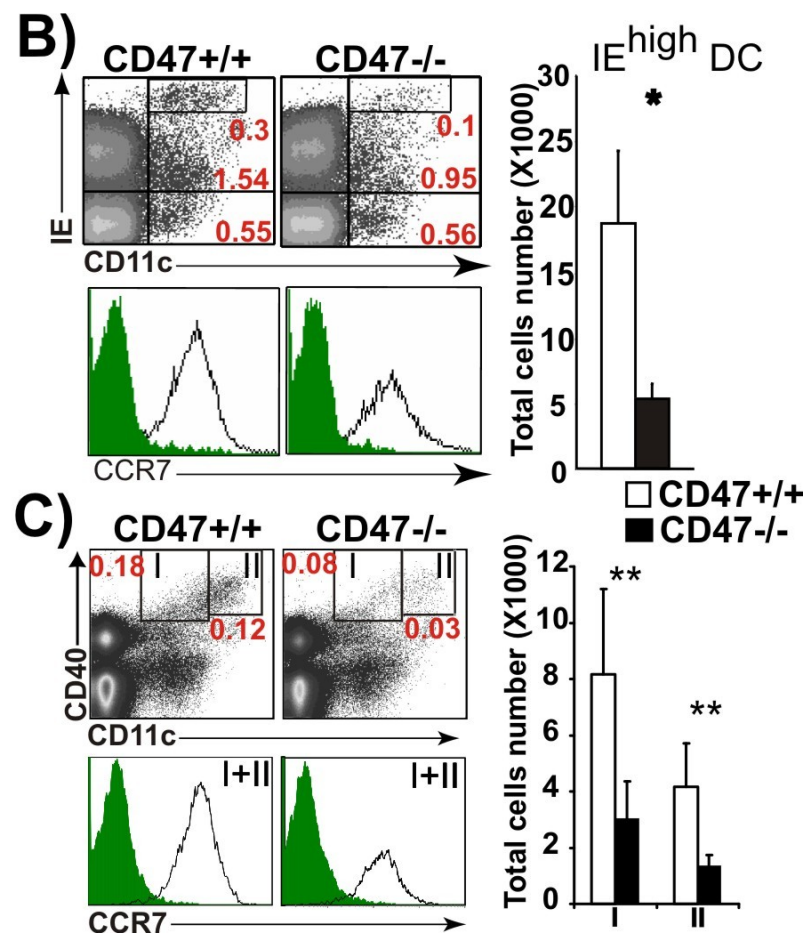
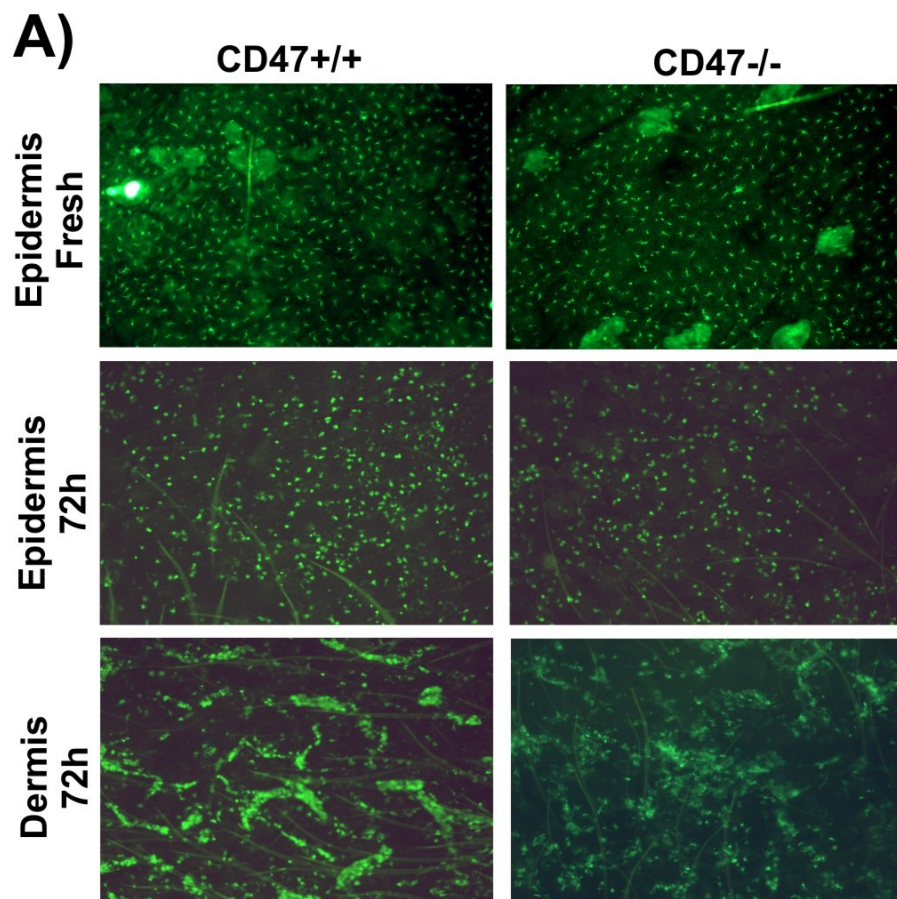
BrdU (2mg/mouse) was injected i.p. and added to the drinking water (0.8mg/ml). 3.5 or 48h later, spleens were harvested and stained for different DC subsets. The cells were then fixed, permeabilized (BD Cytofix/cytoperm) and treated with DNase I (Sigma) for one hour at 37°C before staining with anti-BrdU-FITC.

## **Statistical analysis**

Student' t test ; \*\*\*:  $p < 0.001$  \*\*:  $p < 0.01$  \*:  $p < 0.05$

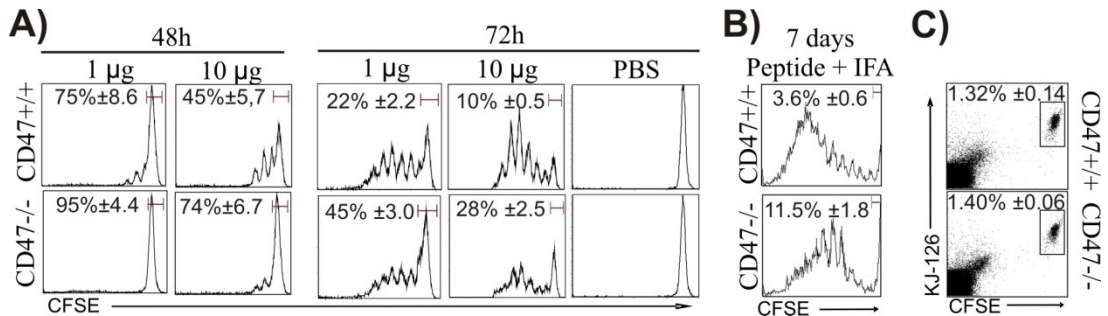
## Figure Legends

**Figure 1: Effect of CD47 deficiency on distribution and mobilization of LCs and skin DCs** (A) Epidermal sheets were prepared from untreated CD47<sup>-/-</sup> and <sup>+/+</sup> mice and stained with MHC I-E mAb (top panel). After 72h culture, the epidermis (middle panel) was separated from the dermis (bottom panel) and stained with I-E mAb. The data represent 1 of 3 individually analyzed mice. (B-C) LN cell suspensions were analyzed for the expression of CD11c, I-E and CD40. The proportion of CD11c<sup>+</sup>I-E<sup>high</sup> cells (B) and of each CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> subset (I, dermal DCs and II, epidermal DCs) (C) is shown. CCR7 staining was examined for CD11c<sup>+</sup>I-E<sup>high</sup> (B, lower panel) and skin-derived DCs (I + II) (C, lower panel). Dot plots are representative of 5 individually analyzed LN from separate mice. Bars represent absolute number (mean± SD, n= 5 mice) of CD11c<sup>+</sup>I-E<sup>high</sup> cells and CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> DC subsets.



**Figure 2: Impaired T cell response in CD47<sup>-/-</sup> mice under homeostatic and inflammatory conditions**

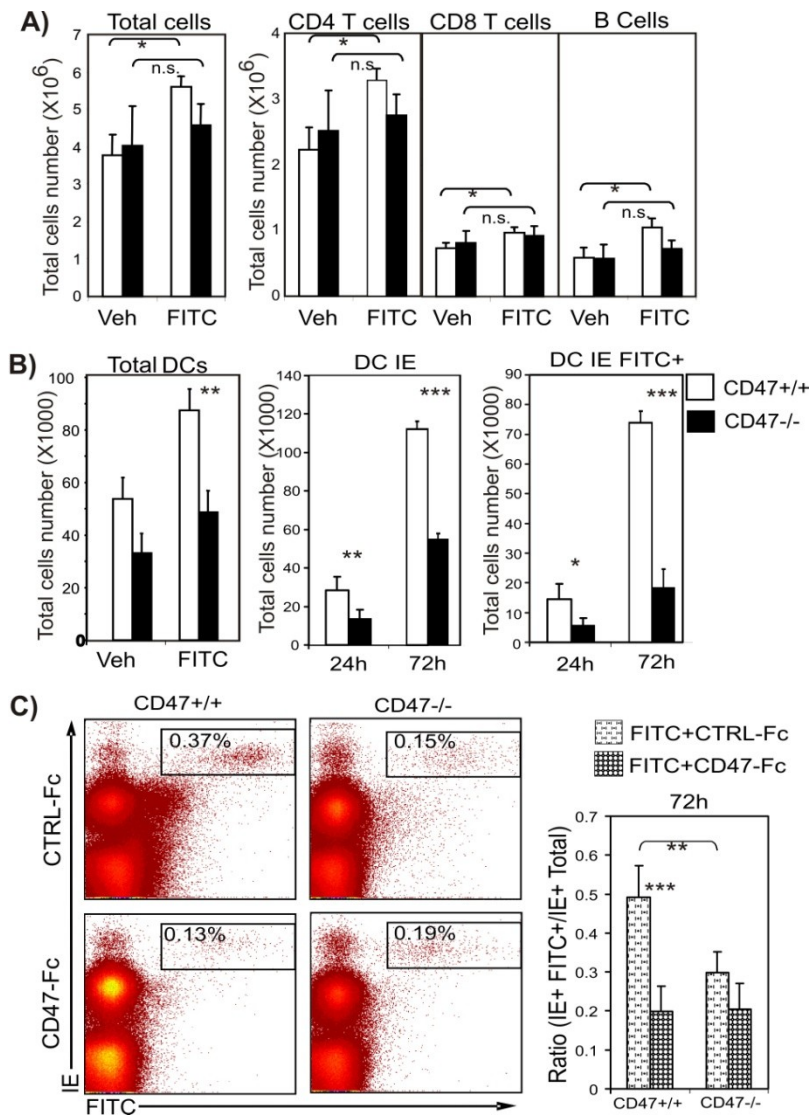
**(A-B)** One day after adoptive transfer of CFSE-labelled CD4<sup>+</sup> DO11.10 T cells into CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> mice, the recipients were immunized s.c. into the left footpad with 1 or 10 µg OVA protein **(A)** or 10 µg OVA peptide with IFA **(B)**. PBS was injected into right footpad. Proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells was measured by CFSE dilution in the draining LN after 48 or 72 h **(A)** and 7 days **(B)**. CFSE profile (% of undivided cells, mean±SEM) is representative of 5 individually analyzed LN from separate mice. **(C)** Proportion of CFSE-labelled CD4<sup>+</sup> DO11.10 T cells (KJ-126<sup>+</sup> cells) recovered from naive CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> mice after 24 h.





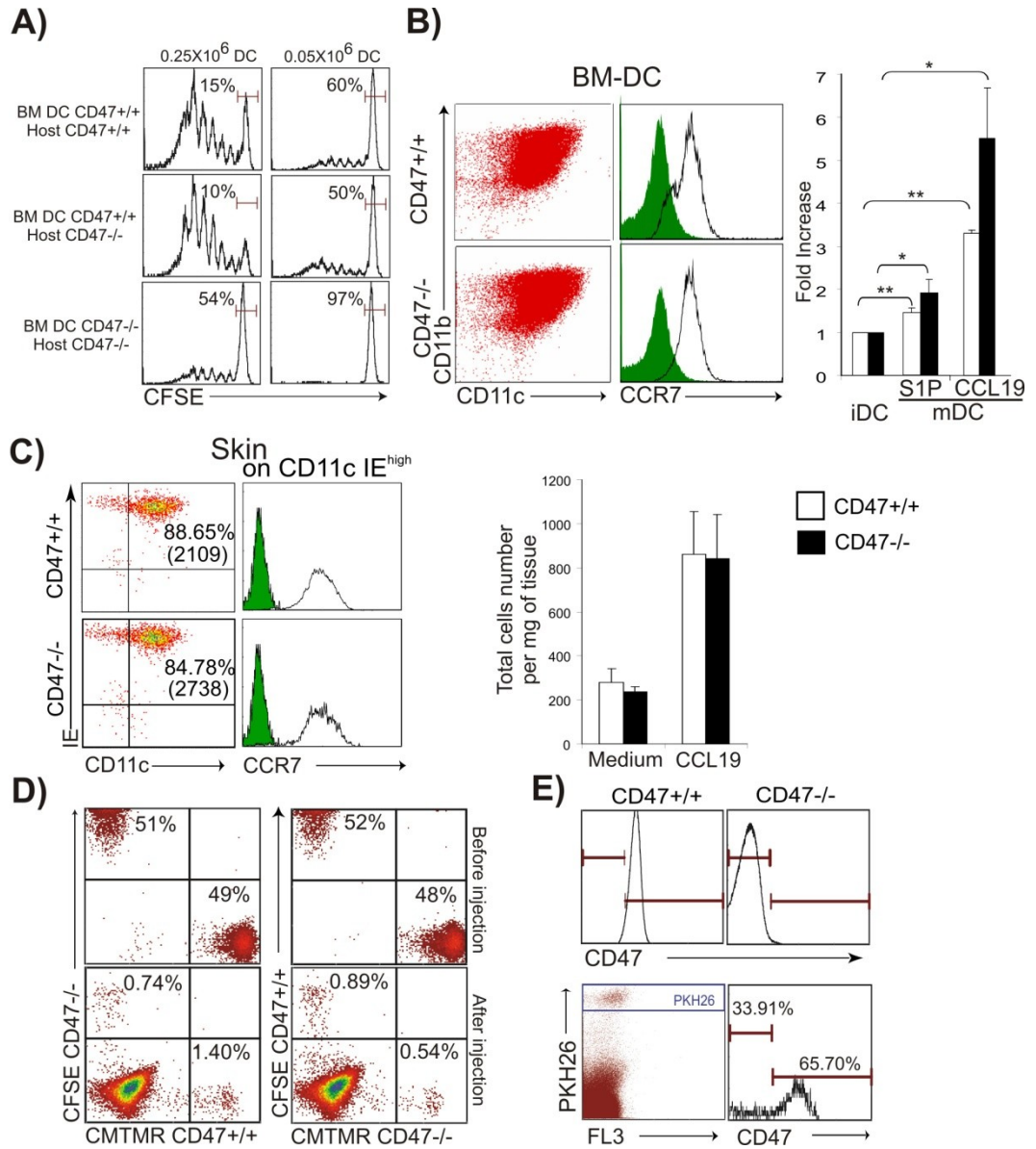
**Figure 3: CD47/SIRP- $\alpha$  requirement for skin DC migration under inflammatory conditions**

LN cell recovery 24 or 72h after FITC painting is shown for various cell subsets (A). Relative number of total DCs (24h), MHC-I-E<sup>+</sup> and MHC-I-E<sup>+</sup> carrying FITC (B). Proportion of MHC-I-E<sup>+</sup> FITC<sup>+</sup> DCs in LN (72h) of mice injected i.d. with CD47-Fc or CTRL-Fc. 30min before FITC challenge (C). For each panel, data are representative of at least 5 individually analyzed LN from separate mice.



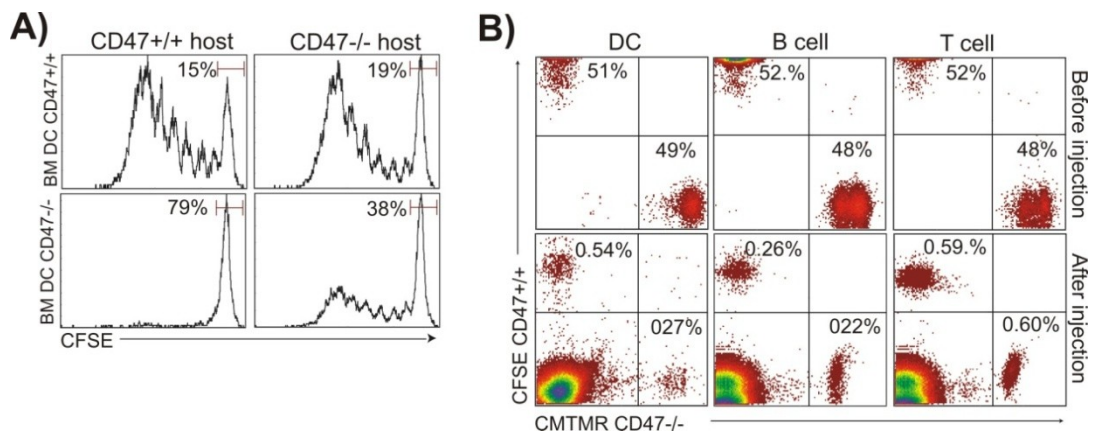
**Figure 4: Decreased CD47<sup>-/-</sup> DC trafficking across lymphatic vessels**

**(A)** 0.25 and 0.05x10<sup>6</sup> CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> LPS-activated and OVA-pulsed BM-DCs were injected s.c. into the footpad 24h after adoptive transfer of CFSE-labelled transgenic CD4<sup>+</sup> T cells. Proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells in the draining LN was analyzed after 72 h. Data is representative of 4 individually analyzed mice. **(B)** Activated BM-DCs were analysed for CD11b and CCR7 expression and their *in vitro* migration toward CCL19 and SIP in transwell chambers. Dot plots and histograms represent 1 of 4 BM-DC preparations. Bars represent fold increase DC migration compared to immature DCs (mean± SD, n= 5 mice) **(C)** Ears from 4 to 10 mice were pooled to determine the proportion (MFI, in parenthesis) of I-E<sup>+</sup> cells emigrated into the tissue culture medium after 72h. CCR7 staining is shown for CD11c<sup>+</sup>I-E<sup>high</sup> DCs. Bars represent the number of IE<sup>+</sup> cells/mg of tissue cultured in the absence or presence of CCL19. (mean ± SD, n= 3 pools of mice) **(D)** For the competitive migration assay, activated CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> BM-DCs were stained with CFSE or CMTMR and *vice versa*, and mixed at a 1:1 ratio before s.c. injection into mice. Top panel; a mixture of cells prior to injection. Bottom panel; cells were isolated from LN on day 2 and retraced **(E)** CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> activated BM-DC were stained with PKH-26 and injected s.c in CD47<sup>-/-</sup> footpad, then traced by staining with anti-CD47 antibody after gating on PKH-26 positive cells. Upper panel shows negative and positive CD47 staining of a BALB/c LN. For panels D and E, data is representative of at least 5 individually analyzed mice.



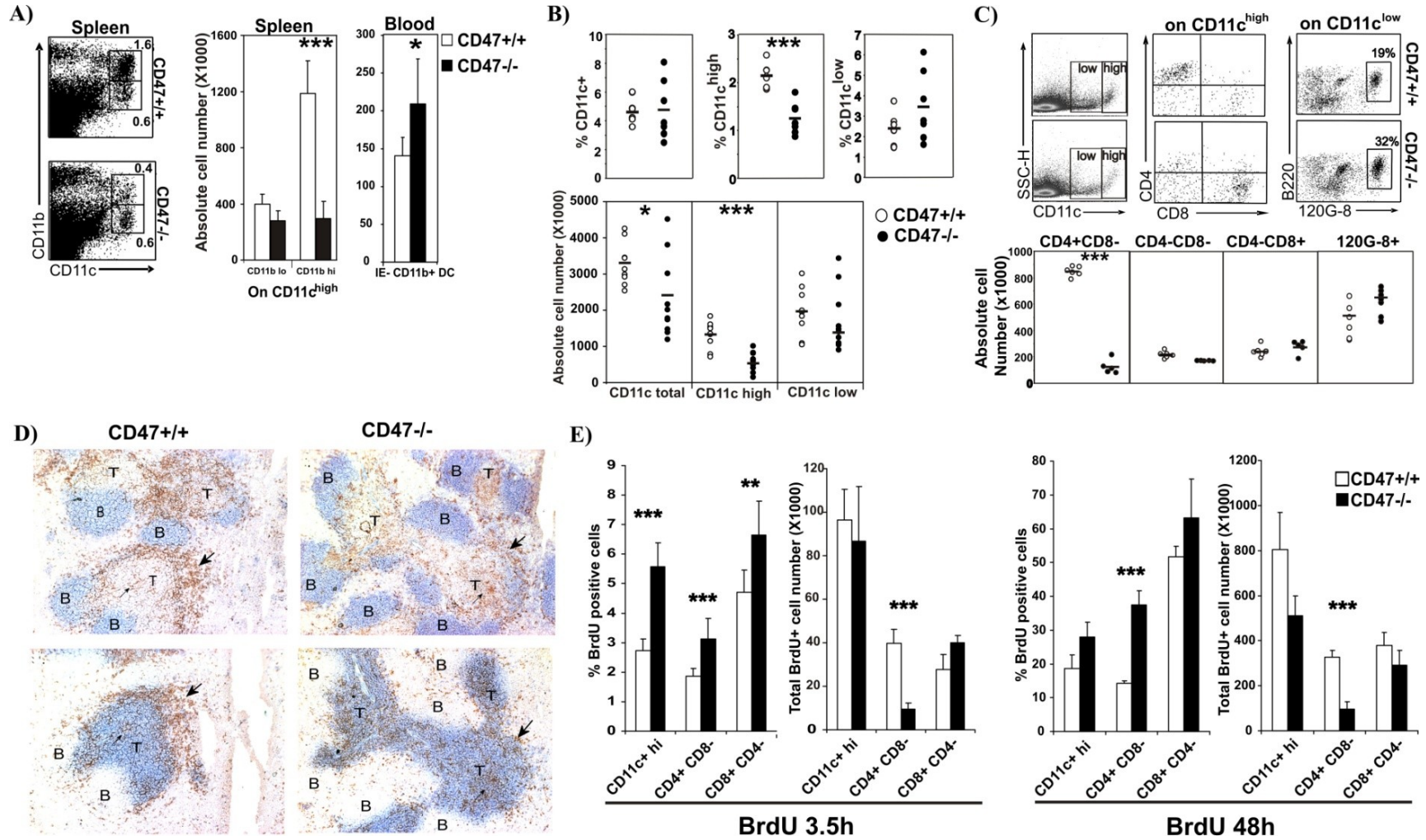
**Figure 5: Selective altered CD47<sup>-/-</sup> DC transendothelial migration**

**(A)**  $0.5 \times 10^6$  CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> LPS-activated and OVA-pulsed BM-DCs were injected i.v. 24h after adoptive transfer of CFSE-labelled transgenic CD4<sup>+</sup> T cells. Proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen was analyzed after 72 hr. **(B)** For the competitive migration assay, activated CD47<sup>+/+</sup> and CD47<sup>-/-</sup> BM-DC, and unfractionated B and T cells were stained with CFSE or CMTMR and mixed at 1:1 ratio before i.v. injection into mice. Top panel; a mixture of the cells prior to injection. Bottom panel; cells were isolated from spleen and retraced at day 1 post injection. In each panel, data represents 1 of 4 individually analyzed spleens.



**Figure 6: Depletion of myeloid CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>high</sup> DC subset in the spleen of CD47-deficient mice**

(A) Proportion and absolute number of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DCs in spleens (left bar graph; mean± SD, n= 4 mice) and immediate DC precursors (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>I-E<sup>-</sup> DCs) in blood (right bar graph; mean± SD, n= 5 mice). (B-C) Proportion and absolute number of total DCs, CD11c<sup>high</sup>, CD11c<sup>low</sup> and the different DC subsets per spleen. (D) Serial sections from frozen spleens were stained with CD11c (brown) and B220 (blue, top) or Thy1 (blue, bottom). Large arrow head points to marginal zone DCs while narrow arrow head points to DCs in the T cell area. Data are representative of 3 individually analyzed spleens. (E) Proportion and absolute number of BrDU-positive CD11c<sup>high</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> DCs in mice treated with BrdU for 3.5h and 48h. Bars represent mean ± SD of 6 (3.5h) and 4 (48h) individually analyzed mice



## References

- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F. and Trinchieri, G. (2003) Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol*, **171**, 6466-6477.
- Bachmann, M.F., Kopf, M. and Marsland, B.J. (2006) Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol*, **6**, 159-164.
- Blazar, B.R., Lindberg, F.P., Ingulli, E., Panoskaltsis-Mortari, A., Oldenborg, P.A., Iizuka, K., Yokoyama, W.M. and Taylor, P.A. (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.
- Brown, E.J. and Frazier, W.A. (2001) Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, **11**, 130-135.
- Cant, C.A. and Ullrich, A. (2001) Signal regulation by family conspiracy. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 117-124.
- Cera, M.R., Del Prete, A., Vecchi, A., Corada, M., Martin-Padura, I., Motoike, T., Tonetti, P., Bazzoni, G., Vermi, W., Gentili, F., Bernasconi, S., Sato, T.N., Mantovani, A. and Dejana, E. (2004) Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J Clin Invest*, **114**, 729-738.
- de Vries, H.E., Hendriks, J.J., Honing, H., De Lavalette, C.R., van der Pol, S.M., Hooijberg, E., Dijkstra, C.D. and van den Berg, T.K. (2002) Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol*, **168**, 5832-5839.
- Edwards, A.D., Chaussabel, D., Tomlinson, S., Schulz, O., Sher, A. and Reis e Sousa, C. (2003) Relationships among murine CD11c(high) dendritic cell subsets as revealed by baseline gene expression patterns. *J Immunol*, **171**, 47-60.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E. and Lipp, M. (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, **99**, 23-33.
- Fukunaga, A., Nagai, H., Noguchi, T., Okazawa, H., Matozaki, T., Yu, X., Lagenaar, C.F., Honma, N., Ichihashi, M., Kasuga, M., Nishigori, C. and Horikawa, T.

- (2004) Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the migration of Langerhans cells from the epidermis to draining lymph nodes. *J Immunol*, **172**, 4091-4099.
- Gao, A.G., Lindberg, F.P., Finn, M.B., Blystone, S.D., Brown, E.J. and Frazier, W.A. (1996) Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem*, **271**, 21-24.
- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M. and Henson, P.M. (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, **123**, 321-334.
- Guerriero, A., Langmuir, P.B., Spain, L.M. and Scott, E.W. (2000) PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood*, **95**, 879-885.
- Hagnerud, S., Manna, P.P., Cella, M., Stenberg, A., Frazier, W.A., Colonna, M. and Oldenborg, P.A. (2006) Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. *J Immunol*, **176**, 5772-5778.
- Ichikawa, E., Hida, S., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Takahara, K., Miyagawa, S., Inaba, K. and Taki, S. (2004) Defective development of splenic and epidermal CD4<sup>+</sup> dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3909-3914.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R.M. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, **176**, 1693-1702.
- Kabashima, K., Banks, T.A., Ansel, K.M., Lu, T.T., Ware, C.F. and Cyster, J.G. (2005) Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity*, **22**, 439-450.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., Saeland, S., Davoust, J. and Malissen, B. (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.



- Kobayashi, T., Walsh, P.T., Walsh, M.C., Speirs, K.M., Chiffoleau, E., King, C.G., Hancock, W.W., Caamano, J.H., Hunter, C.A., Scott, P., Turka, L.A. and Choi, Y. (2003) TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity*, **19**, 353-363.
- Lan, Y.Y., De Creus, A., Colvin, B.L., Abe, M., Brinkmann, V., Coates, P.T. and Thomson, A.W. (2005) The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 modulates dendritic cell trafficking in vivo. *Am J Transplant*, **5**, 2649-2659.
- Latour, S., Tanaka, H., Demeure, C., Mateo, V., Rubio, M., Brown, E.J., Maliszewski, C., Lindberg, F.P., Oldenborg, A., Ullrich, A., Delespesse, G. and Sarfati, M. (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.
- Lindberg, F.P., Bullard, D.C., Caver, T.E., Gresham, H.D., Beaudet, A.L. and Brown, E.J. (1996) Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science*, **274**, 795-798.
- Liu, Y., Buhring, H.J., Zen, K., Burst, S.L., Schnell, F.J., Williams, I.R. and Parkos, C.A. (2002) Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem*, **277**, 10028-10036.
- Liu, Y., O'Connor, M.B., Mandell, K.J., Zen, K., Ullrich, A., Buhring, H.J. and Parkos, C.A. (2004a) Peptide-mediated inhibition of neutrophil transmigration by blocking CD47 interactions with signal regulatory protein alpha. *J Immunol*, **172**, 2578-2585.
- Liu, Y., Shaw, S.K., Ma, S., Yang, L., Luscinskas, F.W. and Parkos, C.A. (2004b) Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol*, **172**, 7-13.
- Motegi, S., Okazawa, H., Ohnishi, H., Sato, R., Kaneko, Y., Kobayashi, H., Tomizawa, K., Ito, T., Honma, N., Buhring, H.J., Ishikawa, O. and Matozaki, T. (2003) Role of the CD47-SHPS-1 system in regulation of cell migration. *Embo J*, **22**, 2634-2644.
- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M. and Shortman, K. (2006) Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol*, **7**, 663-671.

- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G. and Forster, R. (2004) CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, **21**, 279-288.
- Okazawa, H., Motegi, S., Ohyama, N., Ohnishi, H., Tomizawa, T., Kaneko, Y., Oldenborg, P.A., Ishikawa, O. and Matozaki, T. (2005) Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J Immunol*, **174**, 2004-2011.
- Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D. and Lindberg, F.P. (2000) Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, **288**, 2051-2054.
- Palucka, K. and Banchereau, J. (2002) How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol*, **14**, 420-431.
- Randolph, G.J., Angeli, V. and Swartz, M.A. (2005a) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*, **5**, 617-628.
- Randolph, G.J., Sanchez-Schmitz, G. and Angeli, V. (2005b) Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol*, **26**, 273-287.
- Rebres, R.A., Kajihara, K. and Brown, E.J. (2005) Novel CD47-dependent intercellular adhesion modulates cell migration. *J Cell Physiol*.
- Sangaletti, S., Gioiosa, L., Guiducci, C., Rotta, G., Rescigno, M., Stoppacciaro, A., Chiodoni, C. and Colombo, M.P. (2005) Accelerated dendritic-cell migration and T-cell priming in SPARC-deficient mice. *J Cell Sci*, **118**, 3685-3694.
- Sano, S., Ohnishi, H. and Kubota, M. (1999) Gene structure of mouse BIT/SHPS-1. *Biochem J*, **344 Pt 3**, 667-675.
- Steinman, R.M., Hawiger, D. and Nussenzweig, M.C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **21**, 685-711.
- Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K. and Kumatori, A. (2004) Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b<sup>high</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8981-8986.

- van Beek, E.M., Cochrane, F., Barclay, A.N. and van den Berg, T.K. (2005) Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol*, **175**, 7781-7787.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D. and Shortman, K. (1998) RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity*, **9**, 839-847.
- Xu, H., Guan, H., Zu, G., Bullard, D., Hanson, J., Slater, M. and Elmetts, C.A. (2001) The role of ICAM-1 molecule in the migration of Langerhans cells in the skin and regional lymph node. *Eur J Immunol*, **31**, 3085-3093.
- Yu, X., Fukunaga, A., Nagai, H., Oniki, S., Honma, N., Ichihashi, M., Matozaki, T., Nishigori, C. and Horikawa, T. (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.
- Zen, K. and Parkos, C.A. (2003) Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 557-564.

## **6.2. Article 2 : Le CD47 contrôle la prolifération et l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>.**

Les cellules T régulatrices peuvent se développer dans le thymus ou en périphérie à partir des cellules T naïves suite aux stimulations tolérogéniques. Nous démontrons que l'expression du CD47 contrôle sélectivement l'homéostasie d'une sous-population de Tregs CD103<sup>+</sup>. Premièrement, la proportion de cellules activées/mémoires (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>) Foxp3<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> augmente rapidement au cours du vieillissement chez nos souris déficientes pour la molécule CD47 comparée aux souris sauvages du même âge, tandis que le pourcentage de cellules (CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>) Foxp3<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> reste comparable entre les deux souches de souris. Deuxièmement, l'augmentation de la prolifération observée chez les Tregs Foxp3<sup>+</sup> CD47<sup>-/-</sup> est restreinte aux cellules CD103<sup>+</sup>. Troisièmement, les Tregs CD47<sup>-/-</sup> maintiennent une activité suppressive *in vivo* comparable aux Tregs CD47<sup>+/+</sup>. Bref, à l'état de base, le CD47 inhibe la prolifération excessive des Tregs CD103<sup>+</sup> empêchant ainsi l'accumulation de ces cellules.

**CD47 controls the *in vivo* proliferation and homeostasis of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells that express CD103.**

Running Title: CD47 regulates CD103<sup>+</sup> regulatory T cell homeostasis

Vu Quang Van<sup>\*,†</sup>, Jinane Darwiche<sup>\*,†</sup>, Marianne Raymond<sup>\*</sup>, Sylvie Lesage<sup>‡</sup>, Salim Bouguermouh<sup>\*</sup>, Manuel Rubio<sup>\*</sup> and Marika Sarfati<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Immunoregulation, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Research Center, Hospital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada. This work was supported by the Canadian Institute for Health and Research (CIHR Grant, MOP-53152). Vu Quang Van and S. Bouguermouh are recipients of the Canadian Institutes for health Research/ Canada Graduate Scholarships Doctoral Award.

<sup>†</sup>Two authors are equal contributors to this work.

<sup>‡</sup>Hopital Maisonneuve-Rosemont, Centre de Recherche Guy-Bernier, 5415, boul. de l'Assomption, Montréal (Québec).

Keywords: Treg, CD103, CD47, Foxp3

Address correspondence and reprint requests to Dr. Marika Sarfati,  
Immunoregulation

Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame  
(Pavillon Mailloux, M4211K), 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L  
4M1, Canada.

## Abstract

Peripheral CD103<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) can develop both from conventional naïve T cells upon cognate Ag delivery under tolerogenic conditions and from thymic-derived, expanded/differentiated natural Tregs. We here show that CD47 expression, a marker of self on hematopoietic cells, selectively regulated CD103<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg homeostasis at the steady state. First, the proportion of effector/memory-like (CD44<sup>High</sup>CD62L<sup>Low</sup>) CD103<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs rapidly augmented with age in CD47-deficient mice (CD47<sup>-/-</sup>) as compared to age-matched control littermates. Yet, % of quiescent (CD44<sup>Low</sup>CD62L<sup>High</sup>) CD103<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup>Tregs remained stable. Second, the increased proliferation rate (BrdU incorporation) observed within the CD47<sup>-/-</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg subpopulation, was restricted to those expressing CD103. Third, CD47<sup>-/-</sup>Tregs maintained a normal suppressive function *in vitro* and *in vivo* and their increased proportion in old mice led to a decline of Ag-specific T cell responses. Thus, sustained CD47 expression throughout life is critical to avoid an excessive expansion of CD103<sup>+</sup>Tregs that may overwhelmingly inhibit Ag-specific T cell responses.

## Introduction

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>regulatory T cells (Tregs) are generated early in life in the thymus. Expression of Foxp3 is dispensable for Treg development but absolutely required for their function. Once in the periphery, Tregs play a crucial role in the control of organ-specific auto-immune diseases by inhibiting the function of undesired auto-reactive T cells that escaped central tolerance (218-220). Tregs are comprised of two subsets with distinct phenotypes and homeostasis, the quiescent (CD25<sup>+</sup>CD44<sup>Low</sup> CD62L<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup>) and cycling (CD25<sup>+</sup>CD44<sup>High</sup> CD62L<sup>Low</sup>Foxp3<sup>+</sup>) Tregs, the suppressive function of both subsets appears quite similar (221). The latter subset was identified as effector-memory-like Tregs. They accumulate in secondary lymphoid organs (SLO) of ~70 weeks old mice and thus may contribute to age-associated immune deficiency (222, 223). However, the pool size of quiescent Tregs remains stable in unmanipulated mice throughout lifetime. The capacity of CD62L<sup>High</sup> Tregs to enter the lymph nodes (LN) through HEV suggests that they mainly act in SLO to inhibit the activation and proliferation of naïve T cells. Notably, suppression of T-cell mediated colitis by Tregs in lymphopenic mice occurs mainly in draining mesenteric LN (224). On the other hand, Tregs also express receptors for inflammatory chemokines (CCR4, CCR9 and CXCR3), integrins ( $\alpha$ 4 $\beta$ 7) and tissue homing receptors like CD103 (219, 225). Indeed, it was demonstrated that CD103<sup>+</sup>Tregs are attracted and retained in inflamed tissues where they may exert their suppressive function (226, 227). Microarray analysis revealed that functional



compartmentalization of Tregs is linked to the expression of different phenotype with Tregs found in tissues expressing CD103, IL-10, IL-2-R and CCR5 (227). Nowadays, the peripheral origin of Tregs is well established. The adaptive Tregs appear to be involved in the downregulation of the immune response to both self and non-self antigens such as microbes, tumor antigens and alloantigens (228). TGF- $\beta$  in the presence of low dose of Ag induces the peripheral conversion of naïve CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells into *bona fide* Tregs expressing both Foxp3 and CD103 (123, 229). In fact, TGF- $\beta$  directly controls the expression of Foxp3, the maintenance of peripheral Tregs, their activation and proliferation status as well as their suppressive function (230).

CD47 is a marker of self that is ubiquitously expressed and thus exerts pleiotropic effects, notably in the immune system (63, 173, 231). CD47 ligation on human cord blood mononuclear cells induces naïve T cell anergy and promotes the generation of peripheral CD103<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregs that are suppressive (232, 233). We here sought to evaluate the *in vivo* impact of CD47 deficiency on peripheral Tregs homeostasis, activation status and ability to proliferate under steady state conditions. We found that CD47 negatively regulated the *in vivo* proliferation and expansion of the Foxp3<sup>+</sup>Treg cell subset that expresses CD103 under steady state conditions without compromising their suppressive functions. As such, we propose that sustained CD47 expression participates in CD103<sup>+</sup>Treg homeostasis throughout adult life until senescence.

## **Materials and Methods**

### **Mice**

BALB/c CD47-deficient (CD47<sup>-/-</sup>) mice were obtained from Dr. P.A. Oldenborg. BALB/c and DO11.10 mice were purchased from Charles River and Jackson Labs, respectively. DO11.10 CD47-deficient mice (CD47<sup>-/-</sup> Tg) were generated by backcrossing DO11.10 into BALB/c CD47<sup>-/-</sup> mice. All mice are maintained under SPF conditions at the CHUM Research Center. 8 to 52 weeks old mice were used in all experimental protocols as approved by the Canadian Council on Animal Care.

### **Cell preparation and flow cytometry.**

Single cell suspensions were harvested from different organs as described (63, 225). For cell surface staining, cells were incubated with FITC-, PE-, PERCP- and APC-labeled appropriate Abs–CD4 (RM4-5), CD25(PC61.5.3 or 7D4), CD62L(MEL-14), CD44(IM7.8.1), CD103(M290) or KJ1.26 clonotypic mAb– on ice for 30 min. Intracellular staining, anti-Foxp3 or anti-CTLA-4(UC10-4F10-11) mAbs was performed as described (233). All antibodies were purchased from BD bioscience, excepted for anti-Foxp3 from eBioscience and KJ1.26 from Caltag Laboratories.

### **Evaluation of cell cycling by BrDU incorporation**

2mg per mouse of BrDU (Sigma) was injected intraperitoneally and added to the drinking water (0.8mg/ml). 7 days later, spleens and LN, were harvested and stained for different regulatory T cell subsets, the cells were then fixed, permeabilized (BD Cytofix/cytoperm) and treated with DNase I (Sigma) for one hour at 37°C before staining with anti-BrDU-FITC (BD bioscience).

### ***In vitro* and *in vivo* assays.**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (effector) cells were purified by negative selection followed by positive selection from spleens of CD47<sup>+/+</sup> or from CD47<sup>-/-</sup> by using the EasySep kit (Stem cells). For APC, T cell- depleted splenocytes from CD47<sup>+/+</sup> were treated with mitomycin C (30 ug/ml), at 37°C for 30 min.

For the *in vitro* assay, effector cell (50X10<sup>3</sup>) were co cultured in 96 well flat-bottom plates with decreasing numbers of Treg in presence of APC (50X10<sup>3</sup>) and 1µg/ml of anti-CD3 (145-2C11 BD) in RPMI supplemented with 10% FCS. <sup>3</sup>H Thymidine incorporation was measured after 72h. In some experiments, effector cells were labelled with CFSE (invitrogen) and 72h later, CFSE dilution was evaluated by flow cytometry.

For the *in vivo* assays, 0.5X10<sup>6</sup> CFSE labelled effector cells isolated from DO11.10 mice were co-injected with 1X10<sup>6</sup> Treg isolated from CD47<sup>+/+</sup> or CD47<sup>-/-</sup> Tg 24h prior to s.c. administration of 10ug of OVA peptide (323-339, CEDARLANE). After 3 days, cell division was assessed by CFSE dilution in draining LN. In some experiments, mice were treated or not with CD25 mAb (P61) for 3 days prior adoptive transfer of 1X10<sup>6</sup> CD47<sup>+/+</sup>Tg and i.v. immunization with OVA peptide. Recovery of KJ1-26<sup>+</sup>Tg cells was evaluated in the spleen after 7 days.

### **Auto-antibody**

Sera from over 50 weeks old mice were assessed for anti-DNA auto-antibodies by ELISA kit from Alpha Diagnostic International.

### **Statistical Analysis.**

Student's T test. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

## Results and discussion

### 1. CD47 negatively regulates activated CD103<sup>+</sup> Treg cell homeostasis.

Because of thymic involution at puberty, it appears unlikely, especially in humans, that long-lived thymic emigrants would be sufficient to maintain the pool of functional Tregs during aging. Compared to young individuals (< 35 years old), old individuals have an increased number of CD45RO<sup>+</sup>Tregs and decreased numbers of naïve CD45RA<sup>+</sup>Tregs (234). At least two mechanisms have been proposed to explain the maintenance of CD45RO<sup>+</sup>Tregs throughout life. First, Tregs in adults might originate from the thymic-derived Tregs that are continuously proliferating to replenish the pool of peripheral Tregs. Hence, activated CD45RO<sup>+</sup> Tregs that maintain their regulatory function *in vitro* have been described in the mouse and humans (221, 235). Second, TGF- $\beta$  or low Ag exposure induces peripheral Treg conversion from naïve or rapidly proliferating memory CD4<sup>+</sup>T cells (123, 229). CD47 ligation promotes Treg generation, albeit via a TGF- $\beta$ -independent pathway (233). Here, we first evaluated the proportion and accumulation of Tregs in non-manipulated CD47<sup>-/-</sup> mice. The analysis of the thymus, spleen and lymph nodes (LN) of young mice (< 10 weeks old) did not reveal any differences in the frequency of CD25<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup>T cells, indicating a normal Treg development in the absence of CD47 (Fig 1A and not shown). However, we noticed a gradual and significant increase during aging in the percentage of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the SLO of CD47<sup>-/-</sup> mice as compared to aged-matched control littermates (Fig1A). More specifically, CD47 deficiency led to drastic augmentation in the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells with an activated (CD44<sup>High</sup>) phenotype (Fig1B).

Rather, the % of resting ( $CD44^{Low}$ )  $CD4^+ CD25^+T$  cells remained comparable and stable ( $\approx 10\%$ ) in both strains of mice until senescence. We next examined the nature of the two  $CD25^+CD4^+T$  cell subsets and showed that the majority of them expressed Foxp3 ( $\approx 90\%$ ) with similar intensity (Fig 2A). These data demonstrated that  $CD4^+CD25^+$  T cells indeed belonged to Treg subtypes that included quiescent and effector/memory-like activated Tregs. Note that the two strains of mice displayed a comparable proportion ( $\sim 3\%$ ) of Foxp3 $^+CD25^-$  and Foxp3 $^-CD25^+CD4^+T$  cells (Fig2A, right panel). A more detailed phenotypic analysis of the activated T cell subset revealed a selective augmentation in the frequency of Foxp3 $^+T$  cells that expressed CD103 (from  $\sim 5$  to  $15\%$ ) in the spleens and LN of  $CD47^{-/-}$  mice (Fig 2B, left panel). In contrast, the proportion of CD103 $^-$  Foxp3 $^+$ Tregs remained quite stable.  $CD47$  deficiency resulted in a similar increase in the % of activated Treg co-expressing Foxp3 $^+/CD103^+$ , ICOS $^+/CD103^+$  and CTLA-4 $^+/CD103^+$  (not shown).

The  $CD103^+Foxp3^+CD4^+T$  cell subpopulation has the particularity to be retained in inflamed tissues, where they are likely to exert their suppressive function to control inflammatory or pathogen-specific T cell responses (225-227, 236). CCR4 and CCR7 control  $CD103^+$ Treg migration into inflamed tissues (225, 237). However,  $CD103^+$ Treg cell compartment is enriched in skin and lung tissues even in the absence of any inflammatory response (225). Here, we found an increased % of Foxp3 $^+$ Tregs that expressed CD103 in  $CD47^{-/-}$  lung tissues at steady state (Fig 2B, right panel). In contrast to  $CD47^{-/-}$  tissues, Treg cell accumulation is impaired in  $CCR4^{-/-}$  tissues at steady state.

Taken together, our results demonstrate that under steady state conditions, CD47 ablation leads to a gradual and selective augmentation, during ageing, in the proportion of activated Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells that express CD103.

## **2. CD47 inhibits the proliferation and accumulation of CD4<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>Tregs in vivo.**

We next showed that the % of cycling CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs that incorporated BrdU was increased in CD47<sup>-/-</sup> mice (Fig 3A). This largely reflected the augmented proliferation of CD44<sup>High</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells (Fig 3B) and more specifically that of CD103<sup>+</sup>Treg cells (Fig 3C and D) that significantly accumulated in CD47<sup>-/-</sup>LN (Fig 3E). Studies that analyzed the T cell receptor excision circle (TREC) content reveal that CD103<sup>+</sup>, as opposed to CD103<sup>-</sup>Tregs, undergo excessive cell proliferation, corroborating with our present findings (236). Although the % of BrdU<sup>+</sup>Tregs lacking CD103 remained constant (~12%) (Fig 3C), their absolute number was decreased. This may be linked to the significant reduction in the CD4<sup>+</sup>T cell compartment seen in old CD47<sup>-/-</sup>mice (Fig 3E). Of interest, CD47 expressed by T cells or as part of the environment controls T cell death. CD47 mediates caspase-independent necrosis-like cell death on T and B cells (200) and murine activated T cells lacking CD47 appear more resistant to Fas-mediated apoptosis (238). We did not find any evidence for dysregulated Treg cell apoptosis in CD47<sup>-/-</sup> mice at steady state (not shown).

The mechanisms that regulate the selective expansion of activated CD25<sup>+</sup>Tregs expressing CD103 in CD47<sup>-/-</sup> SLO and tissues at steady state are yet to be elucidated.

It was hypothesized that CD103<sup>+</sup>Treg cells may expand in response to antigenic stimulation (for instance to commensal flora at steady state)(221). CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>DCs and TGF-β are critically involved in the conversion to adaptive Treg cells that express CD103, especially in the intestine and mesenteric LN (15). However, the proportion of the CD103<sup>+</sup>DC was unaltered in the mesenteric LN of CD47<sup>-/-</sup> mice (data not shown). Furthermore, our unpublished observations indicate no difference in basal TGF-β expression in the spleen, nor in the TGF-β production by Tregs in the two strains of mice.

TGF-β inhibits Treg proliferation and at the same time is required for the survival of peripheral Treg cells (230). In contrast to CD47<sup>-/-</sup> mice, lack of TGF-β signaling in T cells increases the absolute number of CD4<sup>+</sup>T cells in the spleen and LN that leads to a heavy cellular infiltration in multiple tissues and loss of B cell tolerance, as shown by high amounts of anti-DNA auto-antibodies (230). We noticed a significant increase in the serum production of anti-DNA auto-antibodies in > 50 weeks old CD47<sup>-/-</sup> mice as compared to age-matched related BALB/c mice (Fig 3F). In spite of increased frequency of Ag-experienced effectors T cells after 28 weeks in LN (Fig2A), we did not observe any cellular infiltration in liver, lung, pancreas or kidney in old CD47<sup>-/-</sup> mice (data not shown).

### **3. CD47-deficient Treg are functional *in vitro* and *in vivo*.**

CD47 is considered as a marker of self on immune and non-immune cells, preventing their clearance by macrophages through the delivery of a negative signal via SIRP-

$\alpha$  (204). This precludes the *in vivo* studies of Treg function in the form of an adoptive transfer of Treg lacking or not CD47 together with pathogenic T cells into naïve BALB/c/scid mice. Therefore, we first evaluated Treg function *in vitro*. When co-cultured with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells, CD47<sup>-/-</sup>Tregs suppressed as well as CD47<sup>+/+</sup>Tregs the *in vitro* proliferation of effector cells expressing or not CD47 (Fig 4A). We next examined the ability of CD47<sup>-/-</sup>Tregs to inhibit Ag-specific naïve T cell activation *in vitro* and *in vivo* in CD47-deficient hosts. CD47<sup>-/-</sup> and CD47<sup>+/+</sup> Tregs from DO11.10 TCR transgenic (Tg) mice abrogated *in vitro* proliferation of CFSE labeled effector Tg T cells (Fig.4B). Next, CFSE-labeled Tg T cells were adoptively transferred alone or together with CD47<sup>-/-</sup> or CD47<sup>+/+</sup> Treg Tg into CD47<sup>-/-</sup> recipients, one day prior to s.c. immunization with OVA peptide in the absence of adjuvant. The results depicted in Fig 4C demonstrate that CD47<sup>-/-</sup>Tg Tregs remained functional *in vivo* as they strongly impaired naïve T cell proliferation in response to soluble Ag. Finally, we examined the possible *in vivo* biological consequence of an altered proportion of functional Treg in the spleen of old CD47<sup>-/-</sup> mice. We found a significant decline in Ag-specific T cell responses in CD47<sup>-/-</sup> hosts that was restored in mice pre-treated with CD25 mAb, a process known to deplete/ inactivate Tregs (Fig 4D).

We thus conclude that Tregs lacking CD47 are functional *in vivo* in SLO of aged mice, corroborating with their sustained level of Foxp3 (Fig 2A), the expression of which is required to maintain Treg function (218).

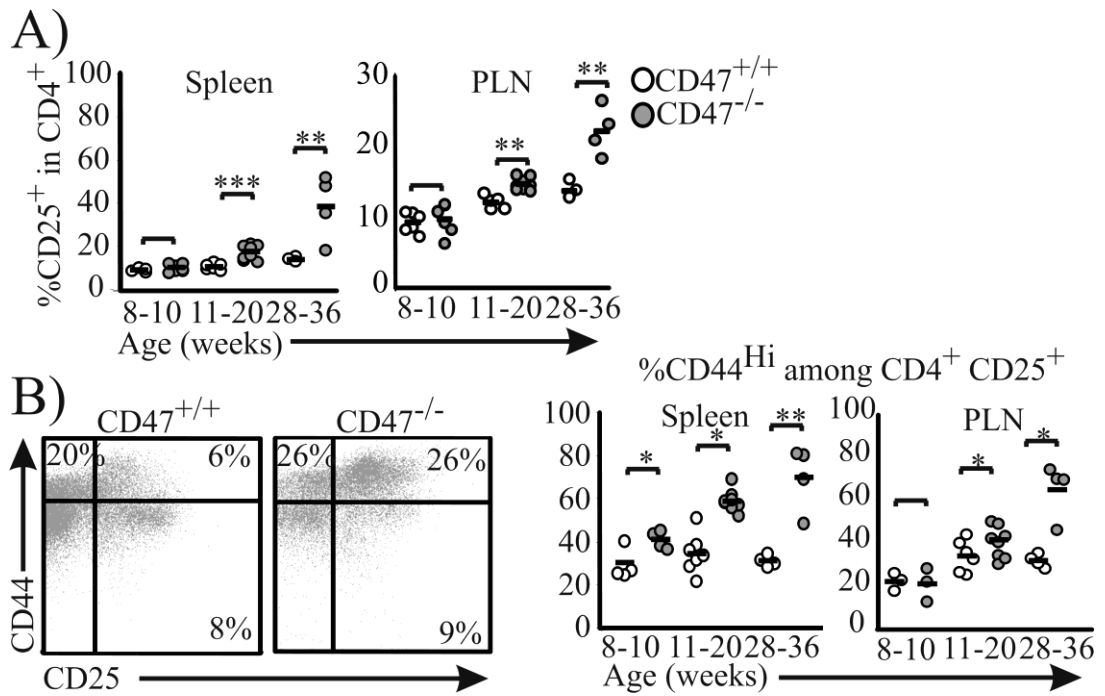


#### 4. Concluding remarks

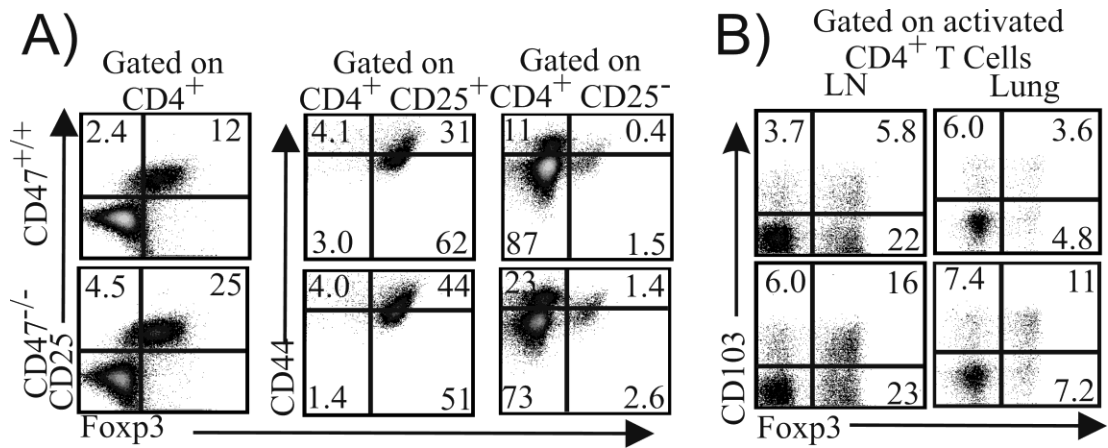
A tight regulation of number and function of Foxp3<sup>+</sup>Tregs is crucial throughout life to avoid the development of fatal autoimmune disorders. On the contrary, excessive Treg numbers may dampen immune responses and thus be deleterious to the host. Two consequences of Treg expansion are enhanced tumor emergence and pathogen survival. Hence, in some cases, pathogen persistence is beneficial, because it is mandatory to the establishment of long-term protective immunity (228). We here show that maintenance of CD47 expression throughout life negatively controls the turnover and expansion of a particular subpopulation of activated Foxp3<sup>+</sup>Tregs that express CD103. We thus predict that sustained CD47 expression will endow the host with the capacity to prevent an excessive accumulation of Tregs that may overwhelmingly inhibit pathogen or tumor-specific CTL responses. By contrast, lowering CD47 expression may be beneficial to control organ-specific autoimmunity since it leads to increase proliferation and accumulation of functional CD103<sup>+</sup> Treg cells. When enforced in a cell-type specific manner, decreased CD47 expression will result in cell elimination. This is best illustrated in non immune red blood cells expressing low (senescent) or no CD47 (Rh null) that are readily cleared from the circulation, the consequence of which may be the development of auto-immune hemolytic anemia (204).

Taken together, we propose that sustained CD47 expression is required throughout the adult life until senescence to maintain peripheral CD103<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg homeostasis, albeit dispensable for their function.

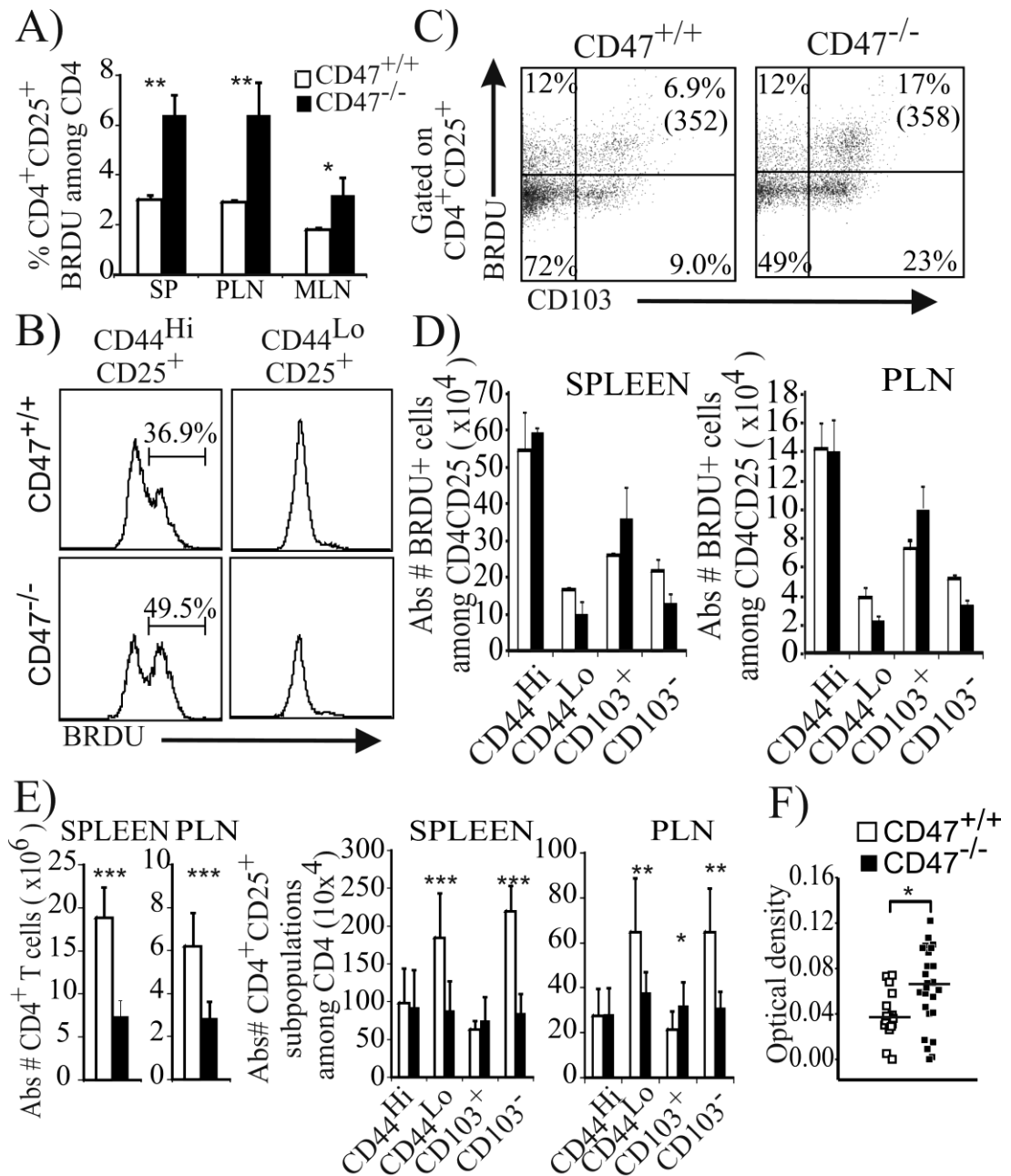
**Fig.1: Increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> (effector/memory like-cells) T cells with aging in CD47-deficient mice.** LN and spleens were harvested from mice at different age and labelled for CD4, CD25 and CD44 expression. (A) Proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and (B) CD44<sup>Hi</sup> among CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> at different age. Each circle represents one mouse. \*P<0.05, \*\*P<0.01. FACS plot shows spleens of 36 weeks old mice.



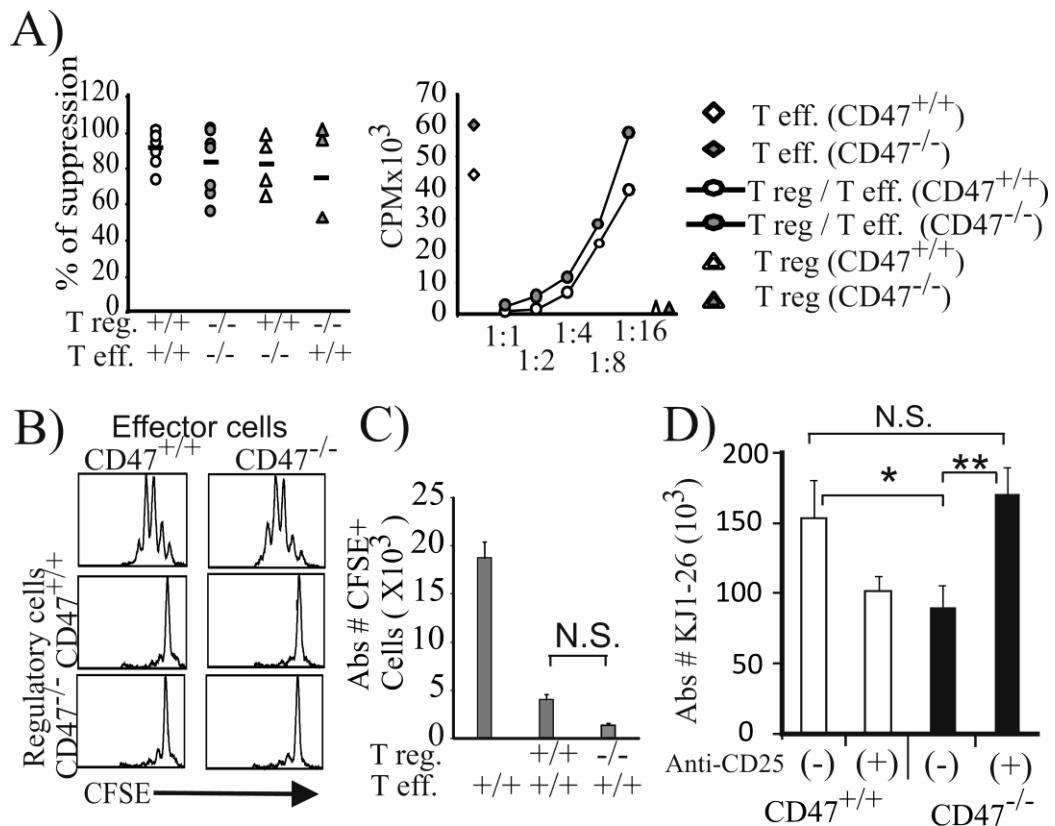
**Fig.2: The proportion of activated Foxp3<sup>+</sup> Tregs that express CD103 is increased in CD47-deficient mice.** (A) Shown are the % Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells and the proportion of Foxp3<sup>+</sup> cells among CD44<sup>high</sup> and CD44<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in spleens of over 36 weeks-old mice. (B) Frequency of CD103<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> among activated (CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup>) T cells in LN and lungs. The data represent at least 4 mice per group in two independent experiments.



**Fig.3: Increased proliferation and accumulation of activated CD103<sup>+</sup> Tregs in CD47-deficient mice.** Proportion (A-C) and absolute number (D-E) of BrDU-positive among different Treg subpopulations in SLO of old mice treated (A-D) and non-treated (E) with BrDU for 7 days. Data represents at least 5 mice per group. (F) Anti-DNA autoantibody in serum of over 50 weeks old mice.



**Fig.4: Regulatory function of CD47<sup>-/-</sup> Tregs *in vitro* and *in vivo*.** (A) naive CD47<sup>+/+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (effector cells) T cells were cultured alone or with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs) expressing or not CD47 at 1:1 or different Treg/Teff ratio and stimulated with 1ug/ml of anti-CD3 in presence of APC. Cell proliferation was evaluated after 72h. (B) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>KJ1-26<sup>+</sup> cells were CFSE-labelled prior *in vitro* coculture as in (A) Data shows CFSE<sup>+</sup> cell division (one representative experiment out of three). (C) CD47<sup>-/-</sup> mice were injected i.v. with CFSE<sup>+</sup>KJ1-26<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> cells alone or together with Tregs 24h prior s.c. injection of OVA peptide. Recovery of CFSE<sup>+</sup> cells in draining lymph nodes is shown after 3 days. (D) Naïve mice were treated or not with CD25 mAb prior adoptive transfer of Tg T cells and i.v. immunization with OVA peptide Recovery of KJ1-26<sup>+</sup> cells in spleen is shown after 7 days. Data are presented as means ± SD of 3 mice per group (C) and ±SEM of 6 mice per group (D).



## REFERENCES

1. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
2. Campbell, D. J., and S. F. Ziegler. 2007. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature reviews* 7:305-310.
3. Kim, J. M., J. P. Rasmussen, and A. Y. Rudensky. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology* 8:191-197.
4. Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B. L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the steady state. *The Journal of experimental medicine* 198:737-746.
5. Nishioka, T., J. Shimizu, R. Iida, S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 2006. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells in aged mice. *J Immunol* 176:6586-6593.
6. Sharma, S., A. L. Dominguez, and J. Lustgarten. 2006. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *J Immunol* 177:8348-8355.

7. Denning, T. L., G. Kim, and M. Kronenberg. 2005. Cutting edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis. *J Immunol* 174:7487-7491.
8. Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowicz, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, and D. J. Campbell. 2007. Altering the distribution of Foxp3<sup>(+)</sup> regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine* 204:1335-1347.
9. Suffia, I., S. K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 174:5444-5455.
10. Chen, Z., A. E. Herman, M. Matos, D. Mathis, and C. Benoist. 2005. Where CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 202:1387-1397.
11. Belkaid, Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature reviews* 7:875-888.
12. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature immunology* 6:1219-1227.
13. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198:1875-1886.

14. Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
15. 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.
16. 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.
17. Brown, E. J., and W. A. Frazier. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11:130-135.
18. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *J Immunol* 167:2459-2468.
19. Grimbert, P., S. Bouguermouh, N. Baba, T. Nakajima, Z. Allakhverdi, D. Braun, H. Saito, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2006. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells



- from human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells in response to inflammation. *J Immunol* 177:3534-3541.
20. Valmori, D., A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Hesdorffer, and M. Ayyoub. 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *The Journal of clinical investigation* 115:1953-1962.
  21. Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan, and A. N. Akbar. 2006. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *The Journal of clinical investigation* 116:2423-2433.
  22. Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C. A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 199:303-313.
  23. Schneider, M. A., J. G. Meingassner, M. Lipp, H. D. Moore, and A. Rot. 2007. CCR7 is required for the in vivo function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 204:735-745.
  24. 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.

25. Manna, P. P., J. Dimitry, P. A. Oldenborg, and W. A. Frazier. 2005. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 280:29637-29644.
26. Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* 204:1775-1785.
27. Yamazaki, S., A. J. Bonito, R. Spisek, M. Dhodapkar, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2007. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* 110:4293-4302.
28. 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.

## **7. Discussion**

### **7.1. L'importance de l'étude de DCs et des Tregs.**

Les DCs sont capables d'initier des réponses adaptatives extrêmement diversifiées aux antigènes qu'elles rencontrent. Elles établissent un pont entre le système immunitaire inné et adaptatif. Sans elles, il nous serait impossible d'éliminer certains pathogènes, et même si notre système immunitaire inné semble très efficace, nous développerions des infections chroniques aux mêmes pathogènes, d'où l'importance de bien comprendre les propriétés immunogéniques et tolérogéniques des DCs. Jusqu'à aujourd'hui, la plupart des succès thérapeutiques en immunologie clinique sont basés sur l'utilisation d'anticorps fabriqués par des cellules B, et l'immunité médiée par les lymphocytes T n'est utilisée que dans des thérapies expérimentales où les traitements conventionnels ont échoué. Pourtant, les DCs interagissent avec un répertoire de cellules T constitué de millions de lymphocytes différents. Ce répertoire peut représenter «une librairie de médicaments» virtuellement infinie pour développer une thérapie spécifique. Les DCs gouvernent l'expansion clonale des lymphocytes T en augmentant jusqu'à mille fois leur nombre initial, suite aux divisions cellulaires de 2 à 3 cycles par jour (239). Éduqués par des DCs, ces clones de lymphocytes T peuvent sécréter soit de l'IFN- $\gamma$  qui active les macrophages pour résister aux infections provoquées par les microbes intracellulaires (Th1) (240), soit de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Th2) qui mobilisent des cellules du système immunitaire inné permettant de résister aux parasites extracellulaires (241), soit de l'IL-17 (Th17) pour recruter les neutrophiles qui luttent contre les bactéries extracellulaires (242). L'envers de la médaille est que les DCs peuvent induire les

cellules ayant des propriétés suppressives comme les Tregs. Finalement, sous l'influence des DCs, quelques clones de cellules T génèrent des lymphocytes T mémoires capables de monter une réponse rapide lorsqu'ils sont réexposés aux mêmes antigènes (243, 244). Nous avons décrit dans l'introduction les propriétés biologiques des DCs (le développement, l'activation et le recrutement) et leurs rôles relatifs dans le système immunitaire. Notre travail a identifié le CD47 comme étant une molécule qui gouverne la migration d'une sous-population de DCs myéloïdes Sirp- $\alpha^+$  et qui contrôle l'expansion et l'homéostasie des Tregs. La régulation croisée est entre les DCs et les Tregs ainsi que les implications cliniques de la compréhension des mécanismes qui gouvernent les fonctions de ces deux types cellulaires seront discutées. Dans ce chapitre, nous présenterons le rôle des DCs et des Tregs dans divers domaines tels que les maladies auto-immunes et les inflammations chroniques, les allergies, les maladies infectieuses, le cancer et la transplantation d'organe. Nous discuterons de la façon dont la manipulation des DCs et des Tregs à travers l'interaction CD47/Sirp- $\alpha$  pourrait influencer l'évolution de ces pathologies, ainsi que les stratégies de vaccination.

## **7.2. Rôle des DCs dans l'immunopathologie**

### **7.2.1. Rôle des DCs dans les maladies auto-immunes et maladies inflammatoires chroniques**

La réponse inflammatoire est le prix à payer pour contrôler les maladies infectieuses. Cependant, cette réponse inflammatoire peut être inappropriée et entraîner le développement de maladies auto-immunes ou inflammatoires

chroniques. Les DCs portant les antigènes de soi activent les lymphocytes T auto-réactifs et induisent la maladie dans des modèles expérimentaux murins tels que la sclérose en plaque (SEP), la cardiomyopathie auto-immune et le lupus érythémateux disséminé (LED). Manipuler les fonctions des DCs telles que l'activation, la migration et l'aptitude à stimuler des cellules T est un traitement potentiel pour ces pathologies. Nous proposons d'utiliser l'axe CD47/Sirp- $\alpha$  comme cible pour manipuler la migration des DC myéloïdes Sirp- $\alpha^+$  des tissus périphériques vers les ganglions drainants. De même, une production excessive de cytokines proinflammatoires par des DCs contribue également à la pathogenèse de la maladie. Par exemple, l'interféron de type I, dont les pDCs sont une source majeure, est responsable du développement de plusieurs maladies auto-immunes. Dans le LED, la polymyosite, et la sclérose en plaques, des complexes immuns composés d'ADN ou d'ARN et d'auto-anticorps activent les pDCs via les TLRs pour induire la production d'IFN- $\alpha$  (245). Les patients qui sont atteints de LED présentent une photosensibilité. La lumière UV induit l'apoptose et la nécrose des kératinocytes qui sont une source d'auto-antigènes. Ces derniers forment les complexes immuns qui provoquent la production d'IFN de type I, lequel favorise la différenciation des monocytes en DCs myéloïdes pathogéniques capables d'activer des lymphocytes T et B autoréactifs. Les essais cliniques en phase I utilisant l'anticorps neutralisant contre l'IFN- $\alpha$  améliorent les symptômes de plusieurs patients (246, 247). Dans le psoriasis, les DCs inflammatoires Sirp- $\alpha^+$  recrutées sécrètent du TNF- $\alpha$ , de l'IL-23 et expriment de l'iNOS (nitric oxide synthase) qui sont des éléments cruciaux dans la pathogenèse de la maladie. Bloquer le TNF- $\alpha$ , molécule sécrétée, représente donc une stratégie

thérapeutique intéressante pour plusieurs patients (248, 249). Outre manipuler le TNF- $\alpha$ , inhiber la différenciation, l'activation et la migration de ces DCs inflammatoires pourrait être tout aussi attrayant pour traiter ces patients. Cette thérapie pourrait être réalisée en ciblant encore une fois l'axe CD47/Sirps- $\alpha$  qui constitue le fondement de mes travaux.

Notre laboratoire a examiné dans un modèle animal le rôle des DCs dans le développement de la colite induite par l'administration intra-rectale de TNBS (Trinitrobenzene sulfonic acid). Cette maladie expérimentale partage plusieurs caractéristiques avec la maladie de Crohn chez l'humain. Cette maladie chronique résulte de l'inflammation du tractus gastro-intestinale causée par une réponse immunitaire inappropriée contre la flore intestinale. Le dysfonctionnement des DCs est impliqué dans l'induction de la maladie (250). L'administration de TNBS induit une inflammation aiguë caractérisée par le recrutement de neutrophiles et de macrophages, suivie par l'activation de lymphocytes T spécifiques de l'antigène par des DCs myéloïdes. Une deuxième exposition au TNBS provoque une réponse immunitaire majoritairement de lymphocytes T éduqués par des DCs. Cette réaction est associée à des dommages tissulaires qui miment l'inflammation chronique dans la maladie de Crohn (251). Dans ce modèle de colite expérimentale au TNBS, nous avons démontré qu'une sous-population de DCs (CD103<sup>-</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>) était responsable de la pathogenèse de la maladie (17). Le recrutement de ces cellules pathogéniques dans la lamina propria et dans les ganglions mésentériques dépend de l'expression de CD47 sur les DCs. Ma contribution spécifique à cette étude était de démontrer que le

CD47 contrôle la migration des DC myéloïdes vers les ganglions mésentériques lorsqu'injectées par la voie intrapéritonéale (Fig. 19, Annexes).

De manière comparable, une réponse « anormale » des DCs à l'environnement muqueux favorise le développement de l'inflammation impliquant la production des cytokines de type Th2 telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 qui sont responsables des maladies respiratoires et intestinales. Les DCs initient la formation de cellules pro-allergiques ou amplifient les symptômes allergiques si la souris est déjà atteinte par la maladie (252, 253). Il y a de plus en plus d'évidences qui indiquent que ce sont les cellules épithéliales et non des DCs qui déclenchent la réponse allergique. La TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) sécrétée par des cellules épithéliales en réponse à un signal donné par des allergènes active et provoque l'expression d'OX40L chez des DCs qui attirent des cellules Th2 mémoires et induisent la différenciation et développement et des lymphocytes T naïfs en cellules inflammatoires Th2 effectrices produisant une grande quantité de TNF- $\alpha$ . La TSLP induit des DCs à produire plusieurs chémokines et cytokines telles que les TARC (T-helper type 2 attracting chemokine), l'éotaxin-2 et l'IL-8 qui attirent des cellules T mémoires Th2, des éosinophiles et des neutrophiles respectivement, contribuant ainsi à l'inflammation. En plus, la TSLP, l'IL-25 et l'IL-33 produites par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires innées, amplifient le processus d'inflammation provoquant le cortège de symptômes associés à la bronchoconstriction observée dans l'asthme expérimental (91, 254). Chez la souris, l'asthme est caractérisé par un niveau élevé d'IgE dans le sérum et une production de cytokines pro-inflammatoire de type 2 dans les tissus bronchiques et les ganglions

médiastinaux. Les DCs sont connues pour jouer un rôle central dans l'induction et la perpétuation de l'inflammation des voies respiratoires (255, 256). De nombreux laboratoires, incluant le notre, ont utilisé des modèles expérimentaux pour comprendre le mécanisme de cette inflammation chronique. Nous avons obtenu des résultats comparables à ceux mis en évidence dans le modèle de colite, et nous avons identifié les DCs CD103<sup>-</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> comme étant des cellules pathogéniques (21). Le CD47 contrôle positivement la migration des DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> et favorise ainsi l'inflammation de type 2 dans les voies respiratoires.

Bref, ces études convergent vers un point commun : les DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> causent des réponses inflammatoires exubérantes et indésirables, et favorisent le développement des maladies inflammatoires chroniques et allergiques telles que la colite ou l'asthme expérimental. Cibler ces cellules serait une stratégie intéressante pour des traitements futurs. Effectivement, nous avons interféré avec la fonction migratoire des DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> en utilisant le CD47-Fc et Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>-Fc et nous avons ainsi amélioré les symptômes cliniques de la colite et de l'asthme expérimental respectivement (17, 21).

### **7.2.2. Le rôle des DCs dans les maladies infectieuses**

Nous savons maintenant que les DCs sont impliquées dans toute réponse immunitaire adaptative contre les pathogènes. Est-il possible de manipuler les propriétés immunogéniques des DCs pour combattre et prévenir des maladies



infectieuses? De nombreuses études ont été consacrées à trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques et de vaccination en utilisant les propriétés immunogéniques des DCs. Une des techniques envisagée est de livrer l'antigène directement aux DCs en présence de stimuli nécessaires pour provoquer leur maturation et leur migration. Trumfheller et al. ont immunisé des souris avec l'anticorps contre le récepteur DEC205, exprimé sur les DCs CD8<sup>+</sup>. Cet anticorps anti-DEC205 couplé aux peptides de VIH gag (anti-DEC205-gag) est administré aux souris avec de l'adjuvant, Poly-IC (TLR3) et de l'anticorps anti-CD40. Comparé à la vaccination avec le plasmide d'ADN codant le peptide gag ou l'adénovirus recombinant, l'anticorps anti-DEC205 génère davantage de cellules T CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$ , et protège contre l'infection aux virus recombinants vaccinia-gag (244). Cette méthode génère des cellules T mémoires. D'autres groupes ont utilisé l'ADN codant pour l'anti-DEC205-gag intégré dans un vaccin d'ADN avec succès (257, 258). Donc, stimuler directement des DCs *in vivo* en manipulant leurs propriétés (activation, migration et présentation d'antigène) semble être efficace pour lutter contre les maladies infectieuses.

Les DCs CD8<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup> sont spécialisées dans la présentation d'antigène aux lymphocytes CD8<sup>+</sup>, tandis que les DCs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> se perfectionnent dans l'art d'activer les cellules T CD4<sup>+</sup> qui deviendront des effecteurs Th1, Th2 et Th17 puissants permettant d'éliminer des bactéries intracellulaires et extracellulaires. Nous savons pertinemment que la génération de CTL efficaces requiert une aide des lymphocytes CD4<sup>+</sup> ainsi qu'une collaboration entre les sous-populations de DCs. Dans une thérapie contre VIH, il serait intéressant de cibler les DCs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Sirp-

$\alpha^+$ , en présence d'adjuvant, en utilisant l'anticorps anti-DCIR-2-gag en combinaison avec l'anti-DEC205-gag. Cette combinaison permettrait de convertir des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs en cellules effectrices capables d'induire de puissants CTL.

### 7.2.3. Le rôle des DCs dans la transplantation

Les DCs jouent également un rôle crucial dans la transplantation d'organes solides et de cellules hématopoïétiques. Les DCs qui se trouvent initialement dans le greffon migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur et activent les cellules T allo-réactives, ce qui entraîne le rejet du greffon. Les DCs du receveur peuvent également capter des antigènes du greffon et induire le rejet de l'organe (131, 259). Plusieurs méthodes sont envisagées soit pour altérer les fonctions des DCs, soit pour induire des DCs tolérogéniques (260). Dans ces expériences, les auteurs manipulent des DCs différenciées *in vitro* provenant de la moelle osseuse (BM-DC) qui expriment toutes le Sirp- $\alpha$  (21). Notamment, l'injection de DCs à l'état semi-mature dans des souris avant l'allogreffe de la peau prolonge la survie du greffon. Le mécanisme impliqué serait l'induction des Tregs (261). La fonction des DCs immunogéniques peut être modifiée en les incubant en présence d'IL-10. Cette technique permet de générer des DCs ayant un phénotype particulier, CMH-II<sup>lo</sup>, CD80/86<sup>lo</sup>, PD-L1<sup>hi</sup> (Programed Death Ligand-1) et PD-L2<sup>hi</sup> (Programed Death Ligand-2) capables d'induire des Tr1. L'injection de ce type de DCs permet également de prolonger la survie d'une allogreffe de la peau (262, 263). Alors, il est envisageable de cibler thérapeutiquement l'axe CD47/Sirp- $\alpha$  avec la molécule

CD47-Fc pour favoriser la prise du greffon. Nous présentons deux possibilités : soit inhiber la migration des DCs Sirp- $\alpha^+$  qui captent et présentent des antigènes allogéniques provenant du greffon et empêcher ainsi le rejet, ou alors inhiber la phagocytose des cellules allogéniques et favoriser la prise de greffe de la moelle. En effet, Takenaka K et al. ont déjà démontré que l'interaction entre le CD47 et le Sirps- $\alpha$  semble important dans la prise de la greffe des cellules hématopoïétiques (209).

#### **7.2.4. Le rôle des DCs dans le cancer**

Les DCs se retrouvent dans les sites tumoraux chez des patients atteints de cancer. Les tumeurs modifient le fonctionnement des DCs pour échapper à l'immunosurveillance (264). Ghiringhelli et al. ont montré que les DCs exposées aux cellules tumorales du colon ou mélanomes acquièrent la capacité d'induire des Tregs Foxp3 $^+$  qui s'accumulent aux sites tumoraux (265). Ces Tregs suppriment les CTL (Cytotoxic T lymphocytes) et les NKs, empêchant ainsi l'élimination de la tumeur. Dans le cancer du sein, les DCs myéloïdes induisent les cellules CD4 $^+$  à produire de l'IL-13 responsable du développement précoce de la tumeur (266).

Pourquoi se propose-t-on donc d'utiliser les DCs comme thérapie anticancéreuse? Premièrement, les antigènes tumoraux deviennent immunogéniques lorsqu'ils sont présentés adéquatement par des DCs activées. Deuxièmement les DCs activent ou augmentent le nombre de plusieurs effecteurs, telles que les cellules NK, NKT,  $\gamma\delta$  T et  $\alpha\beta$  T. Une des caveat de cette thérapie est de maintenir les

propriétés anti-tumorales des DCs manipulées *ex vivo* une fois réinjectées aux patients.

L'immunothérapie anti-cancéreuse consiste à charger les antigènes tumoraux sur des DCs générées *ex vivo* qui sont par la suite administrés aux patients. Après migration vers les ganglions, elles activent fortement les lymphocytes T et les cellules NK (267-269).

Il existe plusieurs essais cliniques en phase I utilisant cette méthodologie qui ont abouti jusqu'à présent à des résultats plutôt mitigés. Une des raisons majeures expliquant ces résultats décevants est que les DCs injectées migrent très difficilement vers les ganglions drainants. Environ 1% des DCs seulement quittent le site d'injection chez l'humain comme chez la souris. Le contrôle de la migration des DCs devient donc un facteur limitant pour un succès thérapeutique de l'immunothérapie utilisant les DCs (270, 271).

### **7.3 Peut-on et faut-il interférer avec la migration des DCs?**

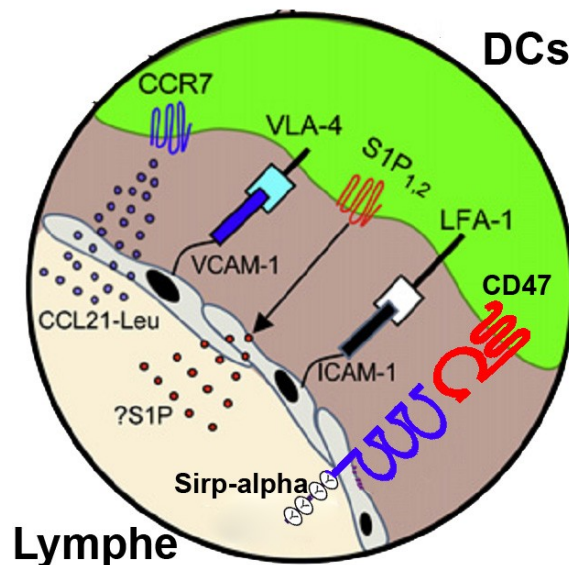
La migration est donc une propriété cruciale dans le fonctionnement des DCs. Les mécanismes gouvernant ce processus ne sont pas encore tous élucidés. Imaginer pouvoir contrôler totalement leurs déplacements serait non seulement profitable en oncologie, mais aussi dans d'autres pathologies. Par exemple, chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques, on pourrait empêcher le recrutement des DCs pathogéniques (272) et favoriser l'accumulation de DCs tolérogéniques (273). Les travaux de Lambrecht nous démontrent clairement que cette approche est

réaliste. En effet, les DCs myéloïdes (identifiées comme Sirp- $\alpha^+$  par notre laboratoire)(21) transportent constamment des allergènes du poumon vers les ganglions pour perpétuer les manifestations cliniques de l'asthme expérimental. Par conséquent, l'inhibition de la migration des DCs par des interventions pharmacologiques améliore les symptômes cliniques de l'asthme. Par exemple, le FTY720, un agoniste du récepteur sphingosine 1-phosphate, inhibe la migration des DCs des poumons vers les ganglions médiastinaux et abolit l'inflammation pulmonaire (274). Ce produit fait l'objet d'essais cliniques en phase I dans la sclérose en plaques et la transplantation (275). D'autres produits comme le BW245C, un agoniste du récepteur de la prostaglandine D2, et l'anticorps contre le récepteur de TSLP suppriment également la migration des DCs, entraînant une amélioration des signes cliniques inflammatoires au niveau des voies respiratoires (276, 277).

Notre laboratoire a mis en évidence plusieurs fonctions du CD47 des DCs incluant le contrôle de la migration, la maturation et la sécrétion de cytokines *in vitro* chez l'humain (278). Pour élucider le rôle du CD47 *in vivo*, nous avons utilisé des souris déficientes pour la molécule CD47. Nous avons observé que le CD47 contrôle positivement la migration des DCs vers les organes lymphoïdes secondaires (63). Cette conclusion est basée sur les observations suivantes. Les DCs de la peau migrent à travers l'épiderme et le derme pour atteindre la lymphe à travers le réseau lymphatique. Les DCs s'attachent aux cellules endothéliales via l'interaction CD47/Sirp- $\alpha$  tout au long des vaisseaux lymphatiques formant une structure artificielle nommée « cordons lymphatiques ». L'absence de CD47 empêche la formation de ces structures. Puisque l'expression de CD47 est ubiquitaire, nous

avons voulu déterminer le rôle respectif du CD47 sur les DCs et/ou sur les cellules endothéliales. En retraçant, dans les ganglions drainants des hôtes CD47<sup>+/+</sup> ou CD47<sup>-/-</sup>, des BM-DCs CD47<sup>+/+</sup> injectées en sous cutané, nous avons observé que l'absence de CD47 sur des cellules endothéliales n'influence pas la propriété migratoire des DCs. L'administration des BM-DCs CD47<sup>+/+</sup> ou CD47<sup>-/-</sup> dans des hôtes CD47<sup>+/+</sup> permet de conclure que la molécule CD47 exprimée sur la DC est cruciale à leur migration.

**Figure 12: L'interaction CD47/Sirp- $\alpha$  favorise la migration des DCs**



Le défaut de migration s'apparente à celui observé chez les souris déficientes pour l'expression de la molécule CCR7. En effet, le CCL19 et le CCL21, les deux ligands du CCR7, exprimés tout au long du réseau lymphatique permettent aux DCs de s'y lier (279). Cette liaison active les intégrines  $\alpha_L\beta_2$  permettant aux DCs de s'attacher fermement aux cellules endothéliales via ICAM1 ou ICAM2. Dans les

ganglions drainants, on observe une diminution de DCs cutanées chez nos souris CD47<sup>-/-</sup>, idem pour les souris CCR7<sup>-/-</sup>, qui sont caractérisées par une expression élevée d'IE et de CD40. Nous avons voulu nous assurer que l'absence de CD47 n'affecte pas l'expression de CCR7 et la chimiotactisme aux ligands (CCL19) qui pourraient être responsables de la diminution de DCs dans les ganglions (279). Nous observons que l'inactivation du CD47 n'influence pas l'expression du CCR7. Contrairement aux souris CD47<sup>-/-</sup>, la migration des lymphocytes et la structure organisationnelle des organes lymphoïdes secondaires sont profondément altérées chez des souris CCR7<sup>-/-</sup>. À la même période, Hagnerud et al ont rapporté le phénomène contraire en montrant une altération de chimiotactisme des DCs CD47<sup>-/-</sup> envers le CCL19 chez des souris C57BL/6 *in vitro* (280). De plus, ces mêmes auteurs semblent indiquer que l'absence de CD47 n'affecte pas le nombre de lymphocytes T circulants (data non publiées). Or nous avons relevé que le nombre de cellules T a diminué de moitié chez nos souris CD47<sup>-/-</sup> Balb/c. L'hypersensibilité retardée de type 1 (DTH) est un test classique dans lequel les DCs sont sensibilisées par l'antigène appliqué à l'abdomen et migrent vers les ganglions pour activer des cellules T. Suite à une restimulation à l'oreille au même antigène, les lymphocytes T effecteurs migrent vers l'oreille et causent la réaction de DTH mesurée par l'épaisseur de l'oreille. Hagnerud et al ont rapporté que l'inflammation, suite au test de DTH a diminué chez leur souris CD47<sup>-/-</sup>, tandis que nous avons observé une augmentation (281). Nous avons testé deux antigènes différents (FITC et DNFB) et les résultats restent comparables (Fig.16 et 17, annexes). De plus, l'augmentation de la réaction DTH en utilisant l'antigène, l'oxazolone, a été également rapportée chez des souris

CD47<sup>-/-</sup> (231). Étant donné que la fonction de CD47 est associée au Sirp- $\alpha$ , ces résultats contradictoires entre les deux laboratoires pourraient être expliqués par le polymorphisme du Sirp- $\alpha$  chez les deux souches de souris (Balb/c vs C57BL/6) (209, 282). Néanmoins, les travaux de deux autres groupes penchent en faveur de nos observations. Premièrement, l'absence de CD47 sur les lymphocytes T confère une résistance à la mort médiée par la liaison de Fas-FasL (238). Deuxièmement, suite à l'activation, les cellules T CD47<sup>-/-</sup> résistent à la mort cellulaire en diminuant l'expression d'une protéine proapoptotique Bcl-2 qui se traduit par une DTH soutenue pendant plus de quatre jours (231). Ces expériences ont été réalisées avec des souris dont le fond génétique est C57BL/6. Troisièmement, les LCs qui joueraient plutôt un rôle régulateur contribuent à la diminution de la réaction DTH. Des expériences *in vitro* montrent que les LCs stimulent rigoureusement les lymphocytes T naïfs, mais à l'inverse *in vivo*, elles ne participent pas à la présentation d'antigènes durant l'infection virale et l'infection au *Leishmania* (94). De plus, en présence de RANKL (Receptor activator of NF-kappaB ligand) exprimé par les kératinocytes, les LCs augmentent le nombre de Tregs (283). Donc, lorsque la migration des LCs est altérée par l'absence du CD47, la réaction DTH est augmentée.

Bref, la diminution de la migration des DCs lors de l'utilisation d'une protéine de fusion, CD47-Fc, confirme l'importance de la liaison CD47/Sirp- $\alpha$  dans ce processus.

Nous avons démontré qu'il est possible de manipuler la migration des DCs cutanées en contrôlant l'interaction CD47/Sirp- $\alpha$ . Le problème de migration n'est pas



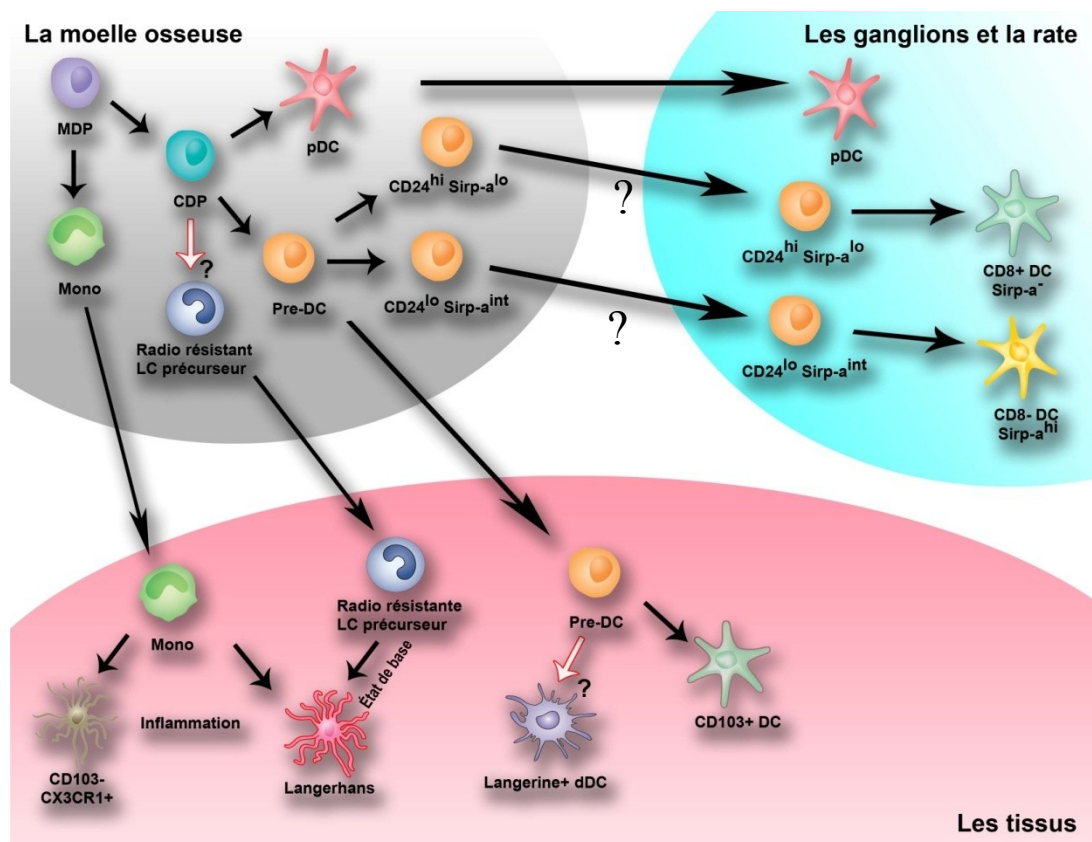
limité aux ganglions drainants le site d'injection sous cutané chez les CD47<sup>-/-</sup>, puisque le recrutement de DCs vers la rate est également affecté par l'absence de CD47. Plus particulièrement, nous avons constaté que les DCs CD4<sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> sont quasi absentes de la zone marginale dans des souris CD47<sup>-/-</sup>, tandis que les autres populations de DCs sont présentes en nombre normal. Peu de temps avant la publication de notre article, Naik et al. ont rapporté que les précurseurs des DCs arrivent dans la rate et réalisent deux à trois cycles de division tout en acquérant le phénotype des DCs (284). Nous voulons donc exclure le fait que les précurseurs des DCs CD47<sup>-/-</sup> migrent dans la rate et ne prolifèrent pas. Nous avons analysé la prolifération cellulaire de chaque sous-population de DCs. Deux observations nous permettaient de confirmer le défaut de migration : 1) le nombre de précurseurs des DCs a augmenté dans le sang des souris CD47<sup>-/-</sup>. 2), les DCs CD4<sup>+</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> des souris CD47<sup>-/-</sup> se divisent même mieux que les autres sous-populations. Nous concluons donc que le CD47 contrôle positivement l'accumulation des précurseurs de DCs dans la rate.

Depuis la publication de notre article, de nouveaux marqueurs ont été décrits pour distinguer les trois populations de DCs cutanées: les cellules de Langerhans (langerine<sup>+</sup>, EpCAM<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>, Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>), et deux populations de DCs du derme (langerine<sup>+</sup>, EpCAM<sup>-</sup>, CD103<sup>+</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>-</sup> et langerine<sup>-</sup>, EpCAM<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD11b<sup>hi</sup>, Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>) (20, 24). À la lumière de ces nouveaux marqueurs, il serait intéressant de déterminer quelles sont les populations de DCs qui sont affectées par l'absence de CD47. Nous postulons que le CD47 influence seulement la migration des DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>. Nous avons obtenu plusieurs évidences supportant cette hypothèse.

Premièrement, à l'état de base chez les souris CD47<sup>-/-</sup>, nous notons une diminution de DCs cutanées d'environ 75%, ce qui correspond au nombre de DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> dans la peau (19). Dans le thymus comme dans la rate, le nombre de DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> est dramatiquement diminué laissant les autres sous-populations inchangées (285). Deuxièmement, dans des modèles de maladies telles que la colite et l'asthme où les DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> sont tenues pour responsables de l'inflammation chronique, l'absence de CD47 permet d'altérer leur migration et d'atténuer ainsi la maladie (17, 21). Notre laboratoire utilise les protéines de fusions telles que le CD47-Fc et le Sirp-Fc pour altérer la migration des DCs. Ce traitement améliore les signes cliniques de l'asthme et de la colite expérimentale. De plus, le CD47-Fc et Sirp- $\alpha$ -Fc inhibent l'accumulation de DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> dans les ganglions. Troisièmement, les derniers articles sur le développement des DCs mentionnent que les pré-DCs se forment dans la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles terminent leur différenciation en cDCs (40, 286). Les DCs CD8<sup>+</sup> et les DCs CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>) de la rate proviennent du même précurseur, c'est-à-dire les pré-DCs (I-A<sup>-</sup> CD11c<sup>int</sup>Flt3<sup>+</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>int</sup>). Alors comment expliquer le défaut sélectif de cDCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> dans la rate des souris CD47<sup>-/-</sup>? Une réponse peut être trouvée dans la première publication de Naik qui montre l'existence potentielle d'un autre embranchement dans la moelle osseuse juste après les pré-DCs décrit par Liu et al. (40). Ces pré-DCs peuvent être divisées en deux sous populations : les CD24<sup>hi</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>-</sup> qui se différencient majoritairement en DCs CD8<sup>+</sup>, tandis que les CD24<sup>lo</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>int</sup> deviennent principalement des DCs CD8<sup>-</sup> Sirp- $\alpha$ <sup>hi</sup>(284). Nous spéculons que le CD47 contrôle la migration des pré-DCs CD24<sup>lo</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>int</sup> vers la rate où elles se

transforment en DCs  $CD8^-$   $Sirp-\alpha^{hi}$ . Il est vrai que nous ne pouvons exclure totalement un défaut de développement. Cependant, le fait que le développement des DCs à partir des cellules de la moelle osseuse s'effectue normalement *in vitro* en présence de GM-CSF; que l'accumulation de précurseurs dans le sang et la prolifération intrasplénique des DCs soient comparables entre les souris  $CD47^{+/+}$  et  $CD47^{-/-}$  suggèrent fortement que le défaut se retrouve plutôt au niveau de la migration, et non du développement intrinsèque. Nous ignorons pour le moment les mécanismes par lesquels la migration des DCs  $Sirp-\alpha^+$  est touchée par l'ablation du  $CD47$ .

**Figure 13: Le développement des DCs modifié**



Nous avons modifié le modèle pour intégrer nos résultats et celui de Naik. Nous avons ajouté deux autres précurseurs dans la moelle. Ils sont distingués par l'expression de  $CD24^{hi}SIRP-\alpha^{lo}$  et  $CD24^{lo}SIRP-\alpha^{int}$  qui se différencient en DCs  $CD8^{+}$  et  $CD8^{-}$  respectivement.

Définitivement, la migration est une caractéristique indissociable de la fonction des DCs et cette association est profitable ou dommageable selon les situations cliniques. Monter une réponse protectrice (cancers et pathologies infectieuses) ou freiner une réponse inflammatoire (IBD, allergie, maladies auto-immunes) est indispensable pour assurer l'homéostasie du système immunitaire. Finalement, pour espérer une vaccination efficace, il faut qu'une collaboration s'établisse entre plusieurs DCs qui migrent vers la zone T où elles induisent la formation de cellules T mémoires centrales.

#### **7.4 Est-il dangereux de contrôler sélectivement la migration des DCs $SIRP-\alpha^{+}$ ?**

Il est indéniable que les DCs jouent un rôle central dans la lutte contre les maladies infectieuses grâce à leurs propriétés biologiques proinflammatoires, leur aptitude à migrer et leur singularité dans l'activation des cellules T naïves en cellules effectrices. Chaque étape est requise et non redondante pour que les DCs puissent remplir leurs fonctions, comme une chaîne de montage dans une usine. Une des propriétés extrêmement intéressante de l'axe  $CD47/SIRP-\alpha$  est qu'il n'affecte pas la migration des DCs  $CD103^{+}SIRP-\alpha^{-}$ . Ces cellules jouent plusieurs rôles protecteurs dans de nombreux modèles infectieux et tolérogéniques chez la souris. Par exemple,

les DCs CD103<sup>+</sup> de la peau sont les seules à présenter efficacement l'antigène du virus herpès aux cellules T CD8<sup>+</sup> (28), en utilisant la voie de la présentation d'antigènes croisée. Quant aux DCs CD103<sup>+</sup> intestinales, elles transportent la *Salmonella* pathogénique de l'intestin vers les ganglions mésentériques (41) où elles activent des cellules T spécifiques de l'antigène. Dans le poumon, ces cellules protègent les souris contre *Bordetella pertussis* (287). Dans des modèles tolérogéniques, les DCs CD103<sup>+</sup> pulmonaires et intestinales limitent l'inflammation et inhibent la fibrose (288, 289).

Les propriétés tolérogéniques des DCs CD103<sup>+</sup> intestinales sont attribuées en partie à leur capacité à induire des Tregs (14, 15). Les DCs CD103<sup>+</sup> sont plus aptes que les DCs CD103<sup>-</sup> à induire les Tregs pour deux raisons principales: comparée à la seconde population, la première exprime un plus haut niveau d'ARNm codant pour le *plat* (tissue plasminogen activator) et pour *ltbp3* (latent TGF-binding protein 3) qui sont deux enzymes activateurs de la forme latente du TGF-β; ce qui signifie que leur différence se retrouve au niveau de la production de TGF-β endogène actif. Or, le TGF-β exogène est insuffisant pour induire des Tregs par les DCs CD103<sup>-</sup> suggérant qu'un autre cofacteur est nécessaire. L'ajout de acide rétinoïde (RA) un métabolite de la vitamine A, permettra enfin aux DCs CD103<sup>-</sup> d'induire des Tregs de manière équivalente aux DCs CD103<sup>+</sup>. Contrairement aux DCs CD103<sup>-</sup>, les DCs CD103<sup>+</sup> de l'intestin possèdent une enzyme capable de métaboliser la vitamine A (14, 15, 290). Lors d'une colite, la proportion de DCs CD103<sup>+</sup> est diminuée dans la lamina propria et les ganglions mésentériques (17, 289). Or, chez des souris CD47<sup>-/-</sup>, le pourcentage de DCs CD103<sup>+</sup>, déjà élevé comparé aux souris CD47 de type sauvage, reste

relativement constant après l'induction de colite par le TNBS, tandis que chez des souris CD47 de type sauvage, ce pourcentage est grandement diminué (17). Ce phénomène expliquerait probablement une petite partie de la résistance à la colite expérimentale des souris CD47<sup>-/-</sup>. Chez l'humain, Iliev et al. ont montré que les cellules épithéliales de la lamina propria des patients en bonne santé peuvent induire la différenciation des monocytes en DCs CD103<sup>+</sup> capables de générer des nouvelles Tregs, tandis que les cellules épithéliales des patients atteints de maladie de Crohn en sont incapables (291). Cependant, on retrouve le même nombre de DCs CD103<sup>+</sup> chez des patients atteints de Crohn comparés aux personnes saines (292).

En plus des DCs CD103<sup>+</sup>, les pDCs assurent le maintien de la tolérance contre les antigènes inoffensifs qui se retrouvent dans notre environnement, en particulier dans les muqueuses et le CD47 n'influence pas leur migration. Par exemple, Ochando et al. montrent que les pDCs sont des cellules présentatrices d'allo-antigènes essentielles à la tolérance à l'allogreffe cardiaque (131). Dans ce processus, les pDCs captent l'antigène, migrent vers le ganglion via le sang et induisent les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. L'ablation des pDCs ou l'inhibition de leur accès aux ganglions s'oppose à l'induction de la tolérance à l'allogreffe. *Vice versa*, le transfert adoptif des pDC prolonge la survie du greffon (131). Hadeiba et al. apportent une précision supplémentaire en montrant que ce sont des pDCs CCR9<sup>+</sup> qui induisent les cellules régulatrices Foxp3<sup>+</sup> *in vitro* et *in vivo*, en supprimant ainsi le GVHD (graft-versus-host disease) (132). Les mêmes résultats ont été obtenus dans un modèle d'asthme expérimental chez la souris. L'ablation des pDCs par des anticorps spécifiques (120G8) augmente l'inflammation de type Th2, et la

reconstitution des pDCs prévient la maladie. Dans un modèle de tolérance orale, les pDCs captent l'antigène que la souris a reçu par gavage, migrent vers le foie où elles éliminent les cellules CD4<sup>+</sup> et les cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène (133). Les pDCs provenant des ganglions drainant les tumeurs activent les Tregs via la voie de l'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) (134) dont nous parlerons plus loin.

En conclusion, inhiber sélectivement la migration des DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> ne semble pas avoir un impact majeur sur la réponse immunitaire contre les pathogènes. Les DCs CD103<sup>+</sup> nous protègent très bien contre les infections bactériennes et virales. L'induction de la tolérance en général n'est pas non plus affectée, puisque la perturbation de l'axe CD47/Sirp- $\alpha$  n'affecte ni les pDCs ni les DCs CD103<sup>+</sup>.

Cependant, certains microbes peuvent manipuler certaines fonctions et propriétés des DCs à leurs avantages. Par exemple, *Coxiella burnettii* perturbe négativement la maturation des DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> dérivées des monocytes causant la persistance de la maladie chez certains patients (293, 294). Le mycolactone, une toxine produite par *Mycobacterium ulcerans*, inhibe la migration des DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> cutanées vers les ganglions; *Salmonella typhi* et *Yersinia pestis* induisent l'apoptose des DCs en leur injectant une toxine (295). *Mycobacterium tuberculosis* inhibe la migration des DCs en bloquant l'expression de CCR7 (296); *Aspergillus fumigatus* altère la fonction des DCs, de telle sorte que les lymphocytes T ne se différencient pas en cellules Th1 protectrices, mais en cellules Th2 (297); le VIH-1 utilise des DCs comme transporteurs viraux en se liant à la lectine DC-SIGN. Ensuite, en migrant vers les ganglions, les DCs peuvent transmettre le virus aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (298). En conclusion, ces pathogènes manipulent deux propriétés cruciales des DCs :

l'activation et la migration. La manipulation pharmacologique de l'axe CD47/Sirp- $\alpha$  qui interfère avec la migration et l'activation des DCs Sirp- $\alpha^+$  doit donc être envisagée avec prudence.

### **7.5. Rôle des Tregs dans le système immunitaire : ennemis ou amis?**

Les Tregs (iTregs ou Tr1) induites et les Tregs (nTregs) naturelles suppriment notre système immunitaire de manière non-spécifique. Or pour exercer leur activité suppressive, elles doivent être activées via le TCR, donc de manière spécifique de l'antigènes. Les nTregs qui sont générées dans le thymus reconnaissent des antigènes du soi; par conséquent, elles joueraient un rôle prédominant dans la suppression des maladies auto-immunes. Par contre, les iTregs induites en périphérie suite aux contacts avec les antigènes étrangers (bactéries, greffes) seraient plutôt impliquées dans les maladies inflammatoires chroniques et en transplantation (299). Tout comme les DCs, les Tregs sont impliquées dans de nombreuses pathologies. En effet, plusieurs maladies ont été associées à une dérégulation du nombre ou de l'activité suppressive des Tregs Foxp3<sup>+</sup> ou des Tr1.

Cependant, la présence des Tregs n'est pas toujours nécessairement bénéfique. Par exemple, il a été suggéré que chez des personnes âgées, le nombre augmenté des Tregs est corrélé avec un certain degré d'immunodéficience qui entraîne des infections chroniques et des réponses inadéquates aux vaccinations (300). Les tissus tumoraux sont infiltrés par des Tregs qui inhibent l'immunité anti-tumorale. Dans de telles conditions, inhiber les Tregs pour augmenter l'immunité



anti-tumorale est crucial. De même, dans les maladies infectieuses, les Tregs maintiennent l'équilibre entre le contrôle de l'infection et la prévention des dommages collatéraux tissulaires. Plusieurs modèles démontrent que les Tregs inhibent la génération et la fonction des cellules effectrices, entraînant ainsi la persistance des parasites (301). Néanmoins, cette persistance est parfois nécessaire au développement des cellules T mémoires permettant ainsi l'élimination du pathogène lors d'une seconde réinfection. En conclusion, l'induction *de novo* des Tregs *in vivo* ou l'administration aux patients des Tregs générées *in vitro* dans un but thérapeutique représentent des traitements potentiels puissants pour les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires chroniques et la transplantation.

À cet effet, plusieurs produits pharmacologiques ont démontré leur efficacité dans l'induction/expansion des Tregs. Notamment, la rapamycine inhibe le développement du diabète chez les souris NOD dû à sa capacité d'induire l'expansion des Tregs Foxp3<sup>+</sup> et des Tr1. Ce même produit abolit le rejet du greffon en générant *de novo* des Tregs Foxp3<sup>+</sup> (121, 302-304). Le GA (glatiramer acetate), un traitement pour les patients atteints de sclérose en plaques, peut augmenter la fréquence des Tregs chez la souris (305). Chez l'humain, la découverte de méthodes pour augmenter le nombre et l'activité suppressive des Tregs est très limitée. L'ADI (allergen desensitization immunotherapy), utilisée depuis des années pour traiter les maladies allergiques, est connu pour être impliquée dans l'induction des Tregs Foxp3<sup>+</sup> et des Tr1 (306). Dans certaines circonstances, il n'est pas possible d'induire des Tregs *in vivo* en raison de leur défectuosité intrinsèque. Plusieurs chercheurs ont alors concentré leurs efforts dans la génération de Tregs polyclonales ou spécifiques

de l'antigène *in vitro* dans le but de faire un transfert adoptif thérapeutique. Puisqu'un nombre relativement élevé est nécessaire pour le traitement des patients, mais que le nombre de Tregs chez l'humain en circulation est restreint, les chercheurs ont investi leurs efforts sur l'induction et l'expansion des Tregs à partir des lymphocytes T conventionnels. Certains groupes ont développé des conditions de cultures pouvant étendre plusieurs milliers de fois le nombre de Tregs Foxp3<sup>+</sup> initial hautement purifiés. Ces méthodes sont basées sur une forte stimulation du TCR, une grande dose d'IL-2 exogène et d'APC spécifiques. Pour l'induction de Tr1, des stimulations répétitives du TCR avec les APC, idéalement des DCs tolérogéniques, en présence d'IL-10 sont nécessaires. L'ajout d'IFN- $\alpha$  génère une plus large et plus stable population de Tr1. Le TGF- $\beta$  ne participe pas au développement des Tr1, mais induit la production de cytokines suppressives. Une nouvelle technique qui consiste à utiliser des lentivirus portant le gène *foxp3* pour transfecter les lymphocytes T naïfs et mémoires apporte l'espoir de transformer des cellules T effectrices spécifiques de l'antigène en Tregs. Cette technique génère des Tregs humaines fonctionnellement équivalentes à celles obtenues *ex vivo*. Donc théoriquement, n'importe quelles cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène pourraient devenir des Tregs. Cette transformation nous permet de cibler spécifiquement les maladies auto-immunes dont nous connaissons l'auto-antigène. En parallèle, l'engagement de CD47 permettrait également d'induire des Tregs CD103<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> à partir des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves et mémoires. L'avantage est qu'il ne nécessite pas de manipulation de virus qui peuvent avoir des effets imprévisibles : la réversion, la mutation spontanée, etc. Par contre, nos travaux ont

montré que l'expression du CD47 inhibait l'expansion des Tregs Foxp3<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> *in vivo* sans affecter leur fonction suppressive *in vivo* et *in vitro*.

### 7.5.1. Tregs et immunosénescence

Nous avons montré au cours du vieillissement que , le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> augmente chez nos souris CD47<sup>-/-</sup>, comparé aux souris de type sauvage. Ces cellules expriment un phénotype de cellules activées ou de cellules mémoires. Parmi ces cellules, la proportion de Tregs Foxp3<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> est augmentée dans les organes lymphoïdes secondaires et dans les tissus pulmonaires à l'état de base. Cette augmentation s'opère plus rapidement que l'accumulation naturelle observée au cours du vieillissement des souris Balb/c (307). Les Tregs CD103<sup>+</sup> se retrouvent préférentiellement dans les tissus inflammatoires où elles exercent leurs fonctions (225-227), mais elles peuvent également se localiser dans des tissus normaux en absence d'inflammation. Cette augmentation des Tregs CD103<sup>+</sup> chez la souris CD47<sup>-/-</sup> est le résultat d'une prolifération accélérée, telle qu'indiqué par l'incorporation de BrdU. On peut observer le même phénomène chez les souris dont les cellules T sont déficientes pour le récepteur du TGF-β (230). Étonnamment, l'absence de signalisation par le TGF-β augmente la prolifération des Tregs et ces souris présentent une infiltration de cellules T dans de multiples organes et produisent des auto-anticorps anti-ADN (308). Or, ce n'est pas ce que nous avons observé chez nos souris CD47<sup>-/-</sup>, excepté pour l'augmentation d'auto-anticorps anti-ADN dans de vieilles souris qui ont plus de 50 semaines. La fonction suppressive des

Tregs n'est pas affectée par l'absence de CD47, contrairement aux Tregs déficientes pour récepteur du TGF- $\beta$ . Manna et al. ont rapporté que les cellules T CD47<sup>-/-</sup> résistent à l'apoptose via l'interaction Fas/FasL (238). Ce problème pourrait expliquer l'accumulation lente d'anticorps anti-ADN. Nous concluons que le CD47 contrôle la prolifération et l'homéostasie des cellules régulatrices Foxp3<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> en périphérie *in vivo* au cours du vieillissement.

L'augmentation de Tregs au cours du vieillissement peut contribuer à la susceptibilité accrue aux maladies infectieuses et cancéreuses observées chez des personnes âgées (300). Lages et al. ont démontré que le nombre et l'activité suppressive augmentés des Tregs étaient responsables de la réactivation de *Leishmania major* chez des vieilles souris (309), ce qui pourrait expliquer la réactivation des infections chroniques chez des personnes âgées. Bien que plusieurs modèles expérimentaux aient conclu que la proportion de Tregs est plus élevée chez les souris âgées, leur activité suppressive est encore le sujet de nombreux débats. Zhao et al ont démontré que les Tregs perdent leur capacité suppressive, ce qui entraînerait une sensibilité accrue aux maladies auto-immunes (307). Dans ce contexte, l'aptitude des Tregs des vieilles souris à supprimer la réaction DTH induite par l'alloantigène est réduite comparée aux Tregs des jeunes souris (307). Leur capacité à inhiber la production de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ , est également affectée. Par opposition, Sharma et al. ont montré que, contrairement aux jeunes souris, les souris âgées succombent aux tumeurs et que l'accumulation de Tregs chez des vieilles souris inhibe le rejet tumoral. La neutralisation des Tregs par l'administration d'anticorps anti-CD25 rétablit l'immunité (223). Nishioka et al. ont

relevé que l'activité suppressive des Tregs reste intacte avec l'âge (222) et nos résultats expérimentaux sont en accord avec ces observations. Dans notre modèle, les Tregs CD47<sup>-/-</sup> s'accumulent dans les tissus et les organes lymphoïdes secondaires, au cours du vieillissement, sans perdre leurs propriétés fonctionnelles. Il est à souligner que la même confusion existe chez l'humain. Dans certaines expériences, l'activité suppressive des Tregs des personnes âgées reste la même (310, 311), tandis que d'autres montrent une activité suppressive affaiblie (312).

De manière générale, le vieillissement est un processus naturel mais complexe, qui influence notre biologie en plus de notre système immunitaire. Ce changement entraîne chez les personnes âgées une susceptibilité accrue aux maladies infectieuses, auto-immunes, et contribue aussi aux échecs de vaccination et au développement plus fréquent de cancers (313). On peut donc considérer que le vieillissement reflète un certain état d'immunodéficience. En vieillissant, notre système immunitaire inné et adaptatif perd plusieurs aptitudes importantes. Notamment, le renouvellement des cellules hématopoïétiques progénitrices (HSCs) diminue, ce qui provoque la chute du nombre total de HSCs (314, 315). Le raccourcissement du télomère est en partie responsable de ce phénomène (316). Les neutrophiles et les macrophages perdent plusieurs de leurs propriétés telles que la phagocytose et la capacité à tuer les bactéries intracellulaires caractérisées par la production d'anion superoxyde en présence d'IFN- $\gamma$ , entraînant ainsi la persistance de la maladie infectieuse (317, 318). L'activation et la sécrétion de cytokines (MIP-1a, MIP-1b, MIP-2 et eotaxin) des macrophages diminuent de façon significative (319, 320). Quant aux lymphocytes B, leur nombre total n'est pas affecté par la

sénescence, mais le nombre de cellules B naïves diminue au détriment de celui des B mémoires. La quantité d'anticorps reste constante durant la vie, mais leur affinité diminue avec l'âge (321). Les personnes âgées ont une défaillance dans la génération et la maturation des lymphocytes B.

Un des changements immunologiques les plus remarquables chez les personnes âgées est l'involution du thymus qui rapetisse au fur et à mesure que la personne vieillit. Le cortex et la médulla thymique sont remplacés progressivement par du tissu graisseux. Ainsi, la thymopoïèse diminue avec le temps. Ce changement commence aussitôt après la naissance et se complète autour de 40 à 50 ans (322, 323). Malgré l'involution thymique, le compartiment des lymphocytes naïfs se maintient durant plusieurs décennies. La réduction drastique des lymphocytes naïfs s'opère seulement après l'âge de 70 ans, ce qui entraîne une forte baisse dans le répertoire des lymphocytes. Les cellules T des personnes âgées démontrent quelques déficiences fonctionnelles incluant une réduction significative de la longueur des télomères, un répertoire de TCR limité, une réduction de la production d'IL-2 et une diminution dans la prolifération et la différenciation en cellules effectrices. Par conséquent, leur aptitude à monter une réponse immunitaire à de nouveaux antigènes est diminuée (324-326). La perte de lymphocytes naïfs est associée à une augmentation de cellules effectrices/mémoires. C'est une observation comparable à celle que l'on retrouve chez nos vieilles souris CD47<sup>-/-</sup>. La perte fonctionnelle de ces cellules est expliquée par la diminution de l'expression des molécules de co-stimulation, telles que le CD28, le CD40L, l'OX40 (327).

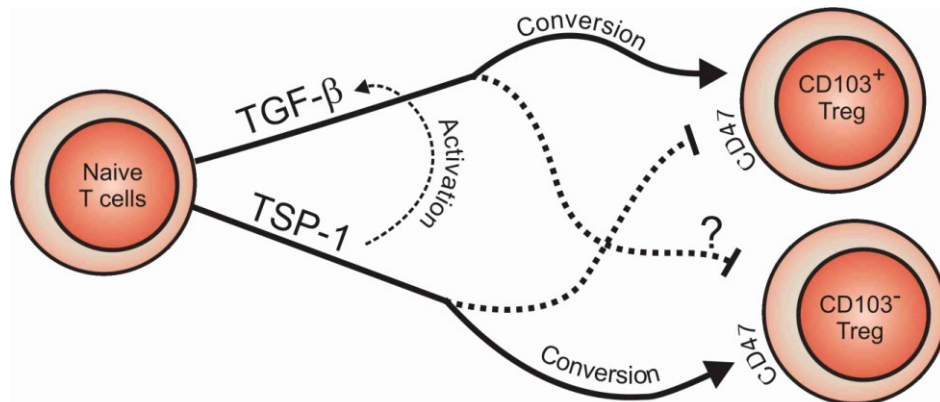
Les DCs n'échappent pas au processus de vieillissement. *In vitro*, les DCs provenant des monocytes restent intactes tant dans leur capacité de différenciation que de maturation. Par contre, leur aptitude à capter l'antigène est altérée, entraînant une diminution dans la dégradation et la présentation d'antigènes (328). Leur propriété à capter les cellules apoptotiques et à induire la tolérance est également affectée. Les personnes de l'âge d'or ont un profil pro-inflammatoire qui pourrait être expliqué en partie par la défaillance dans la présentation des antigènes provenant des cellules apoptotiques. *In vivo*, les DCs des vieilles souris ne sont pas aptes à activer les cellules T spécifiques de l'antigène et leur habileté à migrer vers le ganglion drainant est détériorée en partie suite à la diminution de l'expression de CCR7 (329). L'activité de la PI3K (Phosphoinositide 3 kinase), qui est cruciale dans la phagocytose et la migration des DCs, est altérée chez des personnes âgées (330).

Peut-on relier nos observations avec celles de Sun qui montrent que les DCs CD103<sup>+</sup> intestinales, en présence de TGF- $\beta$ , induisent des Tregs qui expriment, pour la plupart, le CD103<sup>+</sup> (15)? Nous avons déjà discuté plus haut que l'axe CD47/Sirp- $\alpha$  a une influence sélective sur le recrutement de DCs CD103<sup>-</sup>, sans altérer celui des CD103<sup>+</sup>. Ce phénomène débalance les proportions des populations de DCs et entraîne une augmentation du pourcentage de DCs CD103<sup>+</sup> dans la lamina propria. En revanche, ni l'expression basale de TGF- $\beta$  dans la rate (non publié), ni le nombre de DCs CD103<sup>+</sup> pulmonaires ne sont augmentés dans les souris CD47<sup>-/-</sup> comparées aux souris sauvages (21).

Nous avons aussi montré que l'engagement de CD47 par la TSP1 ou par l'anticorps anti-CD47 chez l'humain *in vitro* induit des Tregs CD103<sup>-</sup> à partir des

lymphocytes T naïfs et mémoires (233). Nous postulons que le CD47 a un double rôle dans le système immunitaire. La TSP1 inhiberait sélectivement les Tregs CD103<sup>+</sup> tout en favorisant le développement de CD103<sup>-</sup>. Lors d'une inflammation, la TSP1 libérée dans le milieu permet d'induire des Tregs CD103<sup>-</sup> à partir des cellules T naïves ou mémoires diminuant ainsi la réaction inflammatoire. Par contre, l'engagement de CD47, à l'état de base, limite la prolifération des Tregs CD103<sup>+</sup>, freinant ainsi les phénomènes d'immunodéficience qui se développe au cours du vieillissement. À l'inverse, le TFG- $\beta$  favorise la conversion en Tregs CD103<sup>+</sup> et inhiberait la prolifération des Tregs CD103<sup>-</sup>.

**Figure 14: Modèle de conversion des Tregs**



### 7.5.2. Le rôle des Tregs dans le cancer

Plusieurs travaux démontrent clairement l'implication des Tregs CD103<sup>+</sup> dans la suppression de l'immunité tumorale (331). Par exemple, Lin et al. montrent que les Tregs CD103<sup>+</sup> s'accumulent dans les tumeurs et inhibent les CTL. Les responsables : les DCs tolérogéniques qui s'infiltrèrent dans des tissus, captent des



antigènes tumoraux, migrent vers les ganglions et induisent le développement des Tregs. Ce processus aboutit à une augmentation du nombre de Tregs dans le sang et dans les tissus tumoraux (332, 333). La déplétion des Tregs abolit la suppression permettant le rejet de la tumeur. La diminution de la survie des patients est parfois corrélée avec un nombre élevé de Tregs (334, 335). Les tumeurs peuvent également sécréter des chémokines, comme le CCL22, qui attirent des Tregs vers le tissu tumoral. Pouvoir manipuler les Tregs est donc extrêmement intéressant dans le combat contre les cancers. Plusieurs stratégies ont été testées pour altérer le nombre ou la fonction des Tregs, rétablissant ainsi l'immunité anti-tumorale. Par exemple, l'administration d'une protéine de fusion d'IL-2 et d'une toxine du bacille de la diphtérie induit l'apoptose de Tregs Foxp3<sup>+</sup> améliorant les conditions des patients atteints de carcinome (336) et mélanome (337). Le cyclophosphamide (CY) est utilisé pour traiter divers types de cancers. Il a été démontré que chez la souris et chez l'humain le CY diminue le nombre et la fonction des Tregs (338, 339).

Le CD47 exprimé sur les Tregs ne semble pas impliqué directement dans le développement des tumeurs, cependant l'expression élevée de CD47 sur les cellules tumorales inhibe leur phagocytose par les macrophages, permettant ainsi aux tumeurs d'échapper à l'immuno-surveillance (176, 340). L'administration de l'anticorps anti-CD47 permettra d'interrompre l'axe CD47/Sirp- $\alpha$ , augmentera donc la phagocytose, favorisant ainsi l'élimination de la tumeur. D'ailleurs, l'anticorps anti-CD47 a été utilisé avec succès pour éliminer les cellules leucémiques (176). De plus, il est possible que l'administration de l'anticorps anti-CD47 induise l'apoptose des cellules leucémiques (195).

### . 5.5.3. Le rôle des Tregs dans la transplantation

Un des domaines dans lequel la thérapie basée sur les Tregs est la plus prometteuse est la transplantation. La transplantation de cellules hématopoïétiques est largement utilisée dans les traitements de nombreuses maladies hématopoïétiques. De nos jours, la GVHD (graft versus host disease) reste encore la complication la plus dangereuse malgré plusieurs progrès. Dans des études murines, la déplétion de Tregs Foxp3<sup>+</sup> aggrave le GVHD et l'administration de Tregs protège l'animal contre cette complication. De plus, les Tregs CD103<sup>+</sup> migrent directement vers les tissus où le GVHD s'opère (341). Cependant, les résultats chez l'humain ne sont pas aussi clairs. Paradoxalement, les premières études rapportent que le nombre de Tregs était élevé chez des patients développant une GVHD chronique. Étant donné que ces études utilisent CD25 comme marqueurs de Tregs, les effecteurs ont probablement été comptabilisés dans les résultats. La plus grande lacune dans les études chez l'humain est le manque de marqueur spécifique des Tregs. Même dans les études récentes où l'analyse de l'expression de Foxp3 et de CD25 combiné, les conclusions restent encore contradictoires. De plus, ces études ont analysé les Tregs dans la circulation sanguine, or les derniers résultats chez la souris suggèrent qu'une localisation de Tregs Foxp3<sup>+</sup> dans l'organe cible était fonctionnellement plus pertinente, sans oublier que les Tregs CD103<sup>+</sup> se retrouvent préférentiellement dans les tissus. Pour inhiber le développement de la GVHD, les premiers essais cliniques chez l'humain utilisant les lymphocytes T rendus anergiques avec de l'IL-10, contenant une petite proportion de Tr1, semblent encourageants. L'utilisation de DCs différenciées en présence d'IL-10 donne des résultats très prometteurs en permettant

non seulement l'induction, mais aussi l'expansion des cellules Tr1 déjà complètement différenciées (342). Quant aux transplantations d'organes solides, le nombre élevé de Tregs Foxp3<sup>+</sup> et Tr1 est toujours corrélé avec une meilleure tolérance du greffon chez les patients. Les traitements envisagés pour ces patients restent les mêmes que pour les patients qui développent une GVHD. L'induction *de novo* de Tregs directement *in vivo* a été expérimentée. L'ECP (Extracorporeal photopheresis), une technique actuellement utilisée, consiste à réinjecter, dans des patients, des cellules apoptotiques induites *ex vivo* par le 8-methoxypsoralen photoactivé. Le mécanisme d'action est d'induire des DCs tolérogéniques qui captent ces cellules apoptotiques. Cette méthode a permis de constater chez des patients atteints de GVHD, une augmentation de Tregs Foxp3<sup>+</sup> périphériques, et chez des patients qui ont reçu une transplantation cardiaque, une diminution du rejet aigu. Chez les rongeurs, l'utilisation d'anticorps pour induire de nouvelles Tregs est intensivement étudiée. Par exemple, les anticorps contre CD4, CD8 ou CD40L sont utilisés fréquemment dans les laboratoires pour établir la tolérance contre la transplantation allogénique. Nous spéculons qu'il serait probablement possible de cibler CD47 sur des lymphocytes T ou Sirp- $\alpha$  sur des DCs pour induire *de novo* des Tregs. Cette hypothèse est basée sur deux faits : premièrement l'engagement du CD47 sur les cellules T naïves ou mémoires induit des Treg CD103<sup>-</sup> (233). Deuxièmement, chez l'humain, l'engagement du Sirp- $\alpha$  ou du CD47 sur des DCs inhibe leur maturation, leur sécrétion de cytokines et leur migration, favorisant ainsi l'induction de tolérance (191).

### 7.5.3. Le rôle des Tregs dans les maladies auto-immunes.

Chez des patients atteints d'IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome), la situation est relativement plus compliquée puisqu'ils portent un gène *foxp3* muté. Néanmoins, il a été démontré que l'induction de Tr1 est indépendante du Foxp3 et que chez certains patients IPEX, le nombre de Tr1 reste normal. La thérapie des cellules Tr1 pourrait être donc efficace chez ces patients qui présentent une forme moins sévère d'IPEX. D'autres ont envisagé de transférer les cellules T autologues transfectées avec le gène *foxp3* non-muté.

Lorsque les médecins diagnostiquent les patients atteints de diabète de type I (T1D), souvent 90% des cellules  $\beta$  sont déjà détruites. Plusieurs évidences montrent que le nombre et la fonction des Tregs Foxp3<sup>+</sup> sont dérégulés dans cette maladie. Certains essais cliniques utilisant l'anticorps anti-CD3 qui ralentit la progression de la maladie sont corrélés avec l'augmentation de cellules Tr1 et Foxp3<sup>+</sup>. D'autres approches, telles que l'administration de rapamycine ou de l'insuline par la voie orale sont des stratégies thérapeutiques intéressantes. Ces deux méthodes ont été prouvées comme étant efficaces chez la souris. Néanmoins, développer des techniques diagnostiques pour déceler la maladie de manière plus précoce nous semble plus urgent.

La sclérose en plaques est une maladie neurodégénérative dans laquelle les gaines de myéline sont attaquées. La recherche chez les rongeurs, fournit de multiples évidences pour indiquer que les Tregs CD103<sup>+</sup> sont impliquées (148, 343). En effet, chez la souris, la déplétion de Tregs aggrave la maladie tandis que la

présence de Tregs dans le système nerveux central (SNC) est associée à la rémission (344, 345). De plus, le transfert adoptif de Tregs freine la progression d'EAE (346-348). Récemment, un groupe a démontré que le micro-ARN-155 stabilise l'expression de Foxp3 et, en son absence, les Tregs CD103<sup>+</sup> sont fortement diminuées (349). Or ce micro-ARN 155, qui est fortement exprimé chez les astrocytes des patients atteints de sclérose en plaques, inhibe l'expression du CD47 (350). Nous proposons que normalement pour freiner l'évolution de la maladie inflammatoire dans le SNC, une diminution de l'expression de CD47, causée par l'augmentation du micro-ARN-155, entraîne l'accumulation de Tregs CD103<sup>+</sup> dans le SNC. Chez l'humain, malgré plusieurs études montrant un nombre normal de Tregs en périphérie et même dans le SNC, ces Tregs semblent dysfonctionnelles *in vitro* (351, 352). Plusieurs traitements utilisés présentement pour les patients atteints de sclérose en plaques tels que le glatiramer acetate et l'IFN- $\beta$  ont tous été rapportés comme étant capables d'augmenter le nombre de Tregs en périphérie (305, 353).

#### **7.5.4. Le rôle des Tregs dans les maladies inflammatoires chroniques**

Les Tregs sont étroitement reliées aux maladies inflammatoires chroniques, telles que la maladie de Crohn et d'allergie. Dans l'asthme, les Tr1 et les Tregs Foxp3 coopèrent pour maintenir l'équilibre entre la tolérance et une réponse immunogénique. En effet, les Tr1 améliorent la fonction des Tregs Foxp3<sup>+</sup> en inhibant la production de TNF- $\alpha$  qui normalement inhibe l'activité suppressive des Tregs Foxp3<sup>+</sup>. Neutraliser l'IL-10 provoque donc une production accrue de TNF- $\alpha$ .

Les glucocorticoïdes sont des médicaments largement utilisés dans le traitement de l'asthme. Ce produit améliore la fonction des Tr1 en augmentant leur capacité à produire l'IL-10. Les Tregs dans les modèles animaux de colite, font un travail remarquable. Ces cellules peuvent prévenir le développement de maladie et le transfert adoptif des Tregs peut éliminer les symptômes. D'autres études ont démontré que l'utilisation d'anticorps anti-IL-6 est fortement utile pour promouvoir le développement des Tregs au détriment de cellules Th17. Nous avons démontré que l'axe CD47/Sirp- $\alpha$  est une cible de choix pour traiter l'asthme et la colite. Raymond et al. ont utilisé la protéine de fusion Sirp- $\alpha$ -Fc pour inhiber l'inflammation de la voie respiratoire. Cependant, nous n'avons pas exclu complètement le fait que cette protéine de fusion puisse se lier au CD47 sur les cellules T et induise l'apoptose cellulaire ou des Tregs CD103<sup>+</sup>.

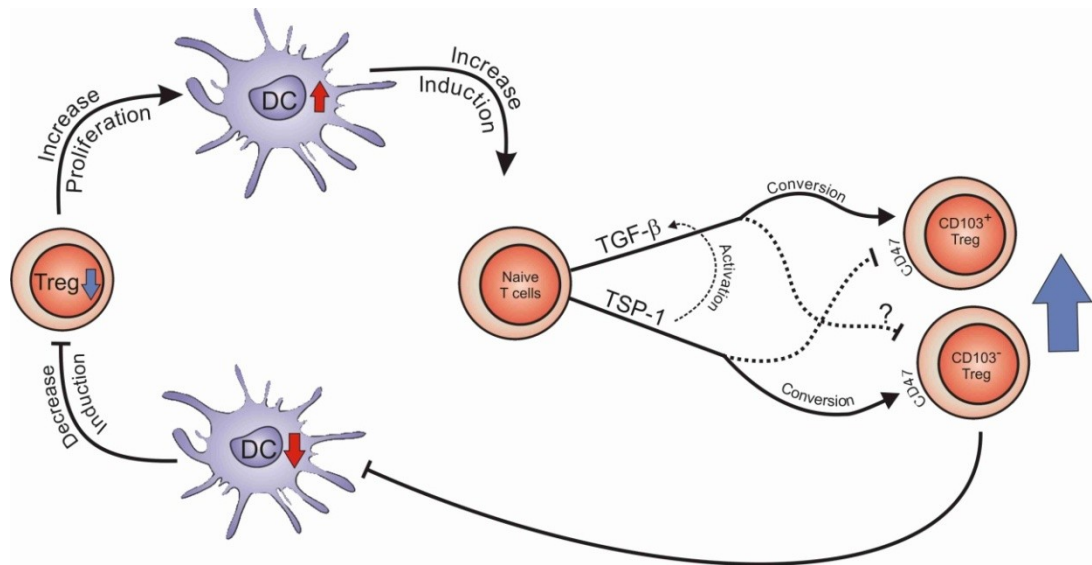
## **7.6. La régulation croisée entre les DCs et les Tregs**

Plusieurs articles récents très intéressants démontrent une régulation mutuelle entre les Tregs CD103<sup>+</sup> et les DCs. Habituellement, les DCs contrôlent positivement la différenciation et la prolifération des Tregs. Un article récent de Liu démontre que le développement des DCs, plus précisément la prolifération des pre-DCs et des cDCs dans les organes lymphoïdes secondaires, est contrôlée par des Tregs (40). Pour le prouver, Liu utilise des souris dont le récepteur de la toxine du bacille de la diphtérie est sous le contrôle du promoteur du gène *foxp3*, ce qui leur permet de supprimer tous les Tregs. Après l'administration de la toxine, Liu n'observe aucun

changement dans le nombre de MDP (Mono/macro/DC precursor) et de pre-DCs dans la moelle osseuse. Par contre, dans la rate, le nombre de pre-DCs et de cDCs est augmenté de 2 et 3 fois, respectivement. Dans les ganglions lymphatiques, ces chiffres augmentent jusqu'à 12 et 15 fois. De plus, cette augmentation de pre-DCs et cDCs dépend de la voie de signalisation de Flt3 (40). L'étude de Darrasse propose qu'il existe un contrôle mutuel entre les DCs et les Tregs pour garder leur nombre constant à l'état de base. Voici deux observations importantes de cet article. Premièrement, l'administration de Flt3L augmente le nombre de DCs qui entraîne une induction de la prolifération et non de la différenciation des Tregs. Le Flt3L n'agit pas directement sur les Tregs. Deuxièmement, l'expansion des Tregs est sous l'influence de la molécule CMH-II des DCs. Darrasse démontre une amélioration du diabète par l'injection de Flt3L suite à l'augmentation de Tregs, et neutraliser les Tregs avec l'anticorps anti-CD25 permet d'abolir cette protection (354). À la lumière de ses propres résultats et de ceux de Liu, Darrasse propose un modèle dans lequel l'augmentation de DCs entraîne une hausse de Tregs qui exerce une suppression sur les DCs. Cette baisse de DCs diminue le nombre de Tregs qui, grâce à Flt3L, favorise l'augmentation de DCs, et le cycle est complet. Dans le même ordre d'idée, l'ablation continue des DCs provoque une diminution de Tregs et une infiltration des lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans de multiples organes et le développement spontané de maladies auto-immunes (355). Or, l'augmentation de DCs n'entraîne pas toujours la tolérance. Chen et al. ont fabriqué une souris dans laquelle l'apoptose des DCs est défectueuse. Ces DCs expriment l'inhibiteur baculoviral de la caspase, p35. Dans ce modèle, malgré l'augmentation de DCs, des lymphocytes activés s'accumulent de

manière chronique et les souris présentent des manifestations systémiques auto-immunes (356). Dans notre modèle de souris  $CD47^{-/-}$ , nous observons une augmentation de Tregs avec l'âge et une diminution de DCs dans la rate et les ganglions lymphatiques, mais il est hautement improbable que cette observation soit due à la régulation mutuelle entre les DCs et les Tregs. La raison est que la réduction du nombre de DCs  $CD103^{-}$  existe déjà chez des jeunes souris, et que l'accumulation des Tregs  $CD103^{+}$  dans les organes lymphoïdes et les tissus s'observe seulement au cours du vieillissement.

Figure 15: La régulation croisée entre les DCs et les Tregs





## 8. Conclusions et Perspectives

Les DCs et les Tregs sont impliquées dans la pathogénèse de plusieurs maladies. Interférer directement avec leurs fonctions pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Nous avons démontré que l'expression du CD47 sur les DCs contrôle leur migration. Cette observation nous amène à utiliser la protéine de fusion CD47-Fc ou Sirp- $\alpha$ -Fc, pour diminuer les symptômes cliniques de l'asthme et de la colite expérimentale. Nous postulons que la manipulation de la maturation et de la migration des DCs est potentiellement une thérapie universelle applicable à de nombreuses maladies inflammatoires dans lesquelles les DCs pathogéniques sont impliquées. Le CD47-Fc pourrait devenir un outil anti-inflammatoire extrêmement puissant. Nous testerons ces molécules dans d'autres maladies inflammatoires expérimentales telles que l'EAE, le diabète, l'arthrite rhumatoïde et la myocardite. L'emploi de ces molécules pourrait également induire un état de tolérance. Nous spéculons qu'il est probablement possible d'induire *de novo* des Tregs directement *in vivo* rien qu'en injectant de l'anticorps anti-CD47 ou des DCs tolérogéniques pré-stimulées avec de l'anticorps anti-sirp- $\alpha$  ou du CD47-Fc. Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont démontré que l'anticorps anti-CD47 inhibe la réaction de DTH (annexe), et que la protéine de fusion Sirp- $\alpha$  et CD47 diminue la sévérité de l'asthme et de la colite expérimentale (17, 357), respectivement. Cependant, nous n'avons pas analysé le potentiel d'induction de Tregs CD103<sup>-</sup> dans ces modèles.

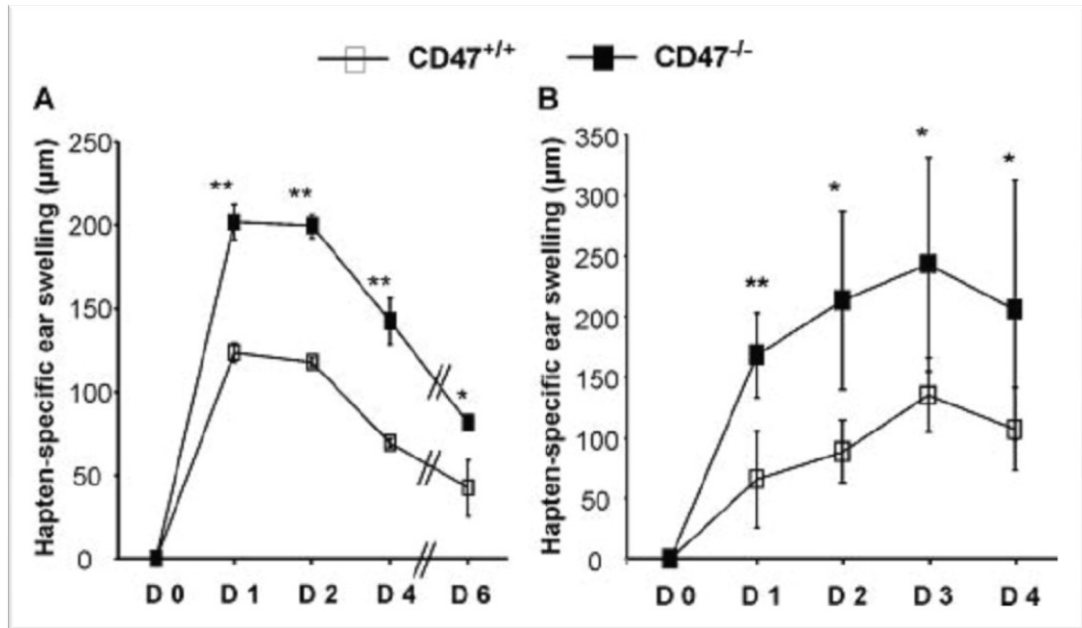
Le problème avec les agents anti-inflammatoires utilisés d'aujourd'hui est qu'ils suppriment de façon non-spécifique notre système immunitaire. Nous proposons ici une stratégie tout à fait originale qui inhiberait sélectivement la

migration d'une population de DCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> pathogéniques sans affecter celles des DCs tolérogéniques CD103<sup>+</sup> et les pDCs capables d'induire une réponse immunitaire protectrice et tolérogénique, respectivement. Par conséquent, les patients traités resteraient immunocompétents. Preuve à l'appui, nos souris CD47<sup>-/-</sup> ne présentent pas de symptômes d'immunodéficience. Bien au contraire, les lymphocytes T effecteurs des souris CD47<sup>-/-</sup> produisent davantage d'IFN-g comparées aux effecteurs CD47<sup>+/+</sup> suite à une immunisation s.c. en présence d'adjuvant.

L'axe CD47/Sirp- $\alpha$  permet de contrôler deux aspects cruciaux de l'immunologie : l'immunité protectrice et la tolérance. Ces deux concepts sont étroitement reliés et mutuellement régulés. Dans le cas d'une maladie auto-immune, serait-il préférable de contrôler la génération de Tregs pour qu'elles suppriment la fonction des DCs, ou de manipuler les DCs pour qu'elles induisent des Tregs? Autrement dit, à quel point du cycle de la régulation entre les DCs et les Tregs doit-on intervenir? Ces questions et bien d'autres font encore l'objet de nombreux programmes de recherche qui visent à une meilleure compréhension de l'axe CD47/SIRP-a /TSP dans le but de développer des stratégies efficaces pour manipuler le système immunitaire à des fins thérapeutiques.

## 9. ANNEXES

**Figure 16: Une DTH exubérante induite par les lymphocytes T CD47<sup>-/-</sup> (Modèle DNFB)**



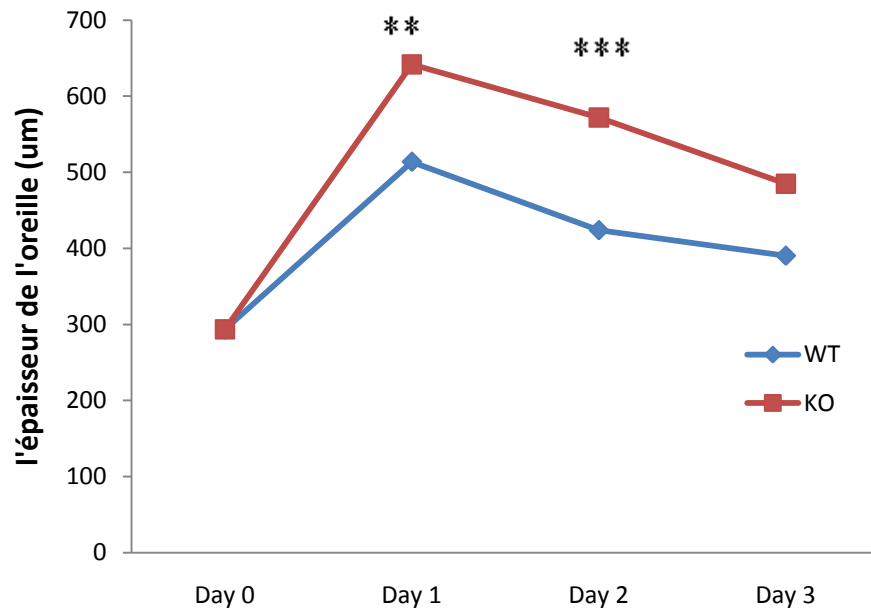
A) Au jour 0 et au jour 5, les souris ont été sensibilisées au DNFB (0.5%) à l'abdomen rasé. Au jour 19, les souris ont reçu le DNFB (0.2%) à l'oreille droite et l'acétone (contrôle) à l'oreille gauche. L'épaisseur des oreilles est mesurée à toutes les 24h. B) Les souris qui ont été sensibilisées en A) ont été immunisées de nouveau au jour 38. 48h après, les cellules T ont été isolées des ganglions drainants et ont été transférées dans des souris naïves CD47<sup>-/-</sup>. Par la suite, les oreilles des souris ont été sensibilisées au DNFB (0.2%) et l'épaisseur des oreilles est mesurée à toutes les 24h. Les data représentent la moyenne de 6 souris d'au moins deux expériences indépendantes. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

Extrait de l'article « CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response ». J'ai contribué entièrement à cette expérience.

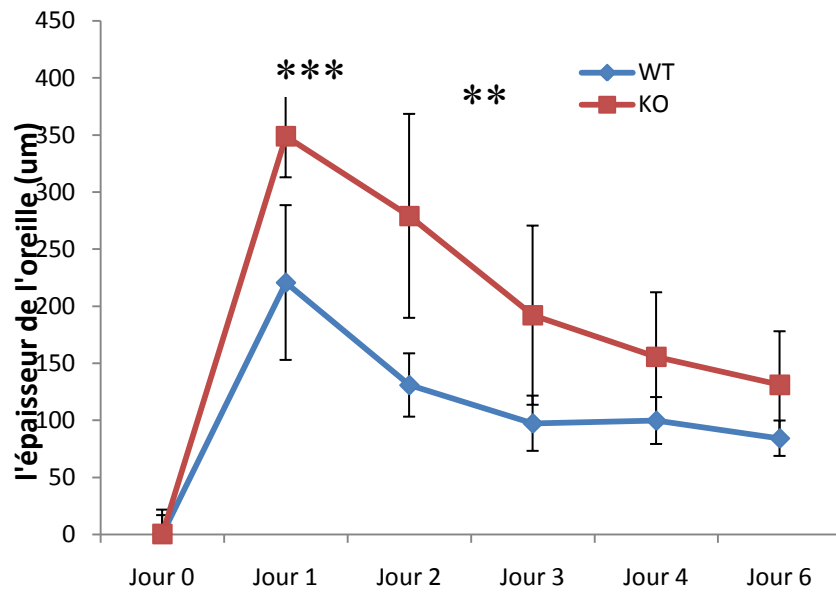
Copyright 2008, The american association of immunologists. inc

Figure 17: Une DTH exubérante chez nos souris CD47<sup>-/-</sup> (Modèle FITC)

A)



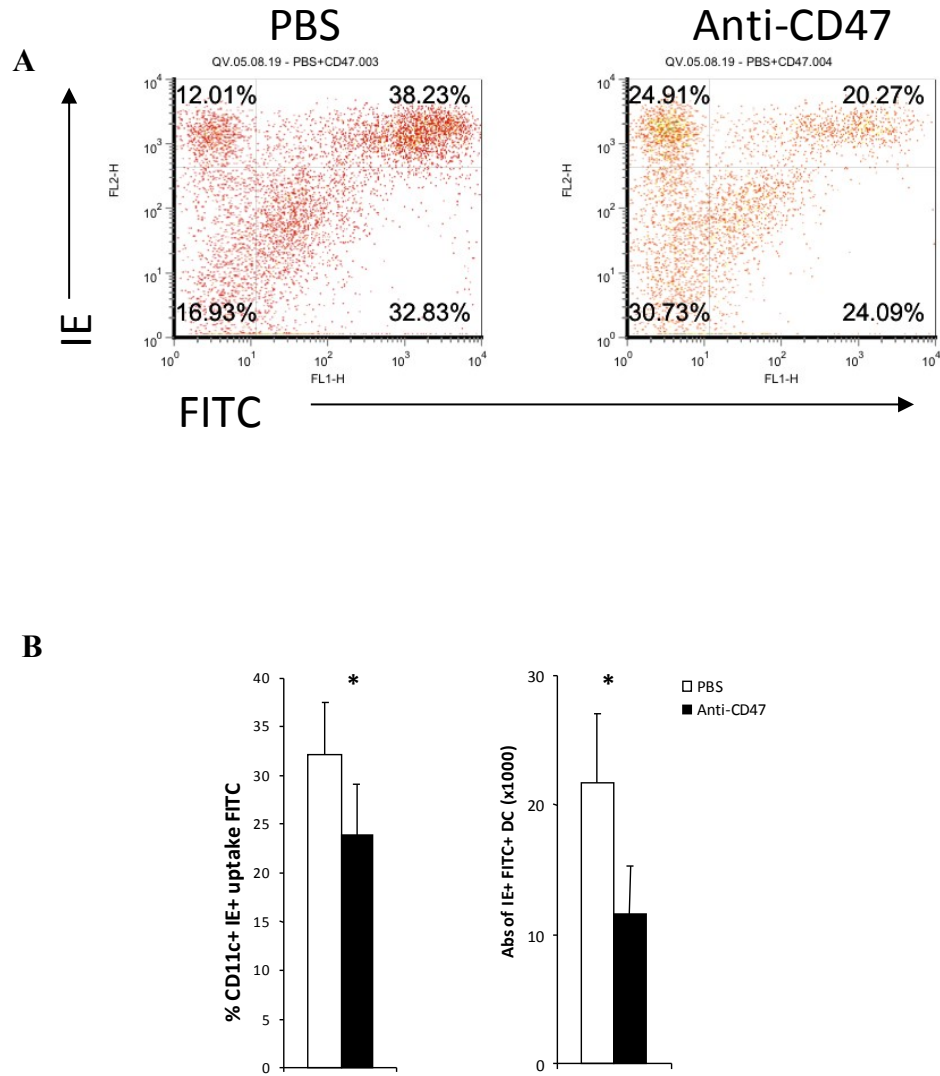
B)



A) Au jour 0, les souris ont été sensibilisées au FITC (1%) à l'abdomen rasé. Au jour 6, les souris ont reçu le FITC (1%) à l'oreille droite et le véhicule (contrôle) à l'oreille gauche. L'épaisseur des oreilles est mesurée à toutes les 24h. B) Au jour 0 et au jour 21, les souris ont été sensibilisées au FITC (1%) à l'abdomen rasé. Au jour 40, les souris ont reçu le FITC (1%) à l'oreille droite et le véhicule (contrôle) à l'oreille gauche. L'épaisseur des oreilles est mesurée à toutes les 24h. Les data représentent la moyenne de 6 souris d'au moins deux expériences indépendantes. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

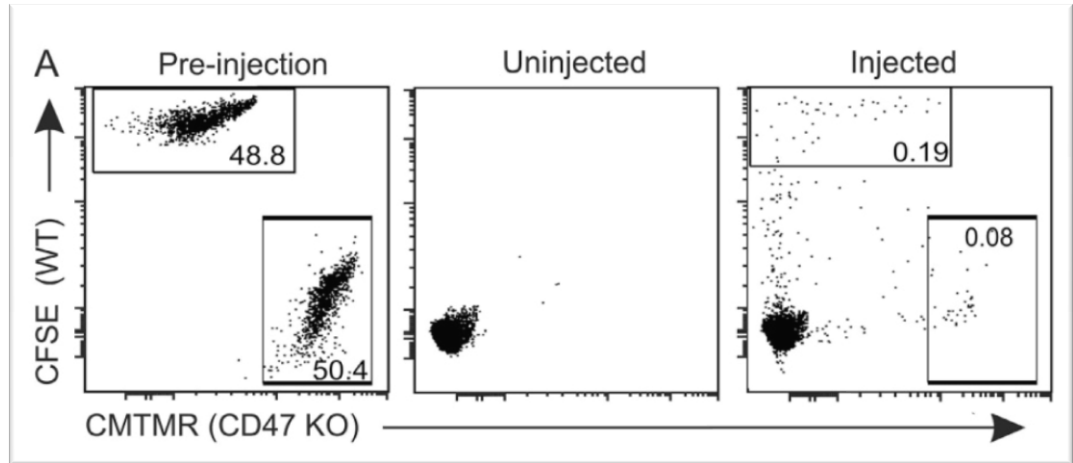
Les expériences de DNFB et FITC démontrent que malgré le défaut de migration des DCs, les lymphocytes T peuvent monter une réponse DTH élevée et soutenue contrairement ce que le groupe de Hagnerud a observé.

**Figure 18: L'anticorps anti-CD47 inhibe la migration des DCs cutanées**



**A)** Le pourcentage de DCs IE<sup>hi</sup> qui ont capté FITC est présenté. 30min avant l'application de FITC à l'abdomen rasé, l'anticorps anti-CD47 est administré s.c. aux souris. 24h plus tard, les souris sont sacrifiées et les DCs sont isolées des ganglions drainants. **B)** La proportion et le nombre absolu des DCs IE<sup>hi</sup> FITC<sup>+</sup> sont présentés. Les data représentent la moyenne de 6 souris d'au moins deux expériences indépendantes. \*P<0.05.

**Figure 19: La migration compétitive**



Les BM-DCs  $CD47^{+/+}$  et  $CD47^{-/-}$  sont marquées au CFSE et CMTMR respectivement et sont injectées par i.p. dans une proportion 50/50 dans un hôte  $CD47^{-/-}$ . 24h après l'injection, les DC sont retracées dans les mLNs. Cette expérience démontre le défaut de migration des DCs  $CD47^{-/-}$  comparé aux DCs  $CD47^{+/+}$  dans un même hôte  $CD47^{-/-}$ . Les data sont représentatives de 2 expériences, donc 3 souris par expérience.

Extrait de l'article « A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> dendritic cells ». J'ai contribué entièrement à cette expérience.

## 9. Références

1. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
2. Hart, D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287.
3. Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, and J. Banchereau. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261.
4. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-1702.
5. Liu, Y. J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23:275-306.
6. Sanchez-Madrid, F., J. A. Nagy, E. Robbins, P. Simon, and T. A. Springer. 1983. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med* 158:1785-1803.
7. Lanier, L. L., M. A. Arnaout, R. Schwarting, N. L. Warner, and G. D. Ross. 1985. p150/95, Third member of the LFA-1/CR3 polypeptide family identified by anti-Leu M5 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 15:713-718.
8. Springer, T. A., L. J. Miller, and D. C. Anderson. 1986. p150,95, the third member of the Mac-1, LFA-1 human leukocyte adhesion glycoprotein family. *J Immunol* 136:240-245.
9. Blackford, J., H. W. Reid, D. J. Pappin, F. S. Bowers, and J. M. Wilkinson. 1996. A monoclonal antibody, 3/22, to rabbit CD11c which induces homotypic T cell aggregation: evidence that ICAM-1 is a ligand for CD11c/CD18. *Eur J Immunol* 26:525-531.
10. Ingalls, R. R., and D. T. Golenbock. 1995. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med* 181:1473-1479.
11. Loike, J. D., B. Sodeik, L. Cao, S. Leucona, J. I. Weitz, P. A. Detmers, S. D. Wright, and S. C. Silverstein. 1991. CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1044-1048.
12. Garnotel, R., L. Rittie, S. Poitevin, J. C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, F. X. Maquart, A. Randoux, and P. Gillery. 2000. Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95). *J Immunol* 164:5928-5934.
13. Meunier, L., K. Bohjanen, J. J. Voorhees, and K. D. Cooper. 1994. Retinoic acid upregulates human Langerhans cell antigen presentation and surface expression of HLA-DR and CD11c, a beta 2 integrin critically involved in T-cell activation. *J Invest Dermatol* 103:775-779.



14. 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.
15. Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* 204:1775-1785.
16. Denning, T. L., Y. C. Wang, S. R. Patel, I. R. Williams, and B. Pulendran. 2007. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8:1086-1094.
17. Fortin, G., M. Raymond, V. Q. Van, M. Rubio, P. Gautier, M. Sarfati, and D. Franchimont. 2009. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells. *J Exp Med* 206:1995-2011.
18. Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, and H. C. Reinecker. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307:254-258.
19. Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med*.
20. Henri, S., L. F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guilliams, B. de Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2009. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med*.
21. Raymond, M., M. Rubio, G. Fortin, K. H. Shalaby, H. Hammad, B. N. Lambrecht, and M. Sarfati. 2009. Selective control of SIRP-alpha-positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*.
22. Merad, M., and M. G. Manz. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113:3418-3427.
23. Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster, and E. G. Engleman. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3:1135-1141.
24. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 8:935-947.
25. Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, and S. Saeland. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71-81.
26. Ginhoux, F., M. P. Collin, M. Bogunovic, M. Abel, M. Leboeuf, J. Helft, J. Ochando, A. Kissenpfennig, B. Malissen, M. Grisotto, H. Snoeck, G. Randolph, and M. Merad. 2007. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 204:3133-3146.

27. Poulin, L. F., S. Henri, B. de Bovis, E. Devilard, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2007. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204:3119-3131.
28. Bedoui, S., P. G. Whitney, J. Waithman, L. Eidsmo, L. Wakim, I. Caminschi, R. S. Allan, M. Wojtasiak, K. Shortman, F. R. Carbone, A. G. Brooks, and W. R. Heath. 2009. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10:488-495.
29. Wu, L., and K. Shortman. 2005. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 17:304-312.
30. Vremec, D., G. J. Lieschke, A. R. Dunn, L. Robb, D. Metcalf, and K. Shortman. 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur J Immunol* 27:40-44.
31. Hamilton, J. A. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8:533-544.
32. Witmer-Pack, M. D., D. A. Hughes, G. Schuler, L. Lawson, A. McWilliam, K. Inaba, R. M. Steinman, and S. Gordon. 1993. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J Cell Sci* 104 ( Pt 4):1021-1029.
33. Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubreau, X. M. Dai, E. R. Stanley, G. J. Randolph, and M. Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7:265-273.
34. Lin, H., E. Lee, K. Hestir, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Behrens, D. Hollenbaugh, T. Linnemann, M. Qin, J. Wong, K. Chu, S. K. Doberstein, and L. T. Williams. 2008. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320:807-811.
35. Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, and M. G. Manz. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8:1207-1216.
36. Fancke, B., M. Suter, H. Hochrein, and M. O'Keeffe. 2008. M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111:150-159.
37. Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669-692.
38. Kaplan, D. H., M. O. Li, M. C. Jenison, W. D. Shlomchik, R. A. Flavell, and M. J. Shlomchik. 2007. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204:2545-2552.
39. Naik, S. H., P. Sathe, H. Y. Park, D. Metcalf, A. I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J. Y. Kwak, L. Wu, and K. Shortman. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8:1217-1226.
40. Liu, K., G. D. Victora, T. A. Schwickert, P. Guermonprez, M. M. Meredith, K. Yao, F. F. Chu, G. J. Randolph, A. Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324:392-397.
41. Bogunovic, M., F. Ginhoux, J. Helft, L. Shang, D. Hashimoto, M. Greter, K. Liu, C. Jakubzick, M. A. Ingersoll, M. Leboeuf, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, S. A. Lira, G. J. Randolph, and M. Merad. 2009. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31:513-525.

42. Walzer, T., P. Brawand, D. Swart, J. Tocker, and T. De Smedt. 2005. No defect in T-cell priming, secondary response, or tolerance induction in response to inhaled antigens in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand-deficient mice. *J Allergy Clin Immunol* 115:192-199.
43. Chorro, L., A. Sarde, M. Li, K. J. Woollard, P. Chambon, B. Malissen, A. Kissenpfennig, J. B. Barbaroux, R. Groves, and F. Geissmann. 2009. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*.
44. Kingston, D., M. A. Schmid, N. Onai, A. Obata-Onai, D. Baumjohann, and M. G. Manz. 2009. The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* 114:835-843.
45. Bogunovic, M., F. Ginhoux, A. Wagers, M. Loubeau, L. M. Isola, L. Lubrano, V. Najfeld, R. G. Phelps, C. Grosskreutz, E. Scigliano, P. S. Frenette, and M. Merad. 2006. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med* 203:2627-2638.
46. Alvarez, D., E. H. Vollmann, and U. H. von Andrian. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29:325-342.
47. Pendl, G. G., C. Robert, M. Steinert, R. Thanos, R. Eytner, E. Borges, M. K. Wild, J. B. Lowe, R. C. Fuhlbrigge, T. S. Kupper, D. Vestweber, and S. Grabbe. 2002. Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* 99:946-956.
48. Wethmar, K., Y. Helmus, K. Lühn, C. Jones, A. Laskowska, G. Varga, S. Grabbe, R. Lyck, B. Engelhardt, and M. Bixel. 2006. Migration of immature mouse DC across resting endothelium is mediated by ICAM-2 but independent of 2-integrins and murine DC-SIGN homologues. *European journal of immunology* 36.
49. Landsman, L., C. Varol, and S. Jung. 2007. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178:2000-2007.
50. Varol, C., L. Landsman, D. K. Fogg, L. Greenshtein, B. Gildor, R. Margalit, V. Kalchenko, F. Geissmann, and S. Jung. 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204:171-180.
51. Serbina, N. V., and E. G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7:311-317.
52. Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317:666-670.
53. Cavanagh, L. L., R. Bonasio, I. B. Mazo, C. Halin, G. Cheng, A. W. van der Velden, A. Cariappa, C. Chase, P. Russell, M. N. Starnbach, P. A. Koni, S. Pillai, W. Weninger, and U. H. von Andrian. 2005. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 6:1029-1037.
54. Krishnan, J., K. Selvarajoo, M. Tsuchiya, G. Lee, and S. Choi. 2007. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* 39:421-438.
55. Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee, and J. O. Lee. 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130:1071-1082.

56. Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell, and S. Ghosh. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1526.
57. Bryant, C., and K. A. Fitzgerald. 2009. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 19:455-464.
58. Ip, W. K., K. Takahashi, R. A. Ezekowitz, and L. M. Stuart. 2009. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* 230:9-21.
59. Jiang, A., O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J. A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau, and I. Mellman. 2007. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27:610-624.
60. Jakob, T., and M. C. Udey. 1998. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J Immunol* 160:4067-4073.
61. Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.
62. Sato, K., H. Kawasaki, H. Nagayama, M. Enomoto, C. Morimoto, K. Tadokoro, T. Juji, and T. A. Takahashi. 2000. TGF-beta 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *J Immunol* 164:2285-2295.
63. 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.
64. Kabashima, K., N. Shiraishi, K. Sugita, T. Mori, A. Onoue, M. Kobayashi, J. Sakabe, R. Yoshiki, H. Tamamura, N. Fujii, K. Inaba, and Y. Tokura. 2007. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol* 171:1249-1257.
65. Gollmann, G., H. Neuwirt, C. H. Tripp, H. Mueller, G. Konwalinka, C. Heufler, N. Romani, and M. Tiefenthaler. 2008. Sphingosine-1-phosphate receptor type-1 agonism impairs blood dendritic cell chemotaxis and skin dendritic cell migration to lymph nodes under inflammatory conditions. *Int Immunol* 20:911-923.
66. Lammermann, T., B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D. R. Critchley, R. Fassler, and M. Sixt. 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453:51-55.
67. Erdmann, I., E. P. Scheidegger, F. K. Koch, L. Heinzerling, B. Odermatt, G. Burg, J. B. Lowe, and T. M. Kundig. 2002. Fucosyltransferase VII-deficient mice with defective E-, P-, and L-selectin ligands show impaired CD4+ and CD8+ T cell migration into the skin, but normal extravasation into visceral organs. *J Immunol* 168:2139-2146.
68. Cera, M. R., A. Del Prete, A. Vecchi, M. Corada, I. Martin-Padura, T. Motoike, P. Tonetti, G. Bazzoni, W. Vermi, F. Gentili, S. Bernasconi, T. N. Sato, A. Mantovani, and E. Dejana. 2004. Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J Clin Invest* 114:729-738.
69. Swartz, M. A. 2001. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev* 50:3-20.

70. Bonasio, R., M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Gräbe, A. H. Lichtman, and U. H. von Andrian. 2006. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7:1092-1100.
71. Delamarre, L., H. Holcombe, and I. Mellman. 2003. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* 198:111-122.
72. Cresswell, P. 2005. Antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 207:5-7.
73. Imai, J., H. Hasegawa, M. Maruya, S. Koyasu, and I. Yahara. 2005. Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol* 17:45-53.
74. Lin, M. L., Y. Zhan, J. A. Villadangos, and A. M. Lew. 2008. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* 86:353-362.
75. Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J. F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau, and M. Desjardins. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152:165-180.
76. Gagnon, E., S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P. H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J. J. Bergeron, and M. Desjardins. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110:119-131.
77. Touret, N., P. Paroutis, M. Terebiznik, R. E. Harrison, S. Trombetta, M. Pypaert, A. Chow, A. Jiang, J. Shaw, C. Yip, H. P. Moore, N. van der Wel, D. Houben, P. J. Peters, C. de Chastellier, I. Mellman, and S. Grinstein. 2005. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123:157-170.
78. Groothuis, T. A., and J. Neefjes. 2005. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* 202:1313-1318.
79. Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe, and P. Cresswell. 2005. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol* 6:107-113.
80. Gromme, M., F. G. Uytdehaag, H. Janssen, J. Calafat, R. S. van Binnendijk, M. J. Kenter, A. Tulp, D. Verwoerd, and J. Neefjes. 1999. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10326-10331.
81. Villadangos, J. A., and L. Young. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29:352-361.
82. Hoeffel, G., A. C. Ripoche, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Escriou, P. Lebon, F. Heshmati, J. G. Guillet, M. Gannage, S. Caillat-Zucman, N. Casartelli, O. Schwartz, H. De la Salle, D. Hanau, A. Hosmalin, and C. Maranon. 2007. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27:481-492.
83. Segura, E., and J. A. Villadangos. 2009. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr Opin Immunol* 21:105-110.
84. Bennett, C. L., M. Noordegraaf, C. A. Martina, and B. E. Clausen. 2007. Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells. *J Immunol* 179:6830-6835.
85. Ballesteros-Tato, A., B. Leon, F. E. Lund, and T. D. Randall. 2010. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nat Immunol* 11:216-224.

86. Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984-993.
87. Wilson, C. B., E. Rowell, and M. Sekimata. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:91-105.
88. Amsen, D., C. G. Spilianakis, and R. A. Flavell. 2009. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol* 21:153-160.
89. Trinchieri, G., and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
90. Amsen, D., A. Antov, and R. A. Flavell. 2009. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:116-124.
91. Wang, Y. H., and Y. J. Liu. 2009. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy* 39:798-806.
92. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
93. Levy-Lahad, E., and R. S. Wildin. 2001. Neonatal diabetes mellitus, enteropathy, thrombocytopenia, and endocrinopathy: Further evidence for an X-linked lethal syndrome. *J Pediatr* 138:577-580.
94. Yamazaki, S., and R. M. Steinman. 2009. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Dermatol Sci* 54:69-75.
95. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
96. Kyewski, B., and J. Derbinski. 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4:688-698.
97. Baba, T., Y. Nakamoto, and N. Mukaida. 2009. Crucial contribution of thymic Sirp alpha<sup>+</sup> conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J Immunol* 183:3053-3063.
98. Proietto, A. I., S. van Dommelen, and L. Wu. 2009. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunol Cell Biol* 87:39-45.
99. Proietto, A. I., S. van Dommelen, P. Zhou, A. Rizzitelli, A. D'Amico, R. J. Steptoe, S. H. Naik, M. H. Lahoud, Y. Liu, P. Zheng, K. Shortman, and L. Wu. 2008. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19869-19874.
100. Khoury, S. J., L. Gallon, W. Chen, K. Betres, M. E. Russell, W. W. Hancock, C. B. Carpenter, M. H. Sayegh, and H. L. Weiner. 1995. Mechanisms of acquired thymic tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: thymic dendritic-enriched cells induce specific peripheral T cell unresponsiveness in vivo. *J Exp Med* 182:357-366.
101. Fontenot, J. D., J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202:901-906.
102. Li, J., J. Park, D. Foss, and I. Goldschneider. 2009. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* 206:607-622.

103. Hsieh, C. S., Y. Liang, A. J. Tyznik, S. G. Self, D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell receptors. *Immunity* 21:267-277.
104. Josefowicz, S. Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-625.
105. Hsieh, C. S., Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot, and A. Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7:401-410.
106. Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6:152-162.
107. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151.
108. Vang, K. B., J. Yang, S. A. Mahmud, M. A. Burchill, A. L. Vegoe, and M. A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell development. *J Immunol* 181:3285-3290.
109. Lio, C. W., and C. S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
110. Burchill, M. A., J. Yang, K. B. Vang, J. J. Moon, H. H. Chu, C. W. Lio, A. L. Vegoe, C. S. Hsieh, M. K. Jenkins, and M. A. Farrar. 2008. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28:112-121.
111. Burchill, M. A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar, and M. A. Farrar. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 178:280-290.
112. Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A. B. Kulkarni, S. Perruche, and W. Chen. 2008. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 9:632-640.
113. Zheng, S. G., J. H. Wang, W. Stohl, K. S. Kim, J. D. Gray, and D. A. Horwitz. 2006. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells. *J Immunol* 176:3321-3329.
114. Kim, J. M., and A. Rudensky. 2006. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212:86-98.
115. Bour-Jordan, H., and J. A. Bluestone. 2009. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* 229:41-66.
116. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
117. Barrat, F. J., D. J. Cua, A. Boonstra, D. F. Richards, C. Crain, H. F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R. L. Coffman, C. M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195:603-616.
118. Vieira, P. L., J. R. Christensen, S. Minaee, E. J. O'Neill, F. J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D. C. Wraith, and A. O'Garra. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 172:5986-5993.

119. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
120. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2007. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev* 220:199-213.
121. Battaglia, M., A. Stabilini, E. Draghici, S. Gregori, C. Mocchetti, E. Bonifacio, and M. G. Roncarolo. 2006. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 55:40-49.
122. Carrier, Y., J. Yuan, V. K. Kuchroo, and H. L. Weiner. 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol* 178:172-178.
123. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature immunology* 6:1219-1227.
124. Faria, A. M., and H. L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev* 206:232-259.
125. Yamazaki, S., A. J. Bonito, R. Spisek, M. Dhodapkar, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2007. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* 110:4293-4302.
126. Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317:256-260.
127. Maynard, C. L., R. D. Hatton, W. S. Helms, J. R. Oliver, C. B. Stephensen, and C. T. Weaver. 2009. Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells. *J Exp Med* 206:343-357.
128. Yamazaki, S., D. Dudziak, G. F. Heidkamp, C. Fiorese, A. J. Bonito, K. Inaba, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2008. CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 181:6923-6933.
129. Wang, L., K. Pino-Lagos, V. C. de Vries, I. Guleria, M. H. Sayegh, and R. J. Noelle. 2008. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9331-9336.
130. Travis, M. A., B. Reizis, A. C. Melton, E. Masteller, Q. Tang, J. M. Proctor, Y. Wang, X. Bernstein, X. Huang, L. F. Reichardt, J. A. Bluestone, and D. Sheppard. 2007. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449:361-365.
131. Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph, and J. S. Bromberg. 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7:652-662.
132. Hadeiba, H., T. Sato, A. Habtezion, C. Oderup, J. Pan, and E. C. Butcher. 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9:1253-1260.
133. 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.



134. 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.
135. Miyara, M., and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13:108-116.
136. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322:271-275.
137. Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille, and M. L. Dustin. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 203:505-511.
138. Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7:83-92.
139. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4:762-774.
140. Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B. C. McGrath, D. R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 176:6752-6761.
141. Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10398-10403.
142. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30:1538-1543.
143. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
144. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645.
145. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T. C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 166:3008-3018.
146. Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell, and K. J. Wood. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168:1080-1086.
147. 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.
148. McGeachy, M. J., L. A. Stephens, and S. M. Anderton. 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175:3025-3032.
149. Hawrylowicz, C. M., and A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5:271-283.

150. Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller, and A. Y. Rudensky. 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28:546-558.
151. Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E. M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196:237-246.
152. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644.
153. Green, E. A., L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran, and R. A. Flavell. 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10878-10883.
154. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201:737-746.
155. Li, M. O., Y. Y. Wan, and R. A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26:579-591.
156. Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
157. Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
158. Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646.
159. Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, and E. M. Shevach. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107:3925-3932.
160. Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong, and Y. Wang. 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ* 14:2076-2084.
161. Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R. I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109:2058-2065.
162. Mahalingam, D., E. Szegezdi, M. Keane, S. Jong, and A. Samali. 2009. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev* 35:280-288.
163. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2480-2488.
164. Duthoit, C. T., D. J. Mekala, R. S. Alli, and T. L. Geiger. 2005. Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4+ T cells by regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes. *J Immunol* 174:155-163.

165. Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8:1353-1362.
166. Zarek, P. E., C. T. Huang, E. R. Lutz, J. Kowalski, M. R. Horton, J. Linden, C. G. Drake, and J. D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111:251-259.
167. Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enyoloji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
168. 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.
169. Green, J. M., A. Zhelesnyak, J. Chung, F. P. Lindberg, M. Sarfati, W. A. Frazier, and E. J. Brown. 1999. Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* 146:673-682.
170. Rebres, R. A., J. M. Green, M. I. Reinhold, M. Ticchioni, and E. J. Brown. 2001. Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells. *J Biol Chem* 276:7672-7680.
171. Rebres, R. A., L. E. Vaz, J. M. Green, and E. J. Brown. 2001. Normal ligand binding and signaling by CD47 (integrin-associated protein) requires a long range disulfide bond between the extracellular and membrane-spanning domains. *J Biol Chem* 276:34607-34616.
172. Isenberg, J. S., J. B. Maxhimer, F. Hyodo, M. L. Pendrak, L. A. Ridnour, W. G. DeGraff, M. Tsokos, D. A. Wink, and D. D. Roberts. 2008. Thrombospondin-1 and CD47 limit cell and tissue survival of radiation injury. *Am J Pathol* 173:1100-1112.
173. Brown, E. J., and W. A. Frazier. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11:130-135.
174. Koning, N., L. Bo, R. M. Hoek, and I. Huitinga. 2007. Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 62:504-514.
175. Rendtlew Danielsen, J. M., L. M. Knudsen, I. M. Dahl, M. Lodahl, and T. Rasmussen. 2007. Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *Br J Haematol* 138:756-760.
176. Majeti, R., M. P. Chao, A. A. Alizadeh, W. W. Pang, S. Jaiswal, K. D. Gibbs, Jr., N. van Rooijen, and I. L. Weissman. 2009. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138:286-299.
177. Subramanian, S., R. Parthasarathy, S. Sen, E. T. Boder, and D. E. Discher. 2006. Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRPalpha. *Blood* 107:2548-2556.
178. van den Berg, T. K., and C. E. van der Schoot. 2008. Innate immune 'self' recognition: a role for CD47-SIRPalpha interactions in hematopoietic stem cell transplantation. *Trends Immunol* 29:203-206.

179. Kong, X. N., H. X. Yan, L. Chen, L. W. Dong, W. Yang, Q. Liu, L. X. Yu, D. D. Huang, S. Q. Liu, H. Liu, M. C. Wu, and H. Y. Wang. 2007. LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein {alpha} contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med* 204:2719-2731.
180. Lawler, J. 2000. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 12:634-640.
181. Isenberg, J. S., D. S. Annis, M. L. Pendrak, M. Ptaszynska, W. A. Frazier, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2009. Differential interactions of thrombospondin-1, -2, and -4 with CD47 and effects on cGMP signaling and ischemic injury responses. *J Biol Chem* 284:1116-1125.
182. Li, S. S., A. Ivanoff, S. E. Bergstrom, A. Sandstrom, B. Christensson, J. van Nerven, J. Holgersson, D. Hauzenberger, I. Arencibia, and K. G. Sundqvist. 2002. T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur J Immunol* 32:1069-1079.
183. Marteau, F., N. S. Gonzalez, D. Communi, M. Goldman, and J. M. Boeynaems. 2005. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood* 106:3860-3866.
184. Masli, S., B. Turpie, K. H. Hecker, and J. W. Streilein. 2002. Expression of thrombospondin in TGFbeta-treated APCs and its relevance to their immune deviation-promoting properties. *J Immunol* 168:2264-2273.
185. 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.
186. Raugi, G. J., S. M. Mumby, C. A. Ready, and P. Bornstein. 1984. Location and partial characterization of the heparin-binding fragment of platelet thrombospondin. *Thromb Res* 36:165-175.
187. Bornstein, P. 2001. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 107:929-934.
188. Lindberg, F. P., H. D. Gresham, M. I. Reinhold, and E. J. Brown. 1996. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *J Cell Biol* 134:1313-1322.
189. Gao, A. G., F. P. Lindberg, J. M. Dimitry, E. J. Brown, and W. A. Frazier. 1996. Thrombospondin modulates alpha v beta 3 function through integrin-associated protein. *J Cell Biol* 135:533-544.
190. Seiffert, M., C. Cant, Z. Chen, I. Rappold, W. Brugger, L. Kanz, E. J. Brown, A. Ullrich, and H. J. Buhring. 1999. Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. *Blood* 94:3633-3643.
191. Demeure, C. E., H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 164:2193-2199.
192. 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.

193. Li, Z., L. He, K. Wilson, and D. Roberts. 2001. Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation. *J Immunol* 166:2427-2436.
194. 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.
195. 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.
196. Roue, G., N. Bitton, V. J. Yuste, T. Montange, M. Rubio, F. Dessauge, C. Delettre, H. Merle-Beral, M. Sarfati, and S. A. Susin. 2003. Mitochondrial dysfunction in CD47-mediated caspase-independent cell death: ROS production in the absence of cytochrome c and AIF release. *Biochimie* 85:741-746.
197. 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.
198. Johansson, U., K. Higginbottom, and M. Londei. 2004. CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells. *Scand J Immunol* 59:40-49.
199. Head, D. J., Z. E. Lee, M. M. Swallah, and N. D. Avent. 2005. Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability in vitro. *Br J Haematol* 130:788-790.
200. 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.
201. Manna, P. P., and W. A. Frazier. 2003. The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein kinase A. *J Immunol* 170:3544-3553.
202. 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.
203. Bras, M., V. J. Yuste, G. Roue, S. Barbier, P. Sancho, C. Virely, M. Rubio, S. Baudet, J. E. Esquerda, H. Merle-Beral, M. Sarfati, and S. A. Susin. 2007. Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 27:7073-7088.
204. 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.
205. Khandelwal, S., N. van Rooijen, and R. K. Saxena. 2007. Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation. *Transfusion* 47:1725-1732.
206. Anniss, A. M., and R. L. Sparrow. 2002. Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci* 27:233-238.
207. Nilsson, A., and P. A. Oldenborg. 2009. CD47 promotes both phosphatidylserine-independent and phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic murine thymocytes by non-activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 387:58-63.

208. Wang, H., M. L. Madariaga, S. Wang, N. Van Rooijen, P. A. Oldenborg, and Y. G. Yang. 2007. Lack of CD47 on nonhematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47null cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13744-13749.
209. Takenaka, K., T. K. Prasolava, J. C. Wang, S. M. Mortin-Toth, S. Khalouei, O. I. Gan, J. E. Dick, and J. S. Danska. 2007. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 8:1313-1323.
210. Ide, K., H. Wang, H. Tahara, J. Liu, X. Wang, T. Asahara, M. Sykes, Y. G. Yang, and H. Ohdan. 2007. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5062-5066.
211. Barclay, A. N. 2009. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol* 21:47-52.
212. Cooper, D., F. P. Lindberg, J. R. Gamble, E. J. Brown, and M. A. Vadas. 1995. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3978-3982.
213. Zen, K., and Y. Liu. 2008. Role of different protein tyrosine kinases in fMLP-induced neutrophil transmigration. *Immunobiology* 213:13-23.
214. Chin, A. C., B. Fournier, E. J. Peatman, T. A. Reaves, W. Y. Lee, and C. A. Parkos. 2009. CD47 and TLR-2 cross-talk regulates neutrophil transmigration. *J Immunol* 183:5957-5963.
215. Rosseau, S., J. Selhorst, K. Wiechmann, K. Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2000. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164:427-435.
216. de Vries, H. E., J. J. Hendriks, H. Honing, C. R. De Lavalette, S. M. van der Pol, E. Hooijberg, C. D. Dijkstra, and T. K. van den Berg. 2002. Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol* 168:5832-5839.
217. 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.
218. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
219. Campbell, D. J., and S. F. Ziegler. 2007. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature reviews* 7:305-310.
220. Kim, J. M., J. P. Rasmussen, and A. Y. Rudensky. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology* 8:191-197.
221. Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B. L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *The Journal of experimental medicine* 198:737-746.
222. Nishioka, T., J. Shimizu, R. Iida, S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 2006. CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+CD25-Foxp3+ T cells in aged mice. *J Immunol* 176:6586-6593.
223. Sharma, S., A. L. Dominguez, and J. Lustgarten. 2006. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *J Immunol* 177:8348-8355.

224. Denning, T. L., G. Kim, and M. Kronenberg. 2005. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis. *J Immunol* 174:7487-7491.
225. Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowicz, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, and D. J. Campbell. 2007. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine* 204:1335-1347.
226. Suffia, I., S. K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 174:5444-5455.
227. Chen, Z., A. E. Herman, M. Matos, D. Mathis, and C. Benoist. 2005. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 202:1387-1397.
228. Belkaid, Y. 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature reviews* 7:875-888.
229. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198:1875-1886.
230. Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
231. 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.
232. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *J Immunol* 167:2459-2468.
233. Grimbert, P., S. Bouguermouh, N. Baba, T. Nakajima, Z. Allakhverdi, D. Braun, H. Saito, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2006. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *J Immunol* 177:3534-3541.
234. Valmori, D., A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Hesdorffer, and M. Ayyoub. 2005. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *The Journal of clinical investigation* 115:1953-1962.
235. Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan, and A. N. Akbar. 2006. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *The Journal of clinical investigation* 116:2423-2433.
236. Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C. A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 199:303-313.
237. Schneider, M. A., J. G. Meingassner, M. Lipp, H. D. Moore, and A. Rot. 2007. CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 204:735-745.

238. Manna, P. P., J. Dimitry, P. A. Oldenborg, and W. A. Frazier. 2005. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 280:29637-29644.
239. Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194:769-779.
240. Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6:769-776.
241. Seder, R. A., W. E. Paul, M. M. Davis, and B. Fazekas de St Groth. 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 176:1091-1098.
242. LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8:630-638.
243. Badovinac, V. P., K. A. Messingham, A. Jabbari, J. S. Haring, and J. T. Harty. 2005. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* 11:748-756.
244. Trumpheller, C., J. S. Finke, C. B. Lopez, T. M. Moran, B. Moltedo, H. Soares, Y. Huang, S. J. Schlesinger, C. G. Park, M. C. Nussenzweig, A. Granelli-Piperno, and R. M. Steinman. 2006. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 203:607-617.
245. Finke, D., M. L. Eloranta, and L. Ronnblom. 2009. Endogenous type I interferon inducers in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 42:349-352.
246. Ronnblom, L., and V. Pascual. 2008. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 17:394-399.
247. Lehmann, P., and B. Homey. 2009. Clinic and pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 8:456-461.
248. Gottlieb, A. B., F. Chamian, S. Masud, I. Cardinale, M. V. Abello, M. A. Lowes, F. Chen, M. Magliocco, and J. G. Krueger. 2005. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol* 175:2721-2729.
249. Lowes, M. A., F. Chamian, M. V. Abello, J. Fuentes-Duculan, S. L. Lin, R. Nussbaum, I. Novitskaya, H. Carbonaro, I. Cardinale, T. Kikuchi, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, K. M. Wittkowski, K. Papp, M. Garovoy, W. Dummer, R. M. Steinman, and J. G. Krueger. 2005. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19057-19062.
250. Kelsall, B. L. 2008. Innate and adaptive mechanisms to control [corrected] pathological intestinal inflammation. *J Pathol* 214:242-259.
251. te Velde, A. A., F. de Kort, E. Sterrenburg, I. Pronk, F. J. ten Kate, D. W. Hommes, and S. J. van Deventer. 2007. Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13:325-330.
252. Lambrecht, B. N., and H. Hammad. 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 3:994-1003.



253. Hammad, H., and B. N. Lambrecht. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8:193-204.
254. Buc, M., M. Dzurilla, M. Vrlík, and M. Bucova. 2009. Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57:331-344.
255. Lambrecht, B. N., M. De Veerman, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, K. Thielemans, and R. A. Pauwels. 2000. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 106:551-559.
256. van Rijt, L. S., S. Jung, A. Kleinjan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201:981-991.
257. Nchinda, G., J. Kuroiwa, M. Oks, C. Trumpfheller, C. G. Park, Y. Huang, D. Hannaman, S. J. Schlesinger, O. Mizenina, M. C. Nussenzweig, K. Uberla, and R. M. Steinman. 2008. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest* 118:1427-1436.
258. Grossmann, C., M. Tenbusch, G. Nchinda, V. Temchura, G. Nabi, G. W. Stone, R. S. Kornbluth, and K. Uberla. 2009. Enhancement of the priming efficacy of DNA vaccines encoding dendritic cell-targeted antigens by synergistic toll-like receptor ligands. *BMC Immunol* 10:43.
259. Bosma, B. M., H. J. Metselaar, J. H. Gerrits, N. M. van Besouw, S. Mancham, Z. M. Groothuis-mink, P. P. Boor, L. J. van der Laan, H. W. Tilanus, E. J. Kuipers, and J. Kwekkeboom. 2010. Migration of allosensitizing donor myeloid dendritic cells into recipients after liver transplantation. *Liver Transpl* 16:12-22.
260. Suciú-Foca, N., P. Berloco, and R. Cortesini. 2009. Tolerogenic dendritic cells in cancer, transplantation, and autoimmune diseases. *Hum Immunol* 70:277-280.
261. Fu, B. M., X. S. He, S. Yu, A. B. Hu, J. Zhang, Y. Ma, N. L. Tam, and J. F. Huang. 2009. A tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by activation of antigen-specific CD4+CD25+ T regulatory cells that promotes skin allograft survival in mice. *Cell Immunol*.
262. Dai, H., H. Zhu, P. Lei, H. Yagita, J. Liu, X. Wen, W. Zhou, F. Gong, G. Shen, and M. Fang. 2009. Programmed death-1 signaling is essential for the skin allograft protection by alternatively activated dendritic cell infusion in mice. *Transplantation* 88:864-873.
263. Mumprecht, S., C. Schurch, J. Schwaller, M. Solenthaler, and A. F. Ochsenbein. 2009. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 114:1528-1536.
264. Vicari, A. P., C. Caux, and G. Trinchieri. 2002. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 12:33-42.
265. Ghiringhelli, F., P. E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202:919-929.
266. Aspod, C., A. Pedroza-Gonzalez, M. Gallegos, S. Tindle, E. C. Burton, D. Su, F. Marches, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2007. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* 204:1037-1047.

267. Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, and L. Zitvogel. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5:405-411.
268. Banchereau, J., and A. K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296-306.
269. Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, T. G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P. O. Fritsch, N. Romani, and G. Schuler. 2002. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 195:1279-1288.
270. De Vries, I. J., D. J. Krooshoop, N. M. Scharenborg, W. J. Lesterhuis, J. H. Diepstra, G. N. Van Muijen, S. P. Strijk, T. J. Ruers, O. C. Boerman, W. J. Oyen, G. J. Adema, C. J. Punt, and C. G. Figdor. 2003. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 63:12-17.
271. Verdijk, P., E. H. Aarntzen, W. J. Lesterhuis, A. C. Boullart, E. Kok, M. M. van Rossum, S. Strijk, F. Eijckeler, J. J. Bonenkamp, J. F. Jacobs, W. Blokx, J. H. Vankrieken, I. Joosten, O. C. Boerman, W. J. Oyen, G. Adema, C. J. Punt, C. G. Figdor, and I. J. de Vries. 2009. Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 15:2531-2540.
272. Liu, H. Y., A. C. Buenafe, A. Matejuk, A. Ito, A. Zamora, J. Dwyer, A. A. Vandenberg, and H. Offner. 2002. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *J Neurosci Res* 70:238-248.
273. Kavousanaki, M., A. Makrigiannakis, D. Boumpas, and P. Verginis. 2009. Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: Induction of interleukin-10-producing treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis Rheum* 62:53-63.
274. Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, T. Muller, T. Soullie, M. A. Willart, D. Hijdra, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2006. Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest* 116:2935-2944.
275. Lambrecht, B. N., and H. Hammad. 2009. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31:412-424.
276. Hammad, H., H. J. de Heer, T. Soullie, H. C. Hoogsteden, F. Trottein, and B. N. Lambrecht. 2003. Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol* 171:3936-3940.
277. Shi, L., S. W. Leu, F. Xu, X. Zhou, H. Yin, L. Cai, and L. Zhang. 2008. Local blockade of TSLP receptor alleviated allergic disease by regulating airway dendritic cells. *Clin Immunol* 129:202-210.
278. Braun, D., L. Galibert, T. Nakajima, H. Saito, V. V. Quang, M. Rubio, and M. Sarfati. 2006. Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein-alpha ligation and maturation signals. *J Immunol* 177:8550-8559.

279. Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Forster. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21:279-288.
280. Hagnerud, S., P. P. Manna, M. Cella, A. Stenberg, W. A. Frazier, M. Colonna, and P. A. Oldenborg. 2006. Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. *J Immunol* 176:5772-5778.
281. 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.
282. Sano, S., H. Ohnishi, and M. Kubota. 1999. Gene structure of mouse BIT/SHPS-1. *Biochem J* 344 Pt 3:667-675.
283. Loser, K., A. Mehling, S. Loeser, J. Apelt, A. Kuhn, S. Grabbe, T. Schwarz, J. M. Penninger, and S. Beissert. 2006. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med* 12:1372-1379.
284. Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe, and K. Shortman. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7:663-671.
285. Guimont-Desrochers, F., C. Beauchamp, G. Chabot-Roy, V. Dugas, E. E. Hillhouse, J. Dusseault, G. Langlois, P. Gautier-Ethier, J. Darwiche, M. Sarfati, and S. Lesage. 2009. Absence of CD47 in vivo influences thymic dendritic cell subset proportions but not negative selection of thymocytes. *Int Immunol* 21:167-177.
286. Sathe, P., and K. Shortman. 2008. The steady-state development of splenic dendritic cells. *Mucosal Immunol* 1:425-431.
287. Dunne, P. J., B. Moran, R. C. Cummins, and K. H. Mills. 2009. CD11c+CD8alpha+ dendritic cells promote protective immunity to respiratory infection with *Bordetella pertussis*. *J Immunol* 183:400-410.
288. Manicone, A. M., I. Huizar, and J. K. McGuire. 2009. Matrilysin (Matrix Metalloproteinase-7) regulates anti-inflammatory and antifibrotic pulmonary dendritic cells that express CD103 (alpha(E)beta(7)-integrin). *Am J Pathol* 175:2319-2331.
289. Strauch, U. G., N. Grunwald, F. Obermeier, S. Gurster, and H. C. Rath. 2010. Loss of CD103+ intestinal dendritic cells during colonic inflammation. *World J Gastroenterol* 16:21-29.
290. Siddiqui, K. R., and F. Powrie. 2008. CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1:S34-38.
291. Iliev, I. D., I. Spadoni, E. Mileti, G. Matteoli, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, D. Foschi, F. Caprioli, G. Viale, and M. Rescigno. 2009. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58:1481-1489.
292. 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.
293. Shannon, J. G., D. Howe, and R. A. Heinzen. 2005. Lack of dendritic cell maturation following infection by *Coxiella burnetii* synthesizing different lipopolysaccharide chemotypes. *Ann N Y Acad Sci* 1063:154-160.

294. Coutanceau, E., J. Decalf, A. Martino, A. Babon, N. Winter, S. T. Cole, M. L. Albert, and C. Demangel. 2007. Selective suppression of dendritic cell functions by *Mycobacterium ulcerans* toxin mycolactone. *J Exp Med* 204:1395-1403.
295. Biedzka-Sarek, M., and M. El Skurnik. 2006. How to outwit the enemy: dendritic cells face *Salmonella*. *APMIS* 114:589-600.
296. Khader, S. A., S. Partida-Sanchez, G. Bell, D. M. Jelley-Gibbs, S. Swain, J. E. Pearl, N. Ghilardi, F. J. Desauvage, F. E. Lund, and A. M. Cooper. 2006. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 203:1805-1815.
297. Bozza, S., R. Gaziano, A. Spreca, A. Bacci, C. Montagnoli, P. di Francesco, and L. Romani. 2002. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol* 168:1362-1371.
298. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.
299. Curotto de Lafaille, M. A., and J. J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635.
300. Dejaco, C., C. Duftner, and M. Schirmer. 2006. Are regulatory T-cells linked with aging? *Exp Gerontol* 41:339-345.
301. Belkaid, Y., and K. Tarbell. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*). *Annu Rev Immunol* 27:551-589.
302. Battaglia, M., A. Stabilini, and M. G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105:4743-4748.
303. Kopf, H., G. M. de la Rosa, O. M. Howard, and X. Chen. 2007. Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *Int Immunopharmacol* 7:1819-1824.
304. Gao, W., Y. Lu, B. El Essawy, M. Oukka, V. K. Kuchroo, and T. B. Strom. 2007. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant* 7:1722-1732.
305. Jee, Y., W. H. Piao, R. Liu, X. F. Bai, S. Rhodes, R. Rodebaugh, D. I. Campagnolo, F. D. Shi, and T. L. Vollmer. 2007. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells contribute to the therapeutic effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 125:34-42.
306. Akdis, M., and C. A. Akdis. 2007. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119:780-791.
307. Zhao, L., L. Sun, H. Wang, H. Ma, G. Liu, and Y. Zhao. 2007. Changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice. *J Leukoc Biol* 81:1386-1394.
308. Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
309. Lages, C. S., I. Suffia, P. A. Velilla, B. Huang, G. Warshaw, D. A. Hildeman, Y. Belkaid, and C. Chougnet. 2008. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol* 181:1835-1848.

310. Gregg, R., C. M. Smith, F. J. Clark, D. Dunnion, N. Khan, R. Chakraverty, L. Nayak, and P. A. Moss. 2005. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 140:540-546.
311. Trzonkowski, P., E. Szmit, J. Mysliwska, and A. Mysliwski. 2006. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence. *Clin Immunol* 119:307-316.
312. Tsaknaridis, L., L. Spencer, N. Culbertson, K. Hicks, D. LaTocha, Y. K. Chou, R. H. Whitham, A. Bakke, R. E. Jones, H. Offner, D. N. Bourdette, and A. A. Vandenbark. 2003. Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res* 74:296-308.
313. Weiskopf, D., B. Weinberger, and B. Grubeck-Loebenstein. 2009. The aging of the immune system. *Transpl Int* 22:1041-1050.
314. Lansdorp, P. M., W. Dragowska, T. E. Thomas, M. T. Little, and H. Mayani. 1994. Age-related decline in proliferative potential of purified stem cell candidates. *Blood Cells* 20:376-380; discussion 380-371.
315. Hartsock, R. J., E. B. Smith, and C. S. Petty. 1965. Normal Variations with Aging of the Amount of Hematopoietic Tissue in Bone Marrow from the Anterior Iliac Crest. A Study Made from 177 Cases of Sudden Death Examined by Necropsy. *Am J Clin Pathol* 43:326-331.
316. Vaziri, H., W. Dragowska, R. C. Allsopp, T. E. Thomas, C. B. Harley, and P. M. Lansdorp. 1994. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9857-9860.
317. Plackett, T. P., E. D. Boehmer, D. E. Faunce, and E. J. Kovacs. 2004. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* 76:291-299.
318. Wenisch, C., S. Patruta, F. Daxbock, R. Krause, and W. Horl. 2000. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 67:40-45.
319. Swift, M. E., A. L. Burns, K. L. Gray, and L. A. DiPietro. 2001. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol* 117:1027-1035.
320. Plowden, J., M. Renshaw-Hoelscher, C. Engleman, J. Katz, and S. Sambhara. 2004. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3:161-167.
321. Johnson, S. A., and J. C. Cambier. 2004. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. *Arthritis Res Ther* 6:131-139.
322. Goronzy, J. J., and C. M. Weyand. 2005. T cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 17:468-475.
323. George, A. J., and M. A. Ritter. 1996. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 17:267-272.
324. Pfister, G., D. Weiskopf, L. Lazard, R. D. Kovaïou, D. P. Cioca, M. Keller, B. Lorbeg, W. Parson, and B. Grubeck-Loebenstein. 2006. Naive T cells in the elderly: are they still there? *Ann N Y Acad Sci* 1067:152-157.
325. Kohler, S., U. Wagner, M. Pierer, S. Kimmig, B. Oppmann, B. Mowes, K. Julke, C. Romagnani, and A. Thiel. 2005. Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur J Immunol* 35:1987-1994.
326. Haynes, L., S. M. Eaton, E. M. Burns, T. D. Randall, and S. L. Swain. 2003. CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory

- generated from aged naive cells functions poorly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15053-15058.
327. Vallejo, A. N. 2005. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* 205:158-169.
328. Agrawal, A., S. Agrawal, and S. Gupta. 2007. Dendritic cells in human aging. *Exp Gerontol* 42:421-426.
329. Grolleau-Julius, A., E. K. Harning, L. M. Abernathy, and R. L. Yung. 2008. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res* 68:6341-6349.
330. Grolleau-Julius, A., L. Abernathy, E. Harning, and R. L. Yung. 2009. Mechanisms of murine dendritic cell antitumor dysfunction in aging. *Cancer Immunol Immunother* 58:1935-1939.
331. Lin, Y. C., L. Y. Chang, C. T. Huang, H. M. Peng, A. Dutta, T. C. Chen, C. T. Yeh, and C. Y. Lin. 2009. Effector/memory but not naive regulatory T cells are responsible for the loss of concomitant tumor immunity. *J Immunol* 182:6095-6104.
332. Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, and D. C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169:2756-2761.
333. Woo, E. Y., C. S. Chu, T. J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S. C. Rubin, L. R. Kaiser, and C. H. June. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61:4766-4772.
334. Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
335. Sasada, T., M. Kimura, Y. Yoshida, M. Kanai, and A. Takabayashi. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98:1089-1099.
336. Dannull, J., Z. Su, D. Rizzieri, B. K. Yang, D. Coleman, D. Yancey, A. Zhang, P. Dahm, N. Chao, E. Gilboa, and J. Vieweg. 2005. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 115:3623-3633.
337. Mahnke, K., K. Schonfeld, S. Fondel, S. Ring, S. Karakhanova, K. Wiedemeyer, T. Bedke, T. S. Johnson, V. Storn, S. Schallenberg, and A. H. Enk. 2007. Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 120:2723-2733.
338. Lutsiak, M. E., R. T. Semnani, R. De Pascalis, S. V. Kashmiri, J. Schlom, and H. Sabzevari. 2005. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 105:2862-2868.
339. Ghiringhelli, F., C. Menard, P. E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, E. Solary, A. Le Cesne, L. Zitvogel, and B. Chauffert. 2007. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK

- effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 56:641-648.
340. Jaiswal, S., C. H. Jamieson, W. W. Pang, C. Y. Park, M. P. Chao, R. Majeti, D. Traver, N. van Rooijen, and I. L. Weissman. 2009. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138:271-285.
341. Zhao, D., C. Zhang, T. Yi, C. L. Lin, I. Todorov, F. Kandeel, S. Forman, and D. Zeng. 2008. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* 112:2129-2138.
342. Allan, S. E., R. Broady, S. Gregori, M. E. Himmel, N. Locke, M. G. Roncarolo, R. Bacchetta, and M. K. Levings. 2008. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 223:391-421.
343. Zhu, J., T. S. Davidson, G. Wei, D. Jankovic, K. Cui, D. E. Schones, L. Guo, K. Zhao, E. M. Shevach, and W. E. Paul. 2009. Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103+ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 206:329-341.
344. Cassan, C., E. Piaggio, J. P. Zappulla, L. T. Mars, N. Couturier, F. Bucciarelli, S. Desbois, J. Bauer, D. Gonzalez-Dunia, and R. S. Liblau. 2006. Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177:1552-1560.
345. Montero, E., G. Nussbaum, J. F. Kaye, R. Perez, A. Lage, A. Ben-Nun, and I. R. Cohen. 2004. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun* 23:1-7.
346. Hori, S., M. Haury, A. Coutinho, and J. Demengeot. 2002. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8213-8218.
347. Kohm, A. P., P. A. Carpentier, H. A. Anger, and S. D. Miller. 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169:4712-4716.
348. Xiao, S., X. Zhang, K. K. Mann, S. Jodo, L. Li, W. N. Jarjour, A. Marshak-Rothstein, D. H. Sherr, and S. T. Ju. 2004. Changes in sensitivity of peripheral lymphocytes of autoimmune gld mice to FasL-mediated apoptosis reveal a mechanism for the preferential deletion of CD4-CD8-B220+ T cells. *Int Immunol* 16:759-766.
349. Kohlhaas, S., O. A. Garden, C. Scudamore, M. Turner, K. Okkenhaug, and E. Vigorito. 2009. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. *J Immunol* 182:2578-2582.
350. Junker, A., M. Krumbholz, S. Eisele, H. Mohan, F. Augstein, R. Bittner, H. Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and E. Meinl. 2009. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain* 132:3342-3352.
351. Haas, J., B. Fritzsching, P. Trubswetter, M. Korporal, L. Milkova, B. Fritz, D. Vobis, P. H. Krammer, E. Suri-Payer, and B. Wildemann. 2007. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 179:1322-1330.

352. Haas, J., A. Hug, A. Viehover, B. Fritzsching, C. S. Falk, A. Filser, T. Vetter, L. Milkova, M. Korporal, B. Fritz, B. Storch-Hagenlocher, P. H. Krammer, E. Suri-Payer, and B. Wildemann. 2005. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35:3343-3352.
353. de Andres, C., C. Aristimuno, V. de Las Heras, M. L. Martinez-Gines, M. Bartolome, R. Arroyo, J. Navarro, S. Gimenez-Roldan, E. Fernandez-Cruz, and S. Sanchez-Ramon. 2007. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 182:204-211.
354. Darrasse-Jeze, G., S. Deroubaix, H. Mouquet, G. D. Victora, T. Eisenreich, K. H. Yao, R. F. Masilamani, M. L. Dustin, A. Rudensky, K. Liu, and M. C. Nussenzweig. 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 206:1853-1862.
355. Ohnmacht, C., A. Pullner, S. B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, and D. Voehringer. 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206:549-559.
356. Chen, M., Y. H. Wang, Y. Wang, L. Huang, H. Sandoval, Y. J. Liu, and J. Wang. 2006. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311:1160-1164.
357. Raymond, M., M. Rubio, G. Fortin, K. H. Shalaby, H. Hammad, B. N. Lambrecht, and M. Sarfati. 2009. Selective control of SIRP-alpha-positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 124:1333-1342 e1331.