

Université de Montréal

**Caractérisation immunogénétique des cellules
dendritiques non-conventionnelles dans un contexte
auto-immun**

par

Adam-Nicolas Pelletier

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Microbiologie et Immunologie

15 août 2017

© Adam-Nicolas Pelletier, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse est intitulée :
Caractérisation immunogénétique des cellules dendritiques non-conventionnelles dans un
contexte auto-immun

Présentée par : Adam-Nicolas Pelletier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martin Guimond, président-rapporteur
Dre Sylvie Lesage, directeur de recherche
Dr Petronella Ancuta, membre du jury
Dre Constantin Polychronakos, examinateur externe
Dr Mike Sapiuha, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les cellules dendritiques (DC) agissent en tant que joueur clé dans l'interaction entre l'immunité innée et adaptative via leur fonction de cellule présentatrice d'antigène professionnelle. Ces dernières, qui se divisent en plusieurs sous-populations aux fonctions distinctes, sont impliquées dans des contextes inflammatoires ou tolérogènes. On observe d'ailleurs des corrélations entre le nombre de certaines de ces populations *in vivo* et la susceptibilité génétique à certaines maladies, comme le diabète auto-immun.

Cependant, il reste difficile d'établir si ces corrélations sont en fait causales, puisque l'on ignore l'identité des facteurs responsables de la régulation spécifique du nombre des sous-types de DC, limitant notre capacité à moduler ces phénotypes indépendamment. Nous avons donc voulu identifier les déterminants génétiques impliqués dans la régulation spécifique du nombre de sous-populations de DC via des analyses de liaison génétique, pour ensuite vérifier si la susceptibilité au diabète auto-immun varie suite à des modulations du nombre de sous-types de DC.

Nous avons démontré qu'une augmentation de pDC chez la souris NOD, prédisposée au diabète auto-immun, est régulée par un locus dominant sur le chromosome 7 proximal, mais n'influence pas l'incidence du diabète dans des études de souris congéniques. En contraste, une augmentation d'un nouveau sous-type de DC, dénommé mcDC, est régulée par un intervalle distal du chromosome 2. Cet intervalle, nommé *Idd13*, est d'ailleurs également associé à la susceptibilité génétique au diabète auto-immun, suggérant un rôle central du

nombre de mcDC dans la maladie, possiblement via leur capacité à renverser l'anergie de lymphocytes T.

Ces résultats démontrent que les sous-types de DC sont régulés par des déterminants distincts. Malgré les corrélations entre le nombre de pDC/mcDC et la susceptibilité au diabète auto-immun, nos résultats démontrent également une contribution divergente des sous-types de DC à la maladie. Nous investiguerons davantage les intervalles génétiques, afin d'identifier les gènes candidats impliqués dans la régulation du pDC et du mcDC.

Mots-clés : Cellules dendritiques, auto-immunité, génétique, diabète, immuno-déficiences

Abstract

Dendritic cells (DC) play a key role in the immune system by bridging the innate and adaptive immune system using their Antigen Presenting Cell (APC) function. They can be subdivided into several subsets with distinct features, which are involved in either tolerogenic or inflammatory processes. Variations in the *in vivo* number of those DC subsets have been associated with genetic susceptibility to certain diseases, such as autoimmune diabetes.

However, proving a causal connection from these correlations remains a challenge, as we have not identified the factors involved in the specific regulation of the DC subsets number, limiting our ability to modulate these phenotypes independently. Thus, we aimed to identify genetic determinants responsible for the specific regulation of DC subset numbers using linkage analysis in mice, to then determine if autoimmune diabetes susceptibility varies following DC subset modulations.

We have shown an increase in pDC number in NOD mice, which is genetically susceptible to autoimmune diabetes. This phenotype is regulated by a dominant locus on proximal chromosome 7, but it is not associated with diabetes incidence in congenic mice. In contrast, we also observe an increase in the number of a novel DC subset, termed mcDC, which is regulated by a distal chromosome 2 interval. This locus, termed *Idd13*, is also associated with diabetes genetic susceptibility, suggesting a vital role of mcDC in disease, possibly through their T cell anergy reversal function.

These results show that DC subsets are regulated by distinct determinants. Despite the correlation between pDC/mcDC number and autoimmune diabetes susceptibility, our results

demonstrate a divergent contribution of DC subsets to pathogenesis. We shall investigate further to refine genetic intervals and identify the candidates genes involved in the regulation of both pDC and mcDC in vivo number.

Keywords : Dendritic cells, auto-immunity, genetics, diabetes, immuno-deficiency.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | iii |
| Table des matières..... | v |
| Liste des figures..... | viii |
| Liste des abréviations | xi |
| Remerciements | xiv |
| Justification du choix des articles inclus dans cette thèse | xvi |
| CHAPITRE 1 : Introduction | 1 |
| 1.2.1 Modèle du Soi vs non-Soi | 4 |
| 1.2.2 Modèle du Danger..... | 5 |
| 1.3.1 Sous-types de DC | 8 |
| 1.3.2 Ontogénie des cellules dendritiques | 15 |
| 1.3.3 Facteurs impliqués dans la régulation du développement des DC..... | 16 |
| 1.4 Auto-immunité..... | 22 |
| 1.4.1 Définition..... | 22 |
| 1.5 Diabète auto-immun | 23 |
| 1.5.1 Susceptibilité génétique du T1D | 24 |
| 1.6 La souris NOD | 25 |
| 1.6.1 Pathogénèse du diabète auto-immun chez la souris NOD..... | 26 |
| 1.6.2 Génétique du diabète auto-immun chez la NOD | 29 |
| 1.7 Hypothèse et objectifs | 33 |
| CHAPITRE 2 : ARTICLE 1..... | 35 |
| 2.1 The Size of the Plasmacytoid Dendritic Cell Compartment Is a Multigenic Trait Dominated by a Locus on Mouse Chromosome 7 | 35 |
| 2.2 Abstract | 39 |
| 2.3 Introduction..... | 40 |

| | |
|--|------------|
| 2.4 Materials and Methods..... | 43 |
| 2.5 Results | 47 |
| 2.6 Discussion..... | 56 |
| 2.7 Acknowledgments | 62 |
| 2.8 REFERENCES | 63 |
| 2.9 FIGURES..... | 67 |
| CHAPITRE 3 : ARTICLE 2..... | 77 |
| 3.1 The <i>Idd13</i> congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility | 77 |
| 3.2 Abstract | 81 |
| 3.3 Introduction..... | 82 |
| 3.4 Materials and Methods..... | 84 |
| 3.5 Results | 87 |
| 3.6 Discussion..... | 92 |
| 3.7 Acknowledgments | 97 |
| 3.8 REFERENCES | 98 |
| 3.9 FIGURES..... | 101 |
| CHAPITRE 4 : Discussion et Perspectives..... | 109 |
| 4.1 La souris NOD : un modèle de dysfonction hématopoïétique | 109 |
| 4.2 Régulation du nombre de pDC..... | 112 |
| 4.3 Contribution des pDC à l'auto-immunité | 114 |
| 4.4 Caractérisation immunobiologique des mcDC..... | 116 |
| 4.5 Impact des mcDC en auto-immunité..... | 119 |
| 4.6 Conclusions | 124 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 126 |
| AUTRES CONTRIBUTIONS | 140 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Représentation schématique de l'hématopoïèse | 2 |
| Figure 2. Fonctions tolérogéniques des DC plasmacytoïdes | 13 |
| Figure 3. Ontogénie des cellules dendritiques et facteurs impliqués | 17 |
| Figure 4. Régulation de la signature transcriptionnelle des pDC | 20 |
| Figure 5. Pathogénèse du diabète auto-immun | 27 |
| Figure 6. Carte génétique des QTL auto-immuns chez la souris NOD | 31 |
| Figure 7. Modèle de la contribution du nombre de mcDC dans la susceptibilité au diabète auto-immun | 121 |

Article 1

| | |
|--|----|
| Figure 1. Inbred mouse strains exhibit variation for the proportion and absolute number of pDC | 66 |
| Figure 2. Increased sensitivity in the detection of pDC variation between B6.Rag and NOD.Rag mice | 67 |
| Figure 3. Linkage analysis of pDC proportion and absolute number | 68 |
| Figure 4. pDC proportion and absolute number are affected by <i>Pdcd1</i> , a dominant locus on chromosome 7 | 69 |
| Figure 5. Genetic interactions between loci affect the size of the pDC compartment | 70 |
| Figure 6. Validation of the contribution of chromosome 7 in defining the size of the pDC compartment | 71 |

| | |
|---|-----|
| Figure 7. Analysis of cellular processes which may influence the size of the pDC compartment | 72 |
| Suppl figure 1. CD11c ^{low} Bst-2 ⁺ spleen cells express B220 and Siglec H..... | 73 |
| Suppl Figure 2. The reduced proportion and absolute number of pDC in the spleen of NOD.NZW- <i>Chr7</i> congenic mice relative to NOD mice is not due to preferential accumulation of pDC in other lymphoid tissues..... | 74 |
| | |
| <u>Article 2</u> | |
| Figure 1. Determining the threshold for selecting CD11b ^{-/low} dendritic cells | 100 |
| Figure 2. NOD mice exhibit an increase in the proportion and absolute number of mcDC | 101 |
| Figure 3. Increased sensitivity in the detection of mcDC in B6.Rag1 ^{-/-} and NOD.Rag1 ^{-/-} mice | 102 |
| Figure 4. Linkage analysis of mcDC proportion and absolute number | 103 |
| Figure 5. mcDC proportion and absolute number are linked to the <i>Idd13</i> locus | 104 |

Figure 6. Validation of the contribution of *Idd13* congenic interval in defining the proportion and absolute number of mcDC 105

Suppl Figure 1. Adapted gating strategy for mcDC excludes plasmacytoid DC contamination 106

Suppl Figure 2. NOD and NOD.*Idd13* mice exhibit a similar proportion of plasmacytoid DC 107

Liste des abréviations

APC : Cellule Présentatrice d'Antigène

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen

CD : Cluster of Differentiation

CCL19 / CCL21 : Chimiochine (CC-motif) ligand 19/21

CCR7 : Récepteur à chimiokine 7

CDP : Progéniteur dendritique commun

CIITA : Class II MHC Transactivator

CLEC9a : Récepteur de Lectine de type-C 9A

CLP : Progéniteurs lymphoïdes communs

CMP : Progéniteurs myéloïdes communs

DAMP : motifs moléculaires associés au danger

DC : Cellule dendritique

DTR : Récepteur à la toxine diphtérique

DTX : Toxine diphtérique

FLT3 : Fms-like Tyrosine kinase 3

FLT3L : Fms-like Tyrosine kinase 3 ligand

IL : Interleukine

IRF : Interferon Response Factor

ICOS : Inducible T cell costimulator

ICOS-L : Inducible T cell costimulator ligand

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interferon

iNKT : lymphocytes T Natural Killer invariants

LPS : Lipopolysaccharide

mcDC : Cellule dendritique mérocytique

MHC : Complexe Majeur d’Histocompatibilité

moDC : Cellule dendritique dérive de monocyte

MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated Protein

MDP : Précurseur de macrophages/dendritique

MLR : Réaction lymphocytaire mixte

NK : Natural Killer

NLR : Récepteur NOD-like

NOD : Non-Obese Diabetic

NOR : Non-Obese Resistant

OVA : Ovalbumine

PBMC : Cellule mononucléées du sang périphérique

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

RE : Réticulum endoplasmique

SI : Système immunitaire

TCR : Récepteur de cellule T

TLR : Récepteurs Toll-like

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

XCR1 : Récepteur à chimiokine à motif X- C 1

Remerciements

Pour commencer, j'aimerais remercier ma superviseure, Sylvie Lesage, qui a pris le risque de faire entrer un chromosome Y dans son labo et lui donner la chance de faire ses preuves. Ça a été une aventure formidable à travers les années, de mon premier stage jusqu'à la fin de ce doctorat. Tu as, comme avec tous tes étudiants, su m'aider à trouver et développer mes forces et surmonter mes faiblesses, ainsi qu'à les canaliser pour que j'atteigne mes buts. Je n'aurais jamais imaginé apprendre autant, que ce soit sur le plan scientifique, organisationnel ou interpersonnel, et c'est en grande partie grâce à toi. Il ne fait aucun doute dans mon esprit qu'avec toutes ces qualités, tes futurs étudiants seront de redoutables scientifiques, qui assureront la pérennité de ton labo toute ta carrière.

Je ne peux cependant passer sous silence mes nombreux collègues au cours des années. Ces personnes, avec qui j'ai eu à travailler pendant plusieurs années, sont devenues des amis chers. L'ambiance saine et la franche camaraderie du Labo Lesage est légendaire, résultant en un environnement propice à la motivation et la collaboration. Je voudrais remercier Geneviève d'avoir su garder la tête froide et être la voix de la raison à de nombreuses occasions, sans oublier sa contribution impeccable aux projets de tous. Véro, l'étudiante doyenne, pour m'avoir montré qu'il est possible de balancer la science avec la vie. Fanny, pour avoir été une amie et confidente, en plus d'une co-membre du « DCs rock » fanclub. Erin, for the same reasons, but also for helping me improve my English and my stout tastes. I owe you a black velvet... or ten. Roxanne, pour m'avoir fait rire souvent sans faire exprès à de nombreuses reprises. J'oublie une foule de gens qui ont fait un passage dans le labo, mais tous ont contribué à leur façon à ce que j'arrive aujourd'hui au point culminant de mon doctorat. Que ça soit par une contribution technique, une idée, une célébration, tous ont su marquer ces années qui seront déterminantes pour ma carrière ET pour ma vie.

J'aimerais aussi faire une mention spéciale pour certains individus à l'extérieur du labo, comme Marie-Josée et Fany à l'animalerie ou Martine à la cytométrie. Leur aide

inestimable et leur professionnalisme en font bien sûr des outils précieux à ma réussite, mais leur personnalité pétillante a contribué beaucoup à enrichir mon expérience étudiante. Je remercierais aussi brièvement mes amis du centre, tels que Simon-David et Charles-Étienne, pour les distractions bien méritées de la science.

Je vais également remercier Brian, et l'équipe du labo Wilhelm. Ils ont su me supporter, m'aider à me reconstruire à travers des moments difficiles. Ce fut une étape peu orthodoxe, mais qui a été essentielle pour me permettre de finalement terminer ce PhD.

Je souhaite remercier ma mère et mon frère, qui ont été un support moral infaillible depuis le début de mes études. Je n'ai ressenti que de la confiance et de l'encouragement de votre part, jamais de doute, à travers des décisions et des phases difficiles. À mon frère qui continue de me pousser au-delà de mes limites, me faisant réaliser que je peux faire plus que je ne l'imagine. À ma mère, qui a su me donner la patience et la curiosité intellectuelle nécessaire à ma progression, en plus du confort et de l'amour. À mon père, qui m'a donné suffisamment d'entêtement pour que je traverse les obstacles devant moi malgré tout. Je sais maintenant que je peux me tenir la tête haute car je suis fidèle à l'homme que tu étais, qui voit gros et qui termine ce qu'il commence. Je sais que tu serais fier de moi, et ça me suffit.

À Mélanie, ma douce moitié depuis les 13 dernières années qui a su endurer les aléas de la compagnie d'un étudiant gradué avec brio. Jamais tu ne t'es impatienté de mes longues soirées, mes réveils matinaux ou mes folies passagères, tu as su garder le cap. Mon cœur est tien. Merci à ma petite Chloé, qui n'était qu'une idée lorsque j'ai commencé, mais qui m'a permis de changer ma philosophie et canaliser mes efforts pour te consacrer toute mon énergie. Tu ne te rappelleras pas de cette période ni ce qu'elle signifie, mais sache que je t'enseignerai comment on parvient à se surpasser et à se mettre des objectifs élevés.

Justification du choix des articles inclus dans cette thèse

Ma contribution aux travaux du laboratoire s'est traduite en plusieurs articles, parmi lesquels je figure en tant que premier auteur. Je fais cependant le choix de n'inclure que 2 de ces articles dans ma thèse, publiés en 2012 et 2013. J'ai techniquement terminé mes travaux dans le laboratoire en janvier 2014 : à cette date, je n'avais pas d'autres articles publiés à titre de premier auteur et j'avais déjà planifié d'inclure ces 2 articles. Pour des raisons personnelles, j'ai dû retarder considérablement le dépôt de ma thèse, ce qui a permis à d'autres articles d'être publiés depuis l'ore. Mes autres contributions ont été effectuées sur l'immunogénétique des cellules NK, le rôle de l'IL-23R dans les maladies inflammatoires de l'intestin et le rôle du CMH dans la susceptibilité à la thyroïdie auto-immune. La liste des articles publiés est disponible en Annexe.

CHAPITRE 1 : Introduction

Objectif général et structure de la thèse

L'objectif principal des travaux présentés dans cette thèse consiste à investiguer la régulation génétique du nombre des populations de cellules dendritiques non conventionnelles ainsi que leur impact sur l'auto-immunité. La section **Introduction** permettra de situer la recherche menée au cours de mon doctorat au sein de la littérature en présentant les concepts de l'hématopoïèse des cellules dendritiques ainsi que leurs fonctions. Les principes fondamentaux associés à l'auto-immunité seront également abordés, pour finalement établir l'importance des cellules dendritiques dans un contexte auto-immun. Le **Chapitre 1** présentera, sous la forme d'un manuscrit publié, les résultats d'une analyse génétique de la proportion de cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la rate à l'état de base. Le **Chapitre 2** se penchera plutôt sur la régulation génétique d'une nouvelle population de cellules dendritiques, dénommée mérocytique, ainsi que son implication dans la susceptibilité au diabète auto-immun chez la souris. Cette étude est également présentée sous forme de manuscrit publié. Finalement, la section **Discussion** mettra en contexte les résultats présentés avec les connaissances disponibles, pour souligner leur impact et des pistes futures à envisager.

1.1 SYSTÈME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire (SI) est composé d'un complexe amalgame de populations cellulaires et moléculaires aux fonctions, localisations, interactions et rôles distincts permettant de faire face à une multitude de dangers. Ces populations se différencient dans des organes lymphoïdes primaires à partir de cellules souches hématopoïétiques via un processus appelé hématopoïèse.

Plusieurs de ces populations aux fonctions spécialisées font partie du système immunitaire inné, retrouvé chez de nombreux organismes. Le système inné regroupe également une multitude de mécanismes distincts, tels que la cascade du complément, des

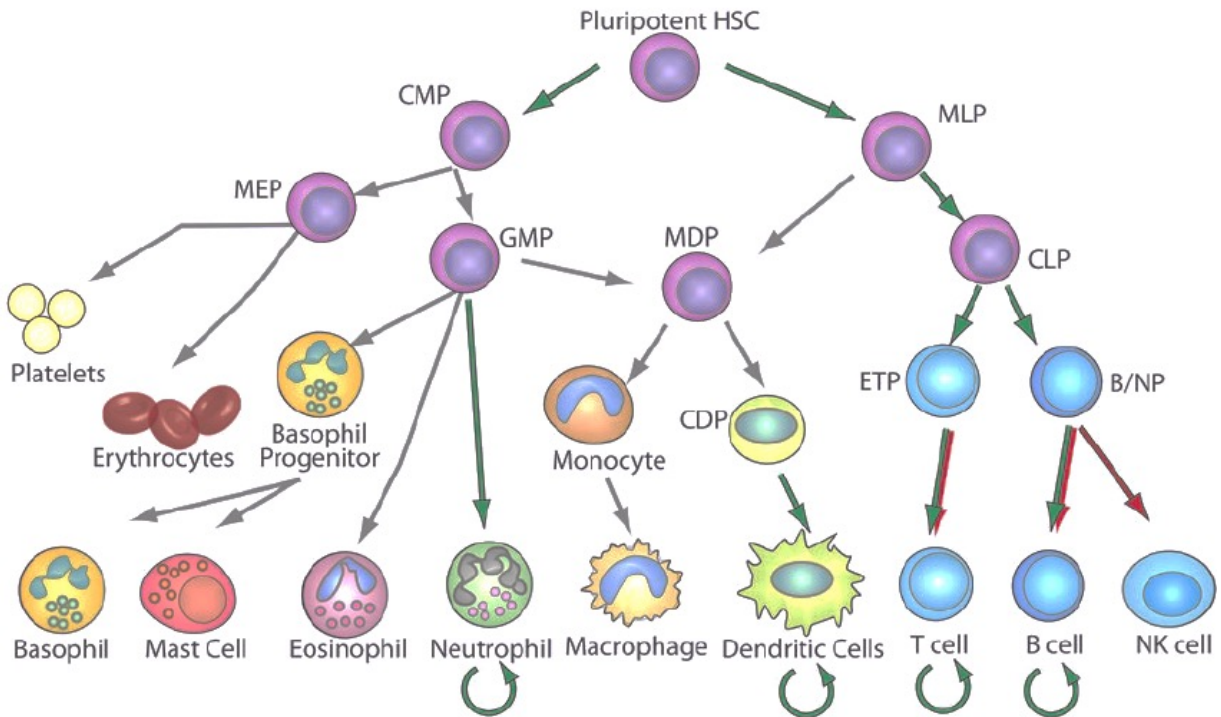


Figure 1: Représentation schématique de l'hématopoïèse, modifiée de (1)

peptides antimicrobiens et des molécules pro-inflammatoires (2). Ces mécanismes partagent un but commun : une réponse large et rapide contre les bactéries, virus et parasites. C'est cependant l'émergence du système adaptatif au plan évolutif qui a marqué une capacité accrue de générer des réponses immunitaires ciblées contre un spectre d'antigènes beaucoup plus étendu (3). Le système adaptatif, qui se caractérise par la génération de diversité de récepteurs spécifiques (notamment via la recombinaison V(D)J) et le développement d'une réponse mémoire, est au premier plan de l'immunologie moderne notamment grâce à son rôle dans la vaccination (4). Cependant, les 2 branches du système immunitaire sont avant tout complémentaires : une communication adéquate entre celles-ci est la clé pour obtenir une réponse optimale. La compréhension des liens unissant les systèmes innés et adaptatifs est donc une priorité dans le cadre de mes travaux.

1.2 MODÈLES DE FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

L'immunologie est définie par la Société Canadienne d'Immunologie comme « l'étude du système immunitaire, un système physiologique qui protège un organisme d'une infection ». C'est d'ailleurs dans cette vision un peu généraliste qu'a évolué le domaine dans ses balbutiements: une dichotomie entre l'hôte et le pathogène, entre le Soi et le non-Soi. Un modèle viable du fonctionnement du système immunitaire se doit d'expliquer comment le système immunitaire décide de s'activer au moment opportun, contre quelles cibles, et quel type de réponse utiliser, tout en restant inoffensif pour l'hôte. On observe aujourd'hui une opposition entre deux théories du système immunitaire, soit celle la Théorie du Soi vs non-Soi et la Théorie du Danger, qui offrent des visions complémentaires.

1.2.1 Modèle du Soi vs non-Soi

La croyance fondamentale que le système immunitaire a évolué pour attaquer des pathogènes a influencé la recherche pour la plus grande partie du XXe siècle. Cette hypothèse implique l'identification de mécanismes permettant à l'hôte de distinguer le Soi du non-Soi. C'est avec cette perspective que Burnet proposa la théorie de la sélection clonale (5), qui suggère que chaque lymphocyte exprime un récepteur de surface spécifique à une cible donnée, qui entraîne une réponse immunitaire suite à sa stimulation et sa signalisation. Dans ce modèle, chaque lymphocyte possède toutefois une spécificité distincte : entraînant la génération d'un large répertoire de cibles possibles. Les lymphocytes auto-réactifs sont, dans ce même modèle, supprimés tôt dans la vie de l'organisme. Les expériences de transplantation de Medawar supportent d'ailleurs cette hypothèse, suite à la démonstration que des souris tolèrent des allogreffes de peau si elles ont été préalablement injectées avec des cellules du donneur tôt dans le développement (6). Cette découverte valut d'ailleurs à Burnet et Medawar le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1960, pour leur découverte de la tolérance immunitaire acquise. Ce modèle fut mis à jour avec les années pour inclure les importantes contributions qui suivirent dans le domaine, notamment pour intégrer les signaux de costimulation fournis par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APC) (7). Cette découverte a d'ailleurs induit un important changement de paradigme dans le domaine : elle implique en effet qu'avant même la reconnaissance antigénique par les récepteurs spécifiques aux lymphocytes, une capacité à discriminer le Soi du non-Soi est nécessaire chez les APC, afin d'effectuer le choix d'exprimer ou non les molécules de costimulation. En 1989, Charles Janeway suggère un renouveau du modèle en intégrant le concept de PRR, une famille de récepteurs qui reconnaissent des motifs hautement conservés à travers l'évolution chez les

pathogènes (8). Janeway raffina ainsi le modèle en ajoutant une dimension à la dichotomie Soi vs non-Soi : infectieux ou non-infectieux. Cette distinction dicte donc que le système adaptatif discrimine le Soi du non-Soi, mais que les APC discriminent un statut infectieux de non-infectieux, et qu'une réponse est obtenue contre du « non-Soi infectieux ». La découverte subséquente des récepteurs de type Toll/Toll-like (TLR) par James Hoffman et Bruce Beutler (9, 10), fut le premier exemple de cette large famille de récepteurs innés permettant l'activation des APC suite à la reconnaissance de ligands tels que les lipopolysaccharide (LPS). On connaît aujourd'hui l'identité d'une multitude de récepteurs, associés à plusieurs familles de protéines, qui permettent de reconnaître rapidement des bactéries, fungi ou virus (11).

1.2.2 Modèle du Danger

La théorie du Danger, qui provient des travaux de Polly Matzinger, est un modèle controversé allant à l'encontre de plusieurs des dogmes établis de l'immunologie moderne (12). Elle supporte que la reconnaissance de signaux dits « de danger » sont des activateurs beaucoup plus importants que la discrimination entre le Soi et le non-Soi, ou la détection de molécules associés à des pathogènes. Cette théorie supporte que plusieurs des PRR associés à la reconnaissance de pathogènes sont en fait des récepteurs pour des signaux d'alarme endogènes ou DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*), tels que la relâche de Heat-shock proteins (HSP), high-mobility-group (HMGB1), chaperonines, ATP ou des cristaux d'acide urique de cellules en nécrose (13, 14). Ces signaux, qui ont depuis été fermement établis comme de puissants activateurs du système immunitaire, stimulent entre autres des récepteurs comme RAGE ou plusieurs formes d'inflammasomes et sont impliqués dans une multitude de pathologies (15, 16). Par conséquent, selon le modèle de Danger, ce ne serait pas

la reconnaissance directe des PAMPs qui stimulerait le système immunitaire, mais le dommage causé par ces pathogènes qui mènerait à la relâche de signaux danger.

Ce modèle de l'immunité permettrait également d'expliquer pourquoi l'apoptose, qui n'est pas associée à la relâche du contenu intracellulaire, est considérée comme un signal tolérogène, en contraste avec la nécrose. Il expliquerait également comment le système immunitaire tolère la flore commensale : celle-ci n'est pas considérée comme un danger. Ce qui soulève une critique majeure de ce modèle : comment le système immunitaire décide-t-il ce qui constitue un danger? Comment ce modèle explique-t-il les réponses immunes induites sans dommage cellulaire détecté, en présence de pathogènes? Les 2 modèles de l'immunité possèdent chacun des forces et des faiblesses, dans différents contextes, et le domaine en entier pourrait bénéficier d'une harmonisation de leurs concepts respectifs pour élaborer une théorie unifiée.

1.3 CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques (ou DC), furent découvertes en 1868 par Paul Langerhans, qui isola des cellules à une morphologie similaire aux cellules nerveuses dans la peau (17). Nous avons du cependant attendre plus de 100 ans avant d'établir l'importance de ces cellules dans le système immunitaire (18). Découvertes en 1973 par Zanvil Cohn et Ralph M. Steinman, les DC peuvent être considérées comme la pierre angulaire du système immunitaire inné grâce à leur qualité unique en tant que APC (19, 20). C'est d'ailleurs l'identification d'une population à la morphologie atypique et aux fonctions uniques qui a valu le prix Nobel de Médecine de 2011 au Docteur Steinman (19-22). Ces cellules, qui exprimaient de forts

niveaux du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I et II, démontrent une capacité inégalée à stimuler des lymphocytes T dans des réactions mixtes lymphocytaires (MLR)(23-25). C'est cependant la capacité des DC à capturer, apprêter et présenter des antigènes afin d'enclencher une réponse cellulaire des lymphocytes T qui a depuis révolutionné l'immunologie.

On reconnaît maintenant la présence de DC dans la majorité des organes du corps, où elles échantillonnent continuellement leur environnement à la recherche d'antigènes. Suite à la détection d'un signal activateur tel que le LPS, elles enclenchent un processus de maturation qui permet aux DC de devenir une APC fonctionnelle (26). Avant de pouvoir présenter un antigène, les DC matures doivent cependant migrer vers la zone T des ganglions lymphatiques en suivant un gradient des chimiokines CCL19 et CCL21 dans les canaux lymphatiques afférents, qui signalent sur le récepteur CCR7 exprimé en surface des DC (27-32). Cette colocalisation des DC avec les lymphocytes T constitue donc la condition idéale pour un contact prolongé entre le TCR et les molécules de MHC I pour les T CD8⁺, et le MHC II pour les T CD4⁺. Ce contact prolongé est par ailleurs favorisé lors de la maturation des DC, qui entraîne la surexpression du MHC I/II ainsi qu'une diminution de leur internalisation.

Cette interaction ne constitue toutefois que le premier des 3 signaux que peuvent fournir les DC pour déclencher une réponse T adéquate, soit 1. l'interaction MHC-TCR, 2. les signaux de costimulation (B7.1/2-CD28, ICOS-ICOSL, 4-1BB, etc) et 3. les cytokines de costimulation (IL-12, IL-1, IFN α , etc) (26).

En contraste, la stimulation des lymphocytes T par une DC immature induit leur anergie (33, 34), entraînant une incapacité à monter une réponse contre leur antigène spécifique dans le futur. On retrouve généralement ce type de présentation antigénique dans

des conditions non infectieuses, où le peptide présenté est dérivé d'un antigène du Soi (35). Par conséquent, en plus de leur rôle important dans l'activation d'une réponse immunitaire, les DC permettent également d'éviter des réactions auto-immunes inadéquates. De plus, les DC influencent le processus de sélection négative des lymphocytes T autoréactifs générés dans le thymus en présentant des antigènes captés ailleurs dans l'organisme. (36)

1.3.1 Sous-types de DC

Au delà des capacités communes de toutes les DC, on remarque une certaine hétérogénéité entre plusieurs sous-types, leur conférant un avantage dans des situations précises. Celles-ci diffèrent au niveau fonctionnel ainsi que dans leur ontogénie (37). Les DC dites conventionnelles (cDC), sont traditionnellement identifiées par une forte expression de l'intégrine CD11c et des molécules du MHC (26). On les retrouve dans tous les organes lymphoïdes ainsi que dans la majorité des organes non-lymphoïdes, avec des fonctions très conservées. Il existe également de nouvelles populations de DC atypiques, telles que les DC plasmacytoïdes (pDC), les DC mérocytiques (mcDC) et les DC inflammatoires (moDC), qui présentent des fonctions uniques (38-40).

1.3.1.1 cDC CD8 α ⁺

La découverte de l'expression d'un homodimère de CD8 α en surface des cDC a permis de séparer les 2 sous-types majeurs de cDC dans la rate de la souris (41). On connaît aujourd'hui plusieurs autres marqueurs spécifiques à cette population, tels que DEC-205, XCR1, CD24 et CLEC9A (26, 37, 42, 43). Cependant, leur phénotype dans les organes non-lymphoïdes est caractérisé par l'expression de l'intégrine CD103 et l'absence de CD11b (Mac-1) (44, 45). En plus de leur sécrétion d'interleukine-12, ces cellules se distinguent par leur

capacité accrue à présenter des peptides dérivés d'antigènes exogènes sur des molécules de MHC I à des lymphocytes T CD8⁺, par un mécanisme appelé présentation croisée (46).

La voie endogène de présentation antigénique implique une dégradation des peptides endogènes par l'immunoprotéasome pour ensuite être chargés sur le MHC I dans le réticulum endoplasmique (RE) (47). En contraste, la présentation croisée consiste à transférer le contenu d'endosomes vers le cytosol pour ensuite converger vers la voie classique, permettant la présentation de peptides dérivés d'antigènes non-exprimés par l'APC acquis par endocytose (48). Il s'agit donc d'un mécanisme clé dans le contexte de l'immunité antivirale, où il serait autrement peu plausible de monter une réponse antigène spécifique si les APC n'étaient pas elles-mêmes infectées (48). Par la même occasion, ce mécanisme permet d'assurer la tolérance périphérique contre des antigènes tissu-spécifiques en absence de signaux de maturation. En contrepartie, les DC CD8 α ⁺ démontrent une capacité réduite à stimuler une réponse T CD4⁺ via la présentation classique sur MHC II en comparaison avec les cDC CD11b⁺ (49).

Il est donc plausible que les sous-types de cDC soient en fait spécialisés pour stimuler une réponse contre des agents distincts. En effet, bien que tous les DC murines expriment le récepteur Toll-like 9 (TLR9), seuls les DC CD8 α ⁺ expriment le TLR3 qui reconnaît l'ARN double-brin retrouvé dans un nombre important de virus. On observe également une sécrétion accrue d'IL-12p70 et d'interféron lambda (IFN λ) par les DC CD8 α ⁺ suivant leur maturation, ce qui contribue qu'à la promotion d'une réponse CD4 de type Th1 ainsi qu'à l'activation des cellules NK (Natural Killer) (50-53). Ces phénotypes, en plus de leur fonction de présentation croisée, donnent aux DC CD8 α un rôle central contre les pathogènes intracellulaires.

Plus de 10 ans ont été nécessaires pour identifier les marqueurs spécifiques à cette population chez l'humain, puisque celle-ci n'exprime pas les marqueurs classiques CD8 α ou

DEC-205. Une analyse transcriptomique a permis de valider la forte expression du marqueur spécifique BDCA-3 (Blood Dendritic Cell Antigen 3) sur une population non seulement capable d'une présentation croisée efficace, mais qui répond également aux ligands des TLRs 4/8 pour entraîner une sécrétion d'IL-12 (54, 55). Cette fonction corrèle d'ailleurs avec une activité antivirale accrue, notamment contre le virus de l'hépatite C (56).

1.3.1.2 cDC CD11b⁺

La population de DC la plus commune dans les organes lymphoïdes secondaires exprime l'intégrine α_M , ou CD11b, et ce qui la distingue des DC CD8 α^+ . Elle possède une capacité accrue à présenter des peptides exogènes sur MHC de classe II via la voie classique. C'est grâce à cette différence que les DC CD11b⁺ arrivent à activer une réponse T CD4⁺ inégalée, généralement vers une réponse de type Th2 (57). Ce phénotype est explicable notamment par leur sécrétion d'IL-4 et d'IL-10, ainsi que des chimiokines CCL17 et CCL20. Cette population, qui est retrouvée à la fois dans les organes lymphoïdes et non-lymphoïdes, est hétérogène selon l'expression de marqueurs tels que CD4, SIRP α , DCIR2 et ESAM (58). Les sous-populations associées sont très similaires entre elles, lorsque comparées aux autres sous-types de DC (55). Cependant, très peu de différences fonctionnelles ont été associées à ces sous-populations de DC CD11b⁺. (58). Une étude récente de transcriptomique sur cellule unique chez les DC humains investigate davantage cette hétérogénéité chez l'équivalent humain des DC CD11b⁺, soit les DC CD1c⁺ (BDCA-1⁺) : ils observent des variations dans la production d'IL-10, IL-12B et IL-18 suite à la stimulation des différents signaux activateurs dans 2 sous-populations marquées par l'expression différentielle des marqueurs CD32B, CD163 et CD36 (59).

1.3.1.3 DC PLASMACYTOÏDES

La découverte d'une population atypique à la morphologie ressemblant aux plasmocytes remonte à 1950 (60, 61). On remarqua d'abord leur prévalence dans les zones T de ganglions lymphatiques, mais leur fonction et leur identité furent l'objet d'un débat qui prit plus de 50 ans à résoudre. Ces cellules, qu'on surnomma alors monocytes plasmacytoïdes ou lymphocytes T plasmacytoïdes, furent enfin renommées cellules dendritiques plasmacytoïdes en 1997 suite à l'identification d'une sous-population de cellules dendritiques CD4⁺ CD123⁺ dans les PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique) et les amygdales humaines. Ces dernières avaient non seulement la capacité de stimuler une réponse T, mais également d'acquérir une morphologie de type dendritique suite à leur maturation (62). En parallèle, on connaissait depuis un moment l'existence d'une population sanguine ayant la capacité de produire d'importantes quantités d'interférons de type 1 suite à la stimulation par des virus ou tumeurs, dénommée *natural interferon-producing cells* ou IPC (63, 64). Les travaux des laboratoires de Liu et Colonna (65, 66) ont cependant permis d'établir que ces 2 populations n'en formaient en fait qu'une seule. Les DC plasmacytoïdes, ou pDC, se caractérisent par une expression faible (souris) ou négative (humain) de l'intégrine CD11c, ainsi que par l'expression du marqueur de lymphocyte B B220/CD45RA (67). Elles se distinguent également des DC classiques par leur faible expression du MHC de classe II et de molécules de costimulation. Chez la souris, les pDC se démarquent également des cDC via l'expression des marqueurs Ly6C, Bst-2 et Siglec-H, tandis que l'on utilise l'expression de l'IL-3R α (CD123), BDCA2 (*Blood DC Antigen 2*) et ILT7 (*Immunoglobulin-like transcript 7*) pour isoler les pDC chez l'humain (67).

La capacité unique des pDC à produire de l'interféron de type 1 est en fait attribuable à une expression constitutive de Interferon Regulatory Factor 7, ou IRF7, qui régule directement la transcription de IFN α (68). L'activation de IRF7 est provoquée par plusieurs mécanismes distincts, tels que la stimulation de TLR intracellulaires ou d'hélicases de type RIG-I/MDA-5, selon la nature du stimulus pathogénique. Par exemple, les pDC reconnaissent l'ARN simple-brin situé dans des compartiments endosomaux via le TLR7, associé à la présence de virus tels que le VHC ou le VIH, ainsi que l'ADN CpG hypométhylé via le récepteur TLR9 (69-71). Cependant, contrairement aux autres cellules, il semble que la production de IFN α soit indépendante des hélicases à ADN telles que RIG-I ou MDA-5 qui sont retrouvées dans d'autres types de DC (71). Les fonctions spécialisées des pDC soulignent leur importance dans la défense antivirale, tel que démontré via des expériences de déplétion de pDC. Le modèle de BDCA2-DTR de Marco Colonna, qui exprime le récepteur de la toxine diphtérique (DTX) sous le contrôle du promoteur du gène BDCA2 humain, permet en effet une déplétion spécifique des pDC suite à un traitement de DTX (72). Leurs travaux ont démontré une diminution de la capacité à contrôler l'expansion du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et du cytomégalo virus murin (MCMV) en absence de pDC.

On attribue également aux pDC des fonctions tolérogéniques : leurs propriétés d'APC sont drastiquement différentes des cDC, en raison d'une régulation du transactivateur maître CIITA par un promoteur distinct, soit le promoteur de lymphocyte B pIII (73). Cette différence se traduit par une incapacité à arrêter la synthèse et le transport de complexe MHC II suite à leur activation, ce qui diminue la stabilité des complexes en surface. Il s'ensuit une difficulté à établir une interaction stable avec des lymphocytes T pour mener à leur activation,

faisant des pDC de piètres APC, au profit de la tolérance. En effet, ce contraste de machinerie de présentation antigénique avec les cDC est associé à un rôle de délétion ou d'anergie des lymphocytes T CD8 (74). Les pDC peuvent également produire de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme qui permet d'inhiber la prolifération des lymphocytes T, ainsi que de contribuer à la conversion en Treg CD4 CD25⁺, tel qu'observé dans des modèles d'allogreffe cardiaque ou de cancer (75, 76).

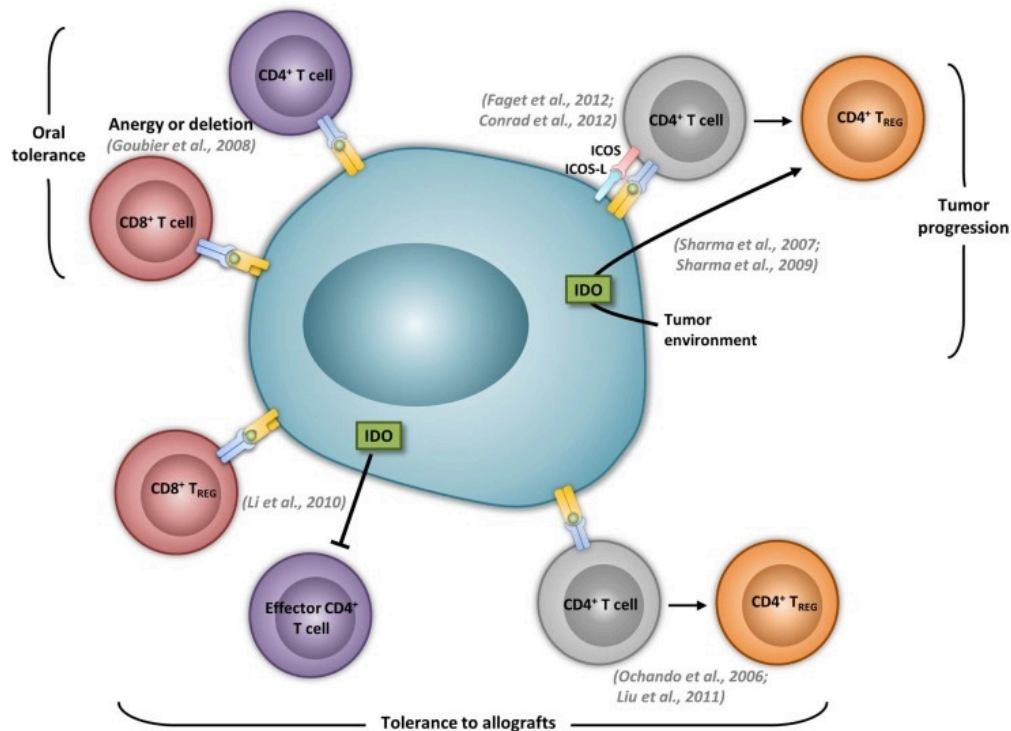


Figure 2: Fonction tolérogéniques des DC plasmacytoïdes, tiré de (77)

1.3.1.4 DC MÉROCYTIQUES

Le dernier arrivé dans la grande famille des cellules dendritiques nécessite encore beaucoup de recherche pour caractériser sa fonction, son ontogénie, ou encore la simple expression de marqueurs de surface. Par contre, on distingue la DC dite mérocytique de ses prédécesseurs par une fonction nouvelle et unique : la capacité de renverser l'anergie de

lymphocytes T, pourtant considérée comme un état permanent *in vivo* (40, 78). L'anergie, un mécanisme fondamental dans la tolérance immunitaire périphérique, survient lorsqu'un lymphocyte T reconnaît un antigène dans le contexte du MHC sans recevoir de signal de co-stimulation, normalement associé à l'absence de signal activateur (79). Il s'agit par conséquent d'une façon d'éviter des réponses auto-immunes.

Le terme mérocytique est dérivé du grec « meros », qui signifie particule. En effet, les mcDC se distinguent par leur capacité à emmagasiner des antigènes dans de petites vésicules pour de longues durées, permettant de stimuler des réponses CD4 et CD8 plus de 24 à 48 après les DC conventionnelles (40). C'est d'ailleurs cette fonction d'APC qui permet d'attribuer aux mcDC le statut de cellule dendritique, leurs précurseurs étant pour l'instant inconnus. On sait toutefois qu'ils sont amplifiés suite à l'exposition au Flt3L, à la fois *in vitro* and *in vivo*, suggérant une lignée commune aux DC (80, 81).

Les mcDC, retrouvés dans la rate et les ganglions lymphatiques, expriment de forts niveaux de l'intégrine CD11c, à l'instar des DC conventionnelles. Par contre, ceux-ci se différencient des autres populations majeures de DC par l'absence de l'homodimère CD8 α , de B220 et BST2, ainsi qu'une très faible expression de l'intégrine CD11b à leur surface (40, 81). Chez l'humain, aucune population équivalente n'a pour l'instant été identifiée.

L'importance des mcDC a d'abord été mise en évidence dans le contexte du cancer. Il est bien établi que l'apoptose intratumorale mène à une suppression de la réponse immunitaire, notamment via l'induction d'anergie des lymphocytes T spécifiques contre les antigènes tumoraux (82). Le transfert de mcDC exposés à des cellules tumorales apoptotiques permet par contre de renverser cette anergie de façon antigène-spécifique et de restaurer la réponse anti-tumorale CD8 (40, 83). Cette fonction unique a par la suite été explorée dans le contexte

du diabète auto-immun chez la souris NOD. Il s'avère que le transfert de mcDC exposés à des îlots de Langerhans apoptotiques augmente l'incidence du diabète en comparaison avec les autres sous-types de DC (81). De plus, les mcDC renversent l'anergie de lymphocytes T CD8 portant un TCR OT-I spécifique pour un peptide de l'ovalbumine, dans une souris exprimant OVA sous le contrôle du promoteur de l'insuline (81).

1.3.2 Ontogénie des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques constituent un sujet complexe au cœur de plusieurs débats, souvent en lien à leur similitude aux macrophages. On les isole dans une multitude d'organes tant lymphoïdes que non-lymphoïdes, tels que le thymus, l'intestin, les poumons, avec des voies de différenciation spécifiques (84-87). Les cellules dendritiques à l'étude dans cette thèse correspondent à celle retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires, comme la rate et les ganglions, dites conventionnelles. Cependant, il existe tout de même une hétérogénéité dans la différenciation des DC conventionnelles, puisque qu'elles peuvent être isolées à partir de précurseurs à la fois lymphoïdes et myéloïdes. En effet, on retrouve des cDC $CD8\alpha^+$ et des pDC suite au transfert des CLP (Common Lymphoid Progenitor) ou des CMP (Common Myeloid Progenitor) chez la souris (88-92). Toutefois, il semble que la majorité des DC sont de provenance myéloïde (92) : on accepte maintenant l'existence d'un précurseur dendritique nommé CDP (Common Dendritic Progenitor), qui diverge de la lignée macrophage à partir du stade MDP (Macrophage Dendritic Progenitor) dans la moelle osseuse (93). Les CDP se caractérisent par l'absence de marqueurs lignées-spécifique, une expression de c-kit et Flt3, ainsi qu'une expression variable du récepteur à M-CSF. Lorsque transférés, ces progéniteurs permettent de générer tous les sous-types de DC connus. Cependant, la

différenciation des cDC se complète en périphérie, via un intermédiaire nommé pro-DC, tandis que les pDC se différencient exclusivement dans la moelle osseuse (94). Les pro-DC, qui n'expriment pas l'intégrine CD11c, se différencient ensuite en une seconde population hétérogène, les pré-DC, qui se séparent par leur expression du marqueur Ly6C (95). Chaque population se spécialise ensuite à produire des DC $CD8\alpha^+$ (Ly6C-) ou $CD11b^+$ (Ly6C⁺). Une fois différenciées, les cellules dendritiques conventionnelles survivent seulement 3 à 6 jours en périphérie (96). En contraste, les pDC sont retrouvées plus de 15 jours après leur différenciation, grâce à leur phénotype quiescent (97). On ignore à ce jour tous les détails de l'ontogénie des mcDC, à pouvoir même douter du nom qui leur est attribué, ne sachant pas si elles se différencient réellement à partir des CDP.

1.3.3 Facteurs impliqués dans la régulation du développement des DC

Le développement et la différenciation des cellules dendritiques ont été disséqués avec attention depuis leur découverte originale. On connaît maintenant l'existence d'une multitude de facteurs impliqués à différents stades de leur ontogénie. Certains sont partagés entre toutes les sous-populations de DC, d'autres sont plus spécifiques. Par exemple, le facteur de croissance Flt3L, qui signale sur le récepteur Flt3 (CD135) via une voie STAT3-dépendente, est essentiel au développement de toutes les populations de DC. En effet, les souris déficientes en Flt3L, en Flt3 ou STAT3 sont dépourvues de DC (96). Une injection de Flt3L recombinant permet également d'augmenter le nombre de tous les sous-types de DC *in vivo*, avec une préférence pour les DC $CD8\alpha^+$ et les pDC (98). Cette augmentation est attribuable à 2 rôles de Flt3L : il permet le développement des CDP et pré-DC, mais contribue également à l'homéostasie des DC via le maintien de faibles niveaux de prolifération des DC différenciées

dans les tissus lymphoïdes. Compte tenu du rôle crucial de l'axe Flt3-Flt3L pour le développement des DC, il n'est pas surprenant de constater que le facteur de transcription PU.1, qui contrôle l'expression de Flt3 chez les progéniteurs, est également essentiel à toutes

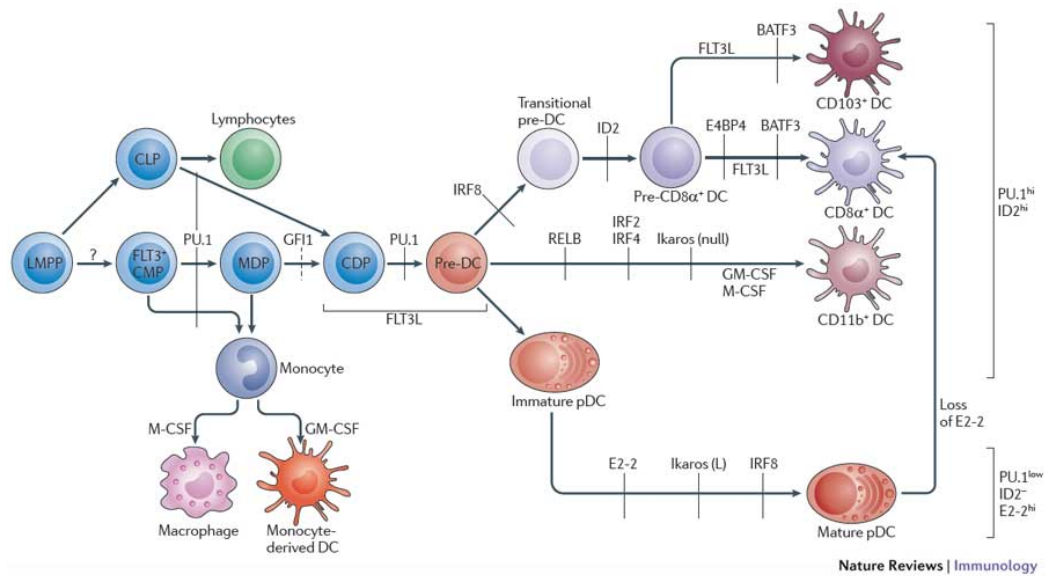


Figure 3 : Ontogénie des cellules dendritiques et facteurs impliqués, tiré de (99)

les sous-populations de DC (100-102). En parallèle, on remarque une perte totale de tous les sous-types de DC en utilisant une souris portant une mutation dominante négative de *Ikaros*, menant à la délétion fonctionnelle de tous les membres de la famille de *Ikaros*. En contrepartie, une mutation de *Ikaros* seul (IKZF1) mène à la perte spécifique des DC CD11b⁺, suggérant une potentielle redondance fonctionnelle des autres membres de la famille pour les pDC et DC CD8α⁺ (103, 104).

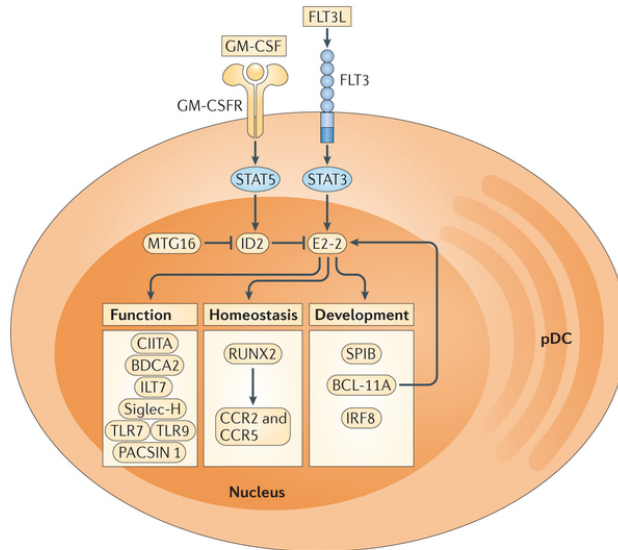
L'identité des sous-populations de DC est cependant programmée par des facteurs plus spécialisés. Le premier d'entre eux à être identifiés fut RelB, de la famille de NFκB, qui est exprimé à de hauts niveaux par les cDC CD8α⁻ spléniques (105). L'absence de RelB, ou du

facteur TRAF6 qui est considéré agir en amont de RelB dans la même voie de signalisation, mène à une absence totale de cette population dans la rate chez la souris, sans affecter les pDC ou cDC CD8 α ⁺ (105, 106). Trois membres de la famille Interferon Regulatory Factor (IRF), soit IRF2, IRF4 et IRF8 ont également été associés au développement des sous-types de DC. À l'instar de RelB et TRAF6, IRF2 et IRF4 sont impliqués dans la différenciation des pré-DC en DC CD8 α ⁻ (107, 108). Cependant, l'absence de IRF4 mène à une ablation totale de cette population, tandis que l'absence de IRF2 mène à une réduction en nombre (109). En contraste, le facteur IRF8 contribue à la différenciation des DC CD8 α ⁺ ainsi que des pDC (110). On observe d'ailleurs une implication d'IRF8 dans la régulation de 2 sous-types de DC humains : 2 mutations de IRF8 causent une immunodéficiences associée à la perte des DC conventionnelles et des pDC (111). Au delà de son rôle dans le développement hématopoïétique, IRF8 est aussi associé à la régulation fonctionnelle de ces sous-types : il contrôle l'expression de IL-12 par les DC CD8 α ⁺ ainsi que l'expression de TLR9 et IFN α par les pDC (112).

Le facteur BATF3 fut le premier facteur de transcription associé à la régulation spécifique des DC CD8 α ⁺ spléniques ainsi que leur équivalent CD103⁺ CD11b⁻ des ganglions périphériques (113). L'absence de BATF3 se traduit en une forte réduction en nombre, attribuée au rôle qu'aurait BATF3 dans la transition de pré-DC vers DC CD8 α (114). Le facteur E4BP4 qui est exprimé au stade CDP, contribue également au développement des DC CD8 α ⁺, suggérant un rôle possible dans le choix de différenciation au détriment des DC CD11b⁺ (115). En effet, les CDP déficients en E4BP4 démontrent une baisse d'expression du facteur BATF3 (115). Les DC CD8 α ⁺ expriment également de forts niveaux du facteur de transcription ID2, bien qu'il soit exprimé à des niveaux plus faibles par l'ensemble des DC

conventionnelles (37, 99). Bien que l'absence de ID2 empêche le développement spécifique des DC CD8 α^+ dans la rate et leur équivalent CD103 $^+$ dans les ganglions drainants de la peau, on observe un développement normal de toutes les populations de cDC dans les ganglions mésentériques (116). Il semble donc que l'ontogénie des sous-types de DC opère en présence de facteurs distincts dans différents tissus, même si les populations présentes possèdent des fonctions et phénotypes similaires.

Les pDC, pourtant eux aussi sous le contrôle des facteurs Flt3L et IRF8 (100), sont également régulées par un programme transcriptionnel distinct. Il semble très probable qu'IRF8 soit également capable de réguler l'ontogénie des pDC via une interaction avec un homologue de PU.1, nommé *SPIB*. En effet, l'inactivation de l'expression génique de *SPIB* chez des progéniteurs hématopoïétiques humains mène à une absence de pDC (117, 118). Cependant, les souris *Spib*-déficientes possèdent au contraire plus de pDC en périphérie, au cout d'une réduction du nombre de pDC dans la moelle osseuse (119). Cette observation semble suggérer un rôle divergent de *SPIB* entre l'homme et la souris, qui reste à investiguer en profondeur.



Nature Reviews | Immunology

Figure 4. Régulation de la signature transcriptionnelle des pDC, tiré de (120)

Le chef d'orchestre de la régulation des pDC reste toutefois E2-2, encodé par le gène *Tcf4*. Ce dernier contrôle l'expression de gènes clés impliqués dans l'homéostasie, la différenciation et la fonction des pDC, tels que *Irf8*, *SpiB*, *Tlr7/Tlr9*, ou *Bdca2* (55, 121, 122). L'expression de E2-2 est quant à elle induite par un mécanisme STAT3-dépendant, suivant la signalisation de *Flt3* (123). Son activité peut cependant être inhibée par le facteur ID2, exprimé uniquement par les sous-types de cDC, expliquant l'absence de la signature transcriptomique unique induite par E2-2. En effet, les souris *Id2*^{-/-} démontrent une légère augmentation du nombre de pDC dans la rate (116). L'absence de *Id2* chez les pDC a récemment été expliquée par l'équipe du Dr. Boris Reizis, identifiant le facteur MTG16 comme un régulateur de l'expression de *Id2* (124). En effet, MTG16 et E2-2 ont démontré pouvoir former un complexe pouvant se mobiliser sur le promoteur de *Id2*. On ignore toutefois

pour quelle raison MTG16 est spécifiquement exprimé chez les pDC, ce qui fera probablement l'objet de recherches plus avancées.

La régulation des sous-types de DC forme une complexe toile de facteurs spécifiques et généraux, agissant à de nombreux stades au cours de leur ontogénie. Bien que le portrait de la situation se clarifie, il reste de nombreuses questions à investiguer. On ignore par exemple l'identité d'un seul facteur associé à la régulation spécifique de la différenciation des mDC.

1.4 AUTO-IMMUNITÉ

1.4.1 DÉFINITION

Un système immunitaire sain tel que retrouvé chez les mammifères permet de répondre contre un grand nombre de pathogènes grâce à la génération d'une incroyable diversité de récepteurs via des mécanismes tels que la recombinaison V-D-J ou l'hypermutation somatique. Cette diversité apporte toutefois un inconvénient majeur : le système immunitaire génère également un répertoire de cellules capables de reconnaître des antigènes du Soi. Il doit par conséquent être contrôlé par les différents mécanismes de la tolérance centrale ou périphérique pour éviter une réponse dite auto-immune. Cette dernière se caractérise par un bris de tolérance contre les antigènes du Soi, menant à une réponse aberrante contre les cellules saines de l'hôte. Il existe une panoplie de maladies auto-immunes, soit organe spécifique ou systémiques, qui diffèrent dans leur immunobiologie et causes spécifiques.

Les maladies auto-immunes systémiques regroupent des syndromes comme le Lupus Systémique Érythémateux (SLE) ou l'arthrite rhumatoïde, qui ciblent des antigènes retrouvés dans un bon nombre de tissus, tel que l'ADN double-brin et simple-brin, le collagène ou le fibrinogène. En contraste, les maladies auto-immunes organe-spécifiques se distinguent par une réponse contre un ou des antigènes à l'expression beaucoup plus restreinte. On retrouve des réponses organes spécifiques contre une multitude de tissus : la peau (vitiligo), le système nerveux (Myasthenia Gravis), ou encore des systèmes endocriniens tels que la thyroïde (maladie de Graves) ou le pancréas (diabète). La réponse antigène-spécifique dans le contexte du dernier est généralement dirigée contre des peptides dérivés de l'insuline ou GAD-65 (Glutamic Acid Decarboxylase -65), exprimés par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas.

1.5 DIABÈTE AUTO-IMMUN

Le diabète auto-immun, aussi connu sous le nom de diabète de type 1 (T1D), est une maladie découlant de la destruction des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas responsables de la production de l'insuline, une hormone essentielle dans le métabolisme du glucose. Ces îlots furent découverts en 1869 par Paul Langerhans, qui est également responsable de l'identification des cellules de Langerhans, bien que ce dernier ne leur associa alors pas de rôle dans le métabolisme du glucose et dans le développement du diabète (125). On doit cependant attendre 1889 pour comprendre le lien entre le pancréas, quand Minkowski et von Mering ont démontré pour la première fois que la pancréactomie de chiens induisait le développement d'un diabète (126). Ce diabète pouvait être temporairement traité via la greffe sous-cutanée d'une partie de ce pancréas. En 1921, les travaux du Dr. Frederick Banting et son étudiant Charles Best ont permis l'isolation d'un extrait de pancréas aux propriétés thérapeutiques (127). Cet extrait fut obtenu suite à la ligature de conduits pancréatiques chez plusieurs chiens, menant à l'atrophie de la portion exocrine du pancréas et un enrichissement de la portion endocrine dont font partie les îlots. Une substance dérivée de ce pancréas dégénéré permit de rétablir une glycémie normale chez des chiens pancréactomisés. Suite à une validation en utilisant des pancréas de vache, Banting et Best entreprirent d'isoler la molécule responsable en collaboration avec les chimistes James Collip et John James MacLeod, qui fut plus tard nommée insuline. Cette substance fut ensuite validée chez l'humain en 1922 lorsqu'elle fut administrée à un jeune garçon diabétique à Toronto, permettant un contrôle majeur de sa glycémie (126). L'importance de cette découverte fut d'ailleurs soulignée par le prix Nobel de médecine de 1923 attribué à ses découvreurs, les Drs Banting et MacLeod. C'est leur découverte qui permit par la suite l'utilisation de l'insuline

pour augmenter de façon dramatique l'espérance de vie des diabétiques du monde entier. Bien que nous possédons maintenant une façon efficace pour contrôler les symptômes de la maladie, nous peinons toujours à expliquer son développement. Les causes du T1D sont multiples : la contribution génétique complexe est complétée par plusieurs facteurs environnementaux.

1.5.1 Susceptibilité génétique du T1D

La recherche sur la contribution génétique au T1D remonte à 1973, qui correspond à la découverte du premier locus de susceptibilité, soit l'antigène des leucocytes humains (HLA). Le locus *HLA*, qui encode plus de 200 gènes, parmi lesquels on retrouve les gènes du MHC I et II. Le locus *HLA* est hautement polymorphique : on retrouve plus de 6543 allèles uniques, contribuant à différents niveaux à la susceptibilité ou la protection contre le T1D, dans des rapports de chances (Odds-ratio, ou OR) variant de 0.02 à plus de 11 (128). C'est pourquoi on considère le locus *HLA* comme le locus de susceptibilité majeur en génétique du T1D. Cependant, plus de 60 polymorphismes génétiques indépendants des allèles du HLA ont été associés au développement du T1D, agissant via des mécanismes distincts (129, 130). Parmi ceux-ci, on retrouve *INS*, qui encode directement pour l'insuline et qui explique 10% de la susceptibilité génétique au T1D (131). En effet, un polymorphisme dans la région promotrice de l'insuline influence potentiellement l'expression de l'ARNm de l'insuline dans le thymus, menant à une augmentation de la présence de lymphocytes T autoréactifs en périphérie via une tolérance centrale altérée. Certains gènes associés à la synapse immunologique sont également liés à la susceptibilité au T1D, tels que *CTLA4* et *PTPN22* (132). On connaît également la contribution de la réponse IFN de type 1 pour les maladies auto-immunes telles que le lupus

ou le psoriasis, mais on observe un potentiel effet protecteur de cette voie médié par le gène *IFIH1* encodant le récepteur intracellulaire MDA5 (133, 134). En effet, deux allèles protecteurs de *IFIH1* sont répertoriés. Il reste cependant encore une partie significative de la contribution génétique qui est inexplicée, mais les travaux chez la souris ont permis d'aider la compréhension de nouveaux mécanismes et gènes candidats potentiels qui sont pertinents chez l'humain.

1.6 LA SOURIS NOD

La souris NOD, ou Non-Obese Diabetic, voit le jour au Japon dans les laboratoires de Shionogi and Co Ltd., qui investiguait le lien entre le développement de cataractes et du diabète via une lignée nommée CTS (*Cataract Shionogi*). Le croisement sélectif des souris CTS hyperglycémiques sur plus de 20 générations permit le développement d'une lignée génétiquement susceptible de développer un diabète auto-immun spontané dans 90% à 100% des femelles à 30 semaines, ainsi que dans 50% à 80% des mâles (135). Bien que la possible association avec les cataractes fut plus tard rejetée, la lignée fut préservée pour son importance dans l'étude de la pathogénèse du diabète auto-immun et fut distribuée partout dans le monde. C'est aujourd'hui l'un des modèles les plus étudiés, non seulement pour le développement du diabète auto-immun, mais également de la sialite et la thyroïdie auto-immune, la dysfonction hématopoïétique ainsi que comme modèle de xenogreffe humaine dite « humanisée » (136-139).

1.6.1 Pathogénèse du diabète auto-immun chez la souris NOD

Bien que l'on détecte les premiers signes cliniques du diabète auto-immun à partir de 12 semaines, la pathologie s'initie beaucoup plus tôt. On observe une vague d'apoptose des cellules β du pancréas causée par un remodelage normal du pancréas dans le développement, qui semble être une étape déterminante dans l'initiation de la maladie, sans en comprendre le mécanisme jusqu'à présent (140). En effet, on détecte peu de temps après une infiltration de leucocytes en périphérie des ilots de Langerhans, nommée péri-insulite, dès 2 à 4 semaines chez les femelles, et 5 à 7 semaines chez les mâles (135). Cette infiltration, qui progressera éventuellement en insulite, est composée entre autres de cellules dendritiques, de macrophages, de lymphocytes T et B (141). Ce sont avant tout les lymphocytes T qui sont les joueurs clés dans cette réponse auto-immune : une contribution des T CD4 et CD8 est nécessaire au développement de la pathologie. En effet, il a été démontré que la déplétion des T CD4 via l'injection de mAb CD4 abroge le développement du diabète, et que le transfert adoptif de lymphocytes T CD4 d'une souris diabétique vers une souris non-diabétique est suffisant pour déclencher une réponse auto-immune. L'utilisation de souris déficientes en β 2-microglobuline, qui n'ont pas de lymphocytes T CD8, a également permis de démontrer leur rôle essentiel (142, 143).

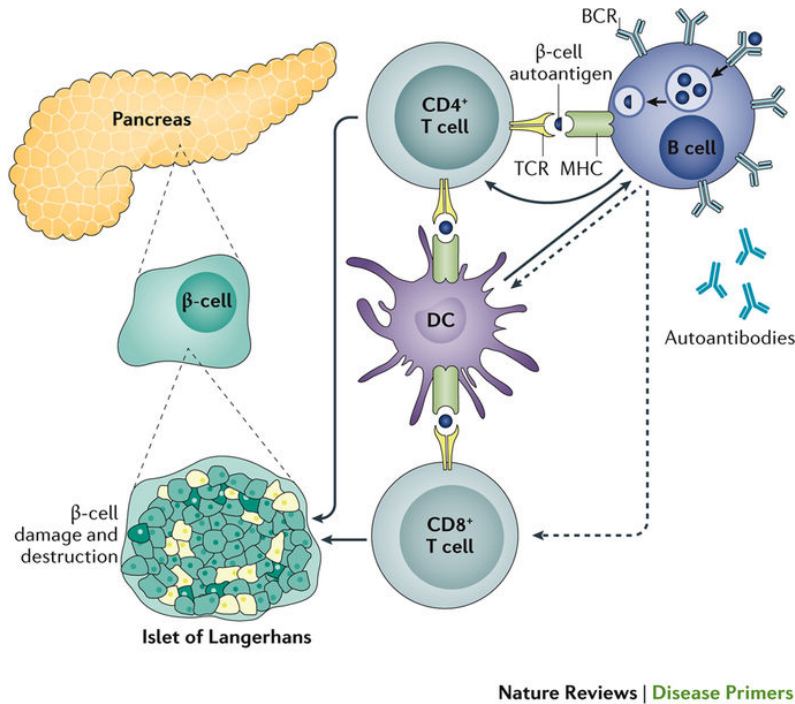


Figure 5. Pathogénèse du diabète auto-immun, tiré de (144)

Compte tenu de l'importance des lymphocytes T dans ce processus, il est important d'identifier la cellule présentatrice d'antigène responsable de leur activation. Les cellules dendritiques constituent des suspects très intéressants : leur déplétion dans un système de récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de CD11c (CD11c-DTR) a permis de démontrer une absence d'insulite et de réponse auto-immune subséquente (145). Cependant, lorsque la déplétion des DC est effectuée après le début de l'insulite, on observe une accélération de la maladie, suggérant que les DC sont à la fois dommageables et bénéfiques, potentiellement via des mécanismes ou sous-types distincts (145). On note entre autres des variations dans les proportions de pDC, de DC $CD8\alpha^-$ et de DC $CD8\alpha^+$ chez la NOD en comparaison avec des lignées résistantes au diabète auto-immun, comme la C57BL/6 (146). On sait que la déplétion des pDC accélère la maladie chez la NOD, possiblement en lien

avec leur production de IDO (145). En contraste, on attribue un rôle dommageable aux pDC, via leur production d'IFN α , dans le modèle de diabète STZ suite à une déplétion anti-BST2 (147). On attribue d'ailleurs un rôle similaire des pDC en auto-immunité humaine, soit dans le contexte du psoriasis, du SLE ou encore du T1D, où une forte signature en IFN de type I est associée à un mauvais pronostic (148).

On souligne également le rôle dommageable des DC CD8 α^- , puisque leur transfert spécifique dans une souris NOD dépourvue de DC accélère le développement du diabète auto-immun. Ces expériences démontrent bien l'importance des DC dans la maladie chez la souris, mais le rôle des sous-types de DC chez l'humain est moins bien caractérisé. L'équivalent fonctionnel humain des sous-types retrouvés chez la souris est bien établi, mais aucun défaut fonctionnel n'est pour l'instant associé aux DC dits classiques (149-151). On considère toutefois utiliser le potentiel tolérogénique des DC dans des thérapies ciblées chez l'humain (152).

Bien que de nombreuses études supportent un rôle des DC dans la réponse initiale aux antigènes des cellules β , dans l'insulite et dans la destruction des cellules, on ne peut ignorer l'existence d'autres APC telles que les macrophages et les lymphocytes B dans les îlots infiltrés (145). Cependant, seules les DC ont démontré la capacité à pouvoir capturer des antigènes exogènes tels que l'insuline pour pouvoir le présenter à des lymphocytes T CD8 via la présentation croisée, ajoutant à l'intérêt des DC dans le domaine.

Les lymphocytes B, bien que responsables de la présence d'auto-anticorps fréquemment retrouvés chez la souris et chez l'humain, ont une contribution plus complexe dans la pathogénèse. Le transfert d'auto-anticorps de souris diabétiques ne semble avoir aucun impact sur l'incidence du diabète (153). Cependant, la déplétion des lymphocytes B via

l'utilisation de souris NOD μ MT a mené à une diminution de l'incidence du diabète, sans l'éliminer complètement (154). Il semble donc plausible que les lymphocytes B contribuent à la pathogénèse via leur fonction d'APC, considérant une absence de progression dans des modèles où le MHC de classe I ou de classe II est délété de façon B-spécifique (153, 155).

1.6.2 Génétique du diabète auto-immun chez la NOD

Le diabète auto-immun est un trait complexe modulé par une multitude de locus génétiques communs entre la souris NOD et l'humain. Chez la souris, on nomme ces locus *Idd*, pour *Insulin dependent diabetes*. On rapporte jusqu'à présent plus de 23 régions *Idd*. Plusieurs de ces régions *Idd* furent identifiées en utilisant la souris NOR, ou Non Obese Resistant, le résultat d'un croisement congénique de la NOD avec les lignées C57BL/KsJ et DBA/2J (156). Il en résulte une souris au génotype majoritairement NOD, mais protégée du diabète par quelques régions qui sont depuis à l'étude, telles que l'*Idd5* sur le chromosome 1, l'*Idd13* sur le chromosome 2 et l'*Idd9* sur le chromosome 4.

Le locus *Idd1* contient le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et est nécessaire au développement de la maladie, mais pas suffisant par expliquer 100% de la contribution génétique (157). La souris NOD possède l'haplotype unique H-2^{g7}, qui a une substitution à la position 57 de la chaîne a du complexe I-A, altérant de façon significative le répertoire de peptides pouvant être présentés chez la NOD dans un contexte de classe II (158, 159). De plus, cet haplotype possède une mutation commune à d'autres haplotypes qui inactivent le locus *E α* , empêchant l'expression de complexes I-E en surface d'APC (160). Ces changements semblent influencer la sélection négative au niveau du thymus, l'induction de cellules T régulatrices, ou affecter les processus de tolérance périphérique (161, 162).

Le locus *Idd3*, qui contient les gènes *Il2* et *IL21*, est également un facteur de susceptibilité majeur. En effet, l'allèle NOD de IL-2 est polymorphique, et semble affecter la génération et la maintenance des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, qui sont fortement dépendants de la signalisation via l'IL-2R. En effet, les souris congéniques NOD.*Idd3* démontrent une fonction suppressive de leurs T régulateurs supérieure à la souris NOD (163-166). En contrepartie, on observe aussi une surexpression d'IL-21 chez la NOD, une cytokine nécessaire pour le développement de la réponse auto-immune, également modulée chez les souris NOD.*Idd3*, suggérant la présence de 2 gènes distincts au sein d'un même intervalle (167).

Le locus *Idd5.1* est le troisième locus majeur de susceptibilité au diabète auto-immun : il contient entre autres le gène *Ctla4*, aussi associé au T1D chez l'humain. L'allèle NOD de *Ctla4* contient un polymorphisme affectant son épissage, menant à une baisse d'expression d'un isoforme impliqué dans l'interaction avec CD80/CD86, diminuant le seuil d'activation des lymphocytes T (168). Par ailleurs, la souris congénique NOD.*Idd5.1* stimule également l'expression du Inducible T Cell Costimulator (ICOS), augmentant davantage le potentiel d'activation de lymphocytes T autoréactifs (169).

Le locus *Idd13*, situé sur le chromosome 2, est le sujet de plusieurs débats. On associe plusieurs phénotypes à cet intervalle, comme le contrôle de l'insulite, de la sélection négative au niveau du thymus et la régulation de la proportion de cellules iNKT (cellules T Natural Killer invariantes) (170-172). Plus d'un gène candidat également considéré dans le contrôle de ces phénotypes. Serreze et al. ont identifié *B2m*, le gène encodant pour la β -microglobuline qui est partie intégrante du MHC de classe I, comme gène candidat majeur (142, 156). En effet, une expérience de sauvetage transgénique de l'allèle B6 de *B2m* a démontré une

protection contre le diabète auto-immun chez la souris NOD via un mécanisme non-hématopoïétique (143). L'impact fonctionnel de l'allèle NOD de *B2m* reste à déterminer avec certitude, mais les auteurs postulent que ce dernier influence la stabilité du MHC, influençant le répertoire de peptides présentés. Les travaux de David Serreze suggèrent également l'existence de deux sous locus *Idd13*, suggérant que ce locus portent au moins deux gènes candidats (173). En effet, d'autres équipes ont examiné l'implication du facteur apoptotique BIM, encodé par le gène *Bcl2l11*, dont l'induction est déficiente dans les thymocytes de la NOD. Ce phénotype est associé à une diminution de l'apoptose, culminant à une dérégulation du processus de sélection négative et l'accumulation de lymphocytes T auto-réactifs (174-176). De plus, des données complémentaires suggèrent une contribution du gène *Sirpa*, connu pour son interaction avec le récepteur CD47 et rapporté comme très polymorphique chez la NOD (données tirées de (177)). La signalisation de CD47 s'avère importante dans le contexte du diabète auto-immun chez la souris, et le locus *SIRP* est lié à la susceptibilité au T1D chez l'humain (178, 179). Finalement, on associe à *Cd93* un rôle dans la régulation de la proportion des cellules iNKT chez la souris NOD (180).

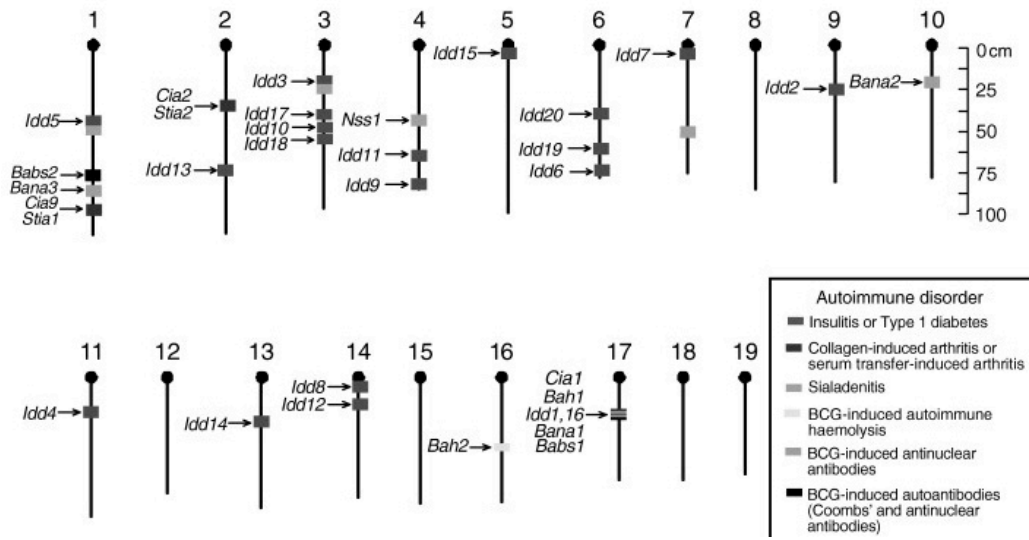


Figure 6 : Carte génétique des QTL auto-immuns chez la souris NOD, tiré de (181)

1.7 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Beaucoup d'efforts sont déployés pour comprendre la fonction des différentes populations composant le système immunitaire. Après tout, c'est en étudiant les mécanismes que nous pourrions mieux les comprendre et éventuellement les utiliser pour intervenir dans le contexte de maladies. On oublie trop souvent d'autres facteurs importants, perçus comme anodins, tels le nombre de cellules. Un très petit nombre de cellules dendritiques est suffisant pour induire la réponse d'une grande quantité de lymphocytes T. Or, des variations du nombre de plusieurs sous-types de DC in vivo sont associées à des phénotypes de déséquilibre du ratio Th1/Th2, à l'infection par le VIH ou du choix entre la prolifération et la délétion (57, 182, 183). On ne connaît cependant pas l'identité des facteurs génétiques associés à la régulation spécifique du nombre des sous-types de DC. On observe de plus des corrélations entre le nombre élevé de pDC et de mcDC chez la souris NOD en comparaison avec la souris C57BL/6, qui sont respectivement génétiquement susceptibles et résistantes au diabète auto-immun (184). C'est ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse suivante :

Une analyse génétique utilisant les souris B6 et NOD nous permettra d'identifier de nouveaux facteurs génétiques associés à la régulation spécifique des sous-types de DC, ce qui nous permettra ensuite de valider le rôle de ces phénotypes dans le diabète auto-immun.

Les objectifs principaux de cette thèse sont :

- Identifier les déterminants génétiques responsables de la régulation du nombre de DC plasmacytoïdes et mérocytiques
- Déterminer si des variations physiologiques du nombre de pDC et de mcDC permettent d'influencer la susceptibilité au diabète auto-immun chez la souris NOD

CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

2.1 THE SIZE OF THE PLASMACYTOID DENDRITIC CELL COMPARTMENT IS A MULTIGENIC TRAIT DOMINATED BY A LOCUS ON MOUSE CHROMOSOME 7

Adam-Nicolas Pelletier, Fanny Guimont-Desrochers, Michelle P. Ashton, Thomas C. Brodnicki and Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans *Journal of Immunology* **188 (11)**, 5561-70 (2012).

J'évalue ma contribution à 80%. J'ai fait toutes les expériences de la cohorte de F2, les analyses bioinformatiques associées pour l'identification des QTL, la quantification d'IFNa. J'ai élaboré le design expérimental avec Sylvie Lesage. J'ai rédigé en majorité le manuscrit, avec l'aide de Sylvie Lesage. Fanny Guimont-Desrochers a performé quelques expériences préliminaires de la figure 1, ainsi que l'expérience de chimère hématopoïétiques. Michelle Ashton et Tom Brodnicki ont aidé avec la quantification de pDC dans les souris congéniques, et également de la quantification IFNa.

The size of the plasmacytoid dendritic cell compartment is a multigenic trait dominated by a locus on mouse chromosome 7

Adam-Nicolas Pelletier^{*}, Fanny Guimont-Desrochers^{*}, Michelle P. Ashton^{†, ‡}, Thomas C. Brodnicki[†], Sylvie Lesage^{*}

^{*} Department of Immunology-oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada and Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

[†] St Vincent's Institute of Medical Research, Fitzroy, Victoria 3065 Australia

[‡] Department of Medicine, The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia

Running title : Immunogenetics of plasmacytoid dendritic cells

Keywords: plasmacytoid dendritic cells, linkage analysis, homeostasis

2.2 ABSTRACT

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) compose one of the many distinct dendritic cell (DC) subsets. The primary function of pDC is to potently produce type 1 interferons upon stimulation, which is highly relevant in anti-viral responses. Consequently, the ability to manipulate the size of the pDC compartment *in vivo* may increase the capacity to clear viral infections. In an attempt to identify genetic loci affecting the size of the pDC compartment, defined by both the proportion and absolute number of pDC, we undertook an unbiased genetic approach. Linkage analysis using inbred mouse strains identified a locus on chromosome 7 (*Pdcc1*) significantly linked to both the proportion and the absolute number of pDC in the spleen. Moreover, loci on either chromosome 11 (*Pdcc2*) or 9 (*Pdcc3*) modified the effect of *Pdcc1* on chromosome 7 for the proportion and the absolute number of pDC, respectively. Further analysis using mice congenic for chromosome 7 confirmed *Pdcc1*, demonstrating that variation within this genetic interval can regulate the size of the pDC compartment. Finally, mixed bone marrow chimera experiments showed that both the proportion and the absolute number of pDC are regulated by cell-intrinsic hematopoietic factors. Our findings highlight the multigenic regulation of the size of the pDC compartment and will facilitate the identification of genes linked to this trait.

2.3 INTRODUCTION

The primary characteristic defining plasmacytoid dendritic cells (pDC) is their ability to potently produce type 1 interferons (IFN) upon stimulation, conferring them with a key anti-viral role [1-3]. Indeed, mice presenting with a higher proportion of pDC produce more IFN- α in response to hypomethylated CpG [4]. The definitive *in vivo* contribution of pDC towards viral clearance was recently assessed by infecting pDC-depleted mice with either MCMV or VSV [5]. In the absence of pDC, MCMV-infected mice produced less type 1 IFN and presented with an altered natural killer (NK) cell response, while VSV-infected mice showed a significant decrease in the survival and recruitment of CD8 T cells. These observations demonstrate that in the context of specific viral infections, pDC contribute to both innate and adaptive immunity. Therefore, understanding the regulation of the pDC compartment may allow for the manipulation of pDC number and/or proportion, which should enhance immune responses towards viral infections.

pDC are present at a low proportion in secondary lymphoid tissues and compose approximately 1% of total spleen cells. The size of the pDC compartment is determined, as for any other hematopoietic subset, by the homeostatic pressures conferred to this cellular subset. As for other dendritic cell (DC) subsets, pDC are derived from Flt3⁺ precursors in the bone marrow [6, 7]. However, pDC are relatively quiescent, suggested by the low rate of incorporation of the DNA base analog, BrdU [8-10]. In addition, parabiotic experiments have demonstrated that the half-life of pDC is notably shorter than that of other DC subsets [9]. Hence, the quiescence and short half-life of pDC may contribute towards defining their small compartment size [3].

Molecular determinants favoring pDC differentiation have also been identified. A cDNA subtraction library demonstrated that Spi-B was preferentially expressed in human pDC relative to monocyte-derived DCs [11]. Overexpression and knockdown experiments conclusively demonstrate that Spi-B is a determining transcription factor promoting the differentiation of human pDC *in vitro* [11, 12]. IRF-8 also proved to be a key transcription factor in pDC differentiation and function, as *Irf8*-deficient mice presented with a much reduced proportion of pDC along with a deficiency in type I IFN production upon viral infection [13]. More recent studies have proposed that the E2-2 transcription factor serves as a specific regulator of the pDC transcription profile, acting upstream of both Spi-B and IRF-8, and revealed its importance in the maintenance of the pDC fate [14, 15]. Therefore, the differentiation of pDC is dependent on the timely expression of specific transcription factors.

Although the molecules and pathways relevant to the differentiation of pDC have been identified, the molecular determinants defining the size of the pDC compartment remain to be elucidated. Thus, we implemented an unbiased genetic approach to identify key genetic determinants that regulate the size of the pDC compartment. Asselin-Paturel et al. have previously documented differences in pDC proportion among different inbred mouse strains [4]. Based on these observations, we undertook a linkage analysis of (NODxB6) F_2 mice deficient for *Rag1* to identify loci that are linked to the size of the pDC compartment, which is defined by both the proportion and the absolute number of pDC. We found a significant linkage to both traits (proportion and absolute number of pDC) on the proximal end of mouse chromosome 7 and named the locus plasmacytoid dendritic cell compartment 1 (*Pdcci*).

Moreover, we identified genetic interactions between *Pdcd1* and a locus on chromosome 11 contributing to the proportion of pDC, named *Pdcd2*, and between *Pdcd1* and a locus on chromosome 9 contributing to the absolute number of pDC, named *Pdcd3*. These data demonstrated that the size of the pDC compartment in the spleen is a multigenic trait. We further validated the linkage of chromosome 7 to both the absolute number and the proportion of pDC using a congenic mouse strain and demonstrated that the size of the pDC compartment is determined by cell-intrinsic hematopoietic factors.

2.4 MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6 (hereafter denoted B6), C3H, BALB/c, NOD, NOR, NZW, B10.Br, B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory and subsequently maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal housing facility (Montreal, Canada). NOD.*H2k* [16], F1 (B10.Br x NOD.*H2k*), F1.Rag (B6 Rag1^{-/-} × NOD Rag1^{-/-}) and F2.Rag (F1.Rag^{-/-} × F1.Rag^{-/-}) mice were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal housing facility. For experiments using NOD.NZW-*Chr7* mice, NOD and NZW (both purchased from The Jackson Laboratory), as well as NOD.NZW-*Chr7* [17] mice were bred and maintained at St Vincent's Institute animal facility (Melbourne, Australia). Six to 8 week-old mice were used for phenotypic analyses. For generating bone marrow chimeras, F₁ (B10.Br × NOD.*H2k*) recipient mice were irradiated at 11 Grays and left to reconstitute for 8 weeks with 2 × 10⁶ bone marrow cells from B10.Br and NOD.*H2k* mice at a 1:1 ratio. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection, and the animal ethics committee at St. Vincent's Hospital approved the experimental procedures.

Flow cytometry

Spleens, lymph nodes and thymus are treated with 1mg/ml collagenase (Type V from *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37°C. Bone marrow is flushed from the femur and tibias. Livers were perfused with PBS and subsequently with collagenase (1mg/ml). Livers were then harvested and digested for 25 minutes at 37°C. Lungs were

perfused with PBS, harvested and digested for 30 minutes at 37°C with collagenase. All organs were passed through a 70µm cell strainer (BD Biosciences) to yield single cell suspensions prior to staining with antibodies. CD11c PE-Cy7, CD11c FITC, Siglec H PE and B220 APC antibodies were purchased from Biolegend, mPDCA-1 APC from Miltenyi Biotec and B220 PerCP from BD Biosciences. All samples were run using either a FACSCalibur (BD Biosciences), FACSCanto I (BD Biosciences) or BD LSRII (BD Biosciences) and were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR). Note that we implemented a precise gating strategy to allow for the accurate identification of pDC proportion in Rag-deficient mice. Briefly, to remove autofluorescent cells [18], two dump channels are used on the 488nm laser, namely FL1 and FL2. A live gate is then applied and doublets are removed. pDCs are subsequently selected based on the CD11c^{low}Bst-2⁺ phenotype. Finally, a strict size exclusion gate is applied to the FSC/SSC profile, corresponding to the pDC subset.

Linkage Analysis

Genomic DNA was isolated from the tails of F2.Rag male and female mice by using the DNeasy blood and tissue kit from Qiagen. Single nucleotide polymorphisms were then detected from the F2.Rag mice DNA using the Illumina mouse low density linkage panel serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, Ontario, Canada. Additional genetic markers were used to delimit the interval on mouse chromosome 7, namely *D7Mit178* (3.46Mb), *D7Mit306* (10.99Mb) and *D7Mit191* (19.47Mb). The logarithm of odds (LOD) scores were obtained through a single- or two-dimensional quantitative trait locus model using the R/qtl package [19] for the R software (version 2.11.1). LOD scores higher than 3.1 were considered significant for single-dimensional analysis

according to permutation tests ($n=10\ 000$, $p=0.05$), and LOD scores between 2 and 3.1 were considered suggestive. The two-dimensional model required a LOD score of 9.3 for significance, calculated by permutation testing ($n=1000$, $p=0.05$).

IFN α production

pDC were sorted from pooled spleens of B6, NOD, NZW and NOD.NZW-*Chr7* mice. Purity was always above 95%. 1×10^5 sorted pDC were stimulated for 21h *in vitro* using 5 $\mu\text{g/ml}$ CpG ODN 2216 (Invivogen). The concentration of IFN α present in the supernatant was assessed with FlowCytomix Mouse IFN α detection kit (eBioscience).

Measure of proliferation and apoptosis

B10.Br and NOD.*H2k* mice were sacrificed 24 hours after i.p. injection with 1 mg BrdU. Extracellular staining for CD11c and Bst-2 on total spleen cells was performed prior to intracellular staining for BrdU, active caspase-3 and Bcl-2 (BD Biosciences), which were performed using the permeabilization kit BD Cytofix/CytoPerm. For BrdU, a 1 hour OmniPur DNase I treatment (Calbiochem) was also performed. An isotype antibody control was used for Bcl-2 staining (BD Biosciences), while the other intracellular stainings were compared using the fluorescence-minus-one approach [20].

Statistical analysis

Data were tested for significance using a non-parametric Mann-Whitney test with a minimal threshold of 0.05. Estimation of the interval coordinates was obtained using a 95% Bayes interval test. All statistical analyses and the F_2 distribution were obtained using the SPSS 17.0 software.

2.5 RESULTS

To identify pDC in the spleen, we took advantage of their $CD11c^{low}Bst-2^{+}$ specific phenotype, where Bst-2 is detected using the mPDCA-1 monoclonal antibody (Figure 1A) [21]. Notably, all $CD11c^{low}Bst-2^{+}$ cells express B220 (supplementary figure 1a), validating the specificity of the CD11c and Bst-2 marker combination in delineating the pDC population. Using these cell-surface markers, Asselin-Paturel et al. documented variation for the proportion of pDC among a panel of inbred mouse strains, where B6 exhibited the lowest and 129Sv the highest pDC proportion in the spleen [4]. To confirm and extend this study, we measured the proportion of pDC in spleens obtained from five inbred mouse strains, two of which had not been previously documented, namely NOD and NOR strains. In addition, we documented the absolute number of pDC in the spleen of each strain. Similar to that observed by Asselin-Paturel et al. [4], B6 mice exhibited the lowest proportion and number of pDC (Figure 1B). C3H and BALB/c mouse strains presented slightly increased levels, whereas NOD and NOR mouse strains exhibited the highest proportion and absolute number of pDC in this collection of mouse strains (Figure 1B).

To investigate the genetic basis of pDC variation in mice, we performed a linkage analysis using B6 and NOD mouse strains for the following reasons. First, these two mouse strains respectively exhibited the lowest and highest levels of pDC (Figure 1B), suggesting that these distinct genetic backgrounds provide the greatest chance of detecting genetic linkage to this pDC trait in a (NODxB6) F_2 cohort. Second, the NOD mouse strain is a widely used model for genetic studies of type 1 diabetes (T1D). A number of congenic NOD strains have been

generated to confirm T1D loci [22, 23] and, accordingly, could be used to confirm overlapping loci identified in our pDC linkage analysis.

One potential limitation for a linkage analysis of pDC is the sensitivity for measuring variation of pDC levels in a (NODxB6) F_2 outcross. We first validated that CD11c^{low}Bst-2⁺ cells efficiently delineated pDC in both parental strains, namely B6 and NOD mice. We found that Bst-2 and Siglec-H were effectively co-expressed on CD11c^{low} cells from both mouse strains (supplementary figure 1b), in steady state conditions [24]. Hence, we continued using only CD11c and Bst-2 to identify pDC. The difference between B6 and NOD mouse strains for the proportion of pDC was less than 1%, where B6 and NOD mouse strains respectively had an average of 0.6% and 1.5% pDC in the spleen (Figure 1B). To enhance the detection of pDC differences, we postulated that the proportion of pDC would be increased in mice harboring a null mutation for *Rag* due to the lack of lymphocytes in these mice. Accordingly, we determined the proportion of pDC in B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice, hereafter respectively referred to as B6.Rag and NOD.Rag. As Rag-deficient mice lack T and B cells, the gating strategy was adapted to account for a much higher percentage of autofluorescent cells ([18], Figure 2A, see also materials and methods). We found that a larger difference could be detected for the proportion of pDC between NOD.Rag and B6.Rag mice (Figure 2B) compared to the difference observed between NOD and B6 wildtype mice (Figure 1B). Indeed, the Rag-deficient background presented a difference of 8% in pDC proportion (an average of 8% vs 16% of pDC was detected in B6.Rag and NOD.Rag mice, respectively), as opposed to a difference of <1% in the Rag-sufficient background. Moreover, the sensitivity in pDC detection was increased upon Rag-deficiency, where, for instance, B6.Rag mice

exhibited 8% pDC compared with only 0.6% in B6 mice. Together, these data demonstrate that the sensitivity in detecting pDC is increased in Rag-deficient mice. Correspondingly, as for Rag-sufficient mice, the absolute number of pDC in the spleen was lower in B6.Rag mice relative to NOD.Rag mice (Figure 2C). As NOD.Rag mice do not develop autoimmunity due to the absence of lymphocytes, these observations further indicate that the increased pDC proportion observed in the NOD mice, relative to the B6 mice, is not a consequence of an underlying autoimmune pathology.

Based on the increased sensitivity for detecting pDC in *Rag1*-deficient mice and the consequential increased difference in pDC proportion between B6.Rag and NOD.Rag mice, we generated a cohort of 181 (NOD.Rag x B6.Rag) F_2 mice (referred to as F2.Rag). The proportion of pDC in F2.Rag mice varied from 1.3 to 39% and showed a normal distribution (Figure 3A). Genome-wide single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping was performed on this F2.Rag cohort by taking advantage of the Illumina low density platform. The linkage analysis for pDC proportion demonstrated a significant linkage on chromosome 7 with a LOD score of 5.46, well above the significance threshold of 3.1 determined by permutation testing (Figure 3B). In addition, linkage above the suggestive threshold was observed on both chromosomes 8 and 13, with a locus on chromosome 1 almost reaching the suggestive threshold (Figure 3B).

The size of the pDC compartment is defined by both the proportion and the absolute number of pDC. Therefore, to fully characterize the genetic loci defining the size of the pDC compartment, we performed a linkage analysis on the absolute number of pDC in the spleen of

F2.Rag mice. The absolute number of pDC in the F2.Rag cohort exhibited a normal distribution (Figure 3C) and was significantly linked to the same locus as pDC proportion on mouse chromosome 7 (Figure 3D). Linkage above the suggestive threshold on chromosomes 1 and 16 were observed, yet chromosomes 8 and 13 were not linked to the absolute number of pDC. Together, these data show that a dominant locus on chromosome 7 is significantly linked to both the proportion and the absolute number of pDC, while additional suggestive linkage are distinctly linked to either trait.

To delimit the interval associated with the size of the pDC compartment on mouse chromosome 7, the F2.Rag cohort was genotyped for three additional genetic markers (*D7Mit191*, *D7Mit306* and *D7Mit178*). These three markers are proximal to the SNP rs3720735, the most proximal informative SNP from the Illumina low density platform. Higher resolution maps of chromosome 7 for linkage to both the proportion and the absolute number of pDC further delimited the locus, which we have named *Pdcl1*. *Pdcl1* is located at the proximal end of the chromosome 7 with a peak at 47.7Mb corresponding to the SNP rs3670807 (Figures 4A and 4B). The 95% Bayes interval test delimits the *Pdcl1* locus between 23.5Mb and 63.5Mb. To evaluate the direct relationship of *Pdcl1* to the size of the pDC compartment, the F2.Rag mice were segregated according to their genotype at SNP rs3670807 (Figure 4C and 4D). The F2.Rag mice harboring the NOD/NOD homozygous genotype at the SNP rs3670807 exhibited a higher proportion and absolute number of pDC relative to those mice harboring the heterozygous B6/NOD genotype, which exhibited higher levels of pDC compared with mice harboring the homozygous B6/B6 genotype.

The normal distribution of the proportion and absolute number of pDC in F2.Rag mice suggested a multigenic trait, yet only the proximal region of chromosome 7 was significantly associated with this trait. Joint LOD score analyses were subsequently performed to reveal genetic interactions that may further define the loci affecting the proportion of pDC [25]. Although suggestive linkages were identified on chromosomes 8 and 13 for the proportion of pDC (Figure 3B) and on chromosomes 1 and 16 for the absolute number of pDC (Figure 3D), the joint LOD score analysis indicated that these linked regions were unlikely to interact with one another or *Pdcd1* to affect either the proportion or the absolute number of pDC (Figure 5A and 5B). On the other hand, the joint LOD score analysis detected significant genetic interactions between loci on chromosome 7 and 11 that linked to the proportion of pDC and between loci on chromosome 7 and 9 that linked to the absolute number of pDC (Figure 5A and 5B). Further segregation analysis indicated that these interactions are complex. The two SNPs defining the peak joint LOD score (Chr7 – rs3670807, Chr11 – rs1341088) were used to segregate mice and determine the mean proportion of pDC for each genotype combination (Figure 5C). Mice that were NOD homozygous for both SNPs exhibited the highest proportion of pDC. Intriguingly, mice that were B6 homozygous for both SNPs did not exhibit the lowest pDC proportion. The lowest proportion was found in mice that were B6 homozygous for the chromosome 7 SNP, but NOD homozygous for the chromosome 11 SNP. Mice with the remaining genotype combinations had pDC levels that were intermediate or similar to these other genotypes (Figure 5C). Similarly, segregation of F2.Rag mice according to their genotype at the two SNPs defining the peak joint LOD score (Chr7 – rs3670807, Chr9 – rs3665206) for the absolute number of pDC also demonstrated a complex interaction (Figure 5D). The lowest number of pDC was found in mice that were B6 homozygous for the

chromosome 7 SNP and NOD homozygous for the chromosome 9 SNP (Figure 5D). These results reinforced the finding that *Pdcd1* is a key genetic determinant for this trait, but also pointed to two distinct loci, namely *Pdcc2*, located on chromosome 11, and *Pdcc3*, located on chromosome 9, that can modify the effect of *Pdcd1* depending on the genotype combination.

To confirm that *Pdcd1* is a key locus in determining the size of the pDC compartment, we took advantage of a congenic NOD strain (NOD.NZW-*Chr7*) that harbors an NZW-derived chromosome 7 interval ([17] and Figure 6A). Notably, NOD.NZW-*Chr7* mice exhibited a significant reduction in both the proportion and the absolute number of pDC in the spleen compared to NOD mice (Figure 6B). Also, there is a tendency towards a reduction in pDC number in all organs examined (supplementary figure 2), suggesting that the decrease in number observed in the spleen is not due to preferential accumulation of pDC in other lymphoid organs in the NOD.NZW-*Chr7* congenic mouse. Therefore, changing the genetic interval on chromosome 7 in NOD mice alters the size of the pDC compartment in Rag-sufficient mice. This observation not only confirms our linkage of *Pdcd1* to this trait, it agrees with the premise that the size of the pDC compartment in both Rag-deficient and Rag-sufficient mice is defined at least in part by similar genetic variants.

As the level of pDC was not originally measured in NZW mice, we included these mice in our comparison of NOD and NOD.NZW-*Chr7* mice. Unexpectedly, the proportion of pDC in NOD.NZW-*Chr7* mice was even lower than in NZW mice (Figure 6B). This was not the case for the absolute number of pDC, where both NZW and NOD.NZW-*Chr7* mice exhibited a similar number of pDC in the spleen (Figure 6B). Along with the joint LOD score and

segregation analysis described above, these results support the view that genetic interactions between two or more loci contribute to the proportion of pDC because the effect of the NZW-derived congenic interval was increased when placed on the NOD genetic background. These data also corroborate the contribution of distinct modifier loci outside the chromosome 7 interval in the regulation of each trait, namely the proportion and the absolute number of pDC.

In addition to variation in the proportion of pDC in different mice, pDC from B6 mice are known to produce significantly less IFN- α than pDC from 129 mice, where the latter exhibit a higher proportion of pDC [4]. Similarly, we found that pDC from B6 mice produce less IFN- α than pDC from NOD mice on a per cell basis (Figure 6C). To assess whether *Pdcd1* affects the production of IFN- α , we compared IFN- α production of pDC sorted from both NOD mice and NOD.NZW-*Chr7* congenic mice. pDC from NOD.NZW-*Chr7* congenic mice produced similar levels of IFN- α than those from NOD mice on a per cell basis (Figure 6D). Similarly, pDC from the NZW parental strain also produced similar levels of IFN- α than those from NOD mice on a per cell basis (Figure 6C). These results suggest that *Pdcd1* affects the size of the pDC compartment and is unlikely to affect IFN- α production by pDC.

The *Pdcd1* locus on chromosome 7, currently defined by linkage and congenic analyses, is relatively large (>90Mb) and presents with over 1000 genes. To restrict the candidate gene search for *Pdcd1*, we performed bone marrow chimera experiments to determine whether pDC proportion is regulated by cell-intrinsic or –extrinsic hematopoietic factors. The two inbred strains used are B10.Br and NOD.*H2k*, where both strains carry the same MHC locus, allowing for the efficient generation of mixed chimerism [26, 27]. The B10.Br inbred strain is

highly similar to the B6 strain and both strains present a similar frequency of pDC (Figure 7A, compare with Figure 1B). The NOD and the NOD.*H2k* congenic strains also exhibited a comparable proportion of pDC (Figure 7A, compare with Figure 1B). This was expected, because the MHC locus on chromosome 17 was not linked to the size of the pDC compartment (Figures 3 and 5). Bone marrow from B10.Br and NOD.*H2k* mice, which carry the same MHC locus yet a different proportion of pDC, were mixed at a 1:1 ratio in a lethally irradiated F1 (B10.Br x NOD.*H2k*) recipient and left to reconstitute for 8 weeks before analysis. By taking advantage of the CD45 congenic markers for each strain, we found that the B10.Br (CD45.2) and NOD.*H2k* (CD45.1) bone marrow reconstituted the B cell compartment in relatively equal proportions (Figure 7B). However, both the proportion and the absolute number of pDC originating from the NOD.*H2k* strain were significantly increased in comparison to those from the B10.Br strain (Figure 7B). These results demonstrate that the size of the pDC compartment is regulated by cell-intrinsic hematopoietic factors, suggesting that potential candidate genes for *Pdcd1* should be expressed in hematopoietic cells.

Identifying the specific cellular processes that control the size of the pDC compartment may help further restrict the list of candidate genes. The size of the pDC compartment may be influenced by the rate of pDC proliferation in the different mouse strains. We compared the proliferative rate of pDC in B10.Br and NOD.*H2k* mice by BrdU labeling. As demonstrated by others, we find that pDC are relatively quiescent [8-10]. In addition, we show that BrdU incorporation in pDC was similar in both strains (Figure 7C), suggesting that the higher number of pDC in the spleen of NOD.*H2k* mice is not due to an apparent increase in cell cycling. An increase in pDC survival provides an alternative explanation for the increased size

in pDC compartment in NOD.*H2k* mice, relative to B10.Br. However, we find that both Bcl-2 and active caspase-3 levels are present at comparable levels in pDC from both strains (Figure 7D). Together, these findings suggest that the different size of the pDC compartment between B10.Br and NOD.*H2k* mice is not due to significant variations in pDC proliferation or apoptotic markers and most likely results from other complex cellular processes.

2.6 DISCUSSION

pDC have been shown to contribute to both innate and adaptive immunity, as well as rapidly produce vast amounts of type I IFNs in response to viral antigens [5, 28]. Consequently, a more comprehensive understanding of the genetic factors that define the size of the pDC compartment may have relevant therapeutic ramifications. Through an unbiased linkage analysis, we demonstrate that the genetic locus *Pdcc1*, which is located in the proximal region of chromosome 7, affects the size of the pDC compartment, as both pDC proportion and absolute number are linked to this same locus. Importantly, using NOD.NZW-*Chr7* congenic mice, we validated the impact of the *Pdcc1* locus in determining the size of the pDC compartment. The distribution of pDC proportion and absolute number in F2.Rag mice, as well as the identification of *Pdcc2* and *Pdcc3* as modifiers of *Pdcc1*, also highlight that the size of the pDC compartment is a multigenic trait. Finally, we demonstrate that factors of hematopoietic origin contribute towards defining the size of the pDC compartment.

In this study, we performed a linkage analysis of the proportion and absolute number of pDC in a cohort of F2.Rag mice resulting from a cross between B6.Rag and NOD.Rag mice. The use of Rag-deficient mice provided a means to increase the relative proportion of rare immune cell types, allowing better sensitivity in the linkage analysis. Although NOD mice are prone to spontaneously developing autoimmune diseases, NOD.Rag mice lack both T and B cells necessary for autoimmunity. The NOD.Rag mice thus permitted the analysis of pDC in the absence of underlying inflammation caused by the progression of an autoimmune response. Of interest, the relative difference in the proportion and absolute number of pDC between the B6 and NOD genetic backgrounds is maintained in both Rag-sufficient and Rag-deficient mice,

where the B6 genetic background always presents with fewer pDC relative to NOD regardless of the presence or absence of B and T cells. These results suggest that the relative size of the pDC compartment in various genetic backgrounds is defined, at least in part, independently of the presence of both T and B cells. We further show that the linkage of *Pdcd1* to the pDC proportion and absolute number is independent of Rag-deficiency. Indeed, NOD.NZW-*Chr7* Rag-sufficient mice show a low proportion and absolute number of pDC relative to NOD mice demonstrating that the proximal region of chromosome 7 defines the size of the pDC compartment even in the presence of T and B cells.

Although dominated by the *Pdcd1* locus on mouse chromosome 7, three observations from this study suggest that the size of the pDC compartment is a multigenic trait. Firstly, the F2.Rag cohort represents a normal distribution with regards to both the proportion and the absolute number of pDC, indicating that more than one locus contributes to these pDC traits. Secondly, chromosomes 8 and 13 exhibited suggestive linkage to the proportion of pDC and chromosomes 1 and 16 to the absolute number of pDC. While potential false positives, these suggestive linkages may also be concealed to some degree by *Pdcd1* which acts as a dominant locus [25] and will need to be validated using congenic strains. Thirdly, a genetic interaction between *Pdcd1* and *Pdcd2* was significantly linked to the proportion of pDC, while that of *Pdcd1* and *Pdcd3* was linked to the absolute number of pDC in the spleen. The complex distribution of the pDC compartment size resulting from the interactions between the compound genotypes of *Pdcd1*, *Pdcd2* and *Pdcd3* further highlights the dominant effect of *Pdcd1* in this multigenic trait.

Candidate genes for *Pdcc1*, *Pdcc2* and *Pdcc3* remain to be defined. The bone marrow chimeras demonstrate that the size of the pDC compartment is regulated by cell-intrinsic hematopoietic factors. In addition, we find that neither proliferation of pDC nor the expression level of apoptotic markers in pDC vary between B10.Br and NOD.*H2k* mice; these parameters are thus unlikely to contribute towards defining the size of the pDC compartment among these strains of mice. Rather, these data suggest that the underlying cellular process defining the size of the pDC compartment may either result from more subtle variations in pDC proliferation or apoptosis not detectable in the context of the assays performed herein or from more complex hematopoietic-dependent factors, including but not limited to the presence of a key cytokine, cell-cell interaction with other hematopoietic cells and/or the rate of hematopoietic differentiation of pDC. To that effect, a number of genes (*Spi-B*, *E2-2*, *IRF-4*, *IRF-8* and *Flt3*) have been shown to contribute to the hematopoietic differentiation of pDC [7, 11, 12, 14, 15]. Of these genes, *Spib* and *Flt3l* (*Flt3* ligand) are encoded on chromosome 7 between 51-53Mb, comprised within the NOD.NZW-*Chr7* congenic interval contributing to the size of the pDC compartment. *Spi-B* is a transcription factor implicated in the differentiation of both B cells and pDC [11, 29, 30], where overexpression of *Spi-B* in hematopoietic progenitors leads to an increase in pDC number [11]. In addition, *Flt3L* promotes the differentiation of all DC subsets and is known to increase pDC number [31]. *Spib* and *Flt3l* are thus two candidate genes of interest which may define the size of the pDC compartment. Additional studies are required to identify which are the causal genetic variants within *Pdcc1*, *Pdcc2* and *Pdcc3* responsible for these locus effects.

As we and others have observed variation for IFN- α production from pDC of various mouse strains, we examined the influence of the *Pdcd1* locus on IFN- α production by pDC. As for NZW mice, pDC from NOD.NZW-*Chr7* mice produced similar levels of IFN- α than those from NOD mice upon *in vitro* stimulation. These results suggest that the *Pdcd1* locus is linked to the size of the pDC compartment at steady state and is unlikely to participate in modulating the production of IFN- α by pDC. Of interest, others have recently shown that serum IFN- α levels determine the size of the pDC compartment in inflammatory conditions [32]. It is thus tempting to suggest that different cellular mechanisms control the size of the pDC compartment in steady state and under inflammatory conditions.

Other than their role in the production of IFN- α , pDC have been associated with the induction of immune tolerance, where pDC favor the differentiation and function of regulatory T cells [33-35]. In agreement with a role for pDC in immune tolerance, T1D patients exhibited a lower proportion of pDC in the blood compared with unaffected individuals [36]. Notwithstanding, the contribution of pDC in the establishment of self-tolerance and in the prevention of autoimmune disease progression remains controversial [37]. Indeed, pDC are found at higher proportion in various autoimmune pathologies, including SLE, psoriasis and T1D [38-40]. Moreover, type I IFN responses, which are predominantly due to activated pDCs, are associated with increased susceptibility to SLE, Sjogren's syndrome and T1D [41-44]. In NOD mice, elimination of pDC has been reported to both facilitate the progression to insulinitis [45] and prevent diabetes onset [46]. Lastly, our study identified a higher proportion of pDC in NOD mice, which spontaneously develop sialadenitis, thyroiditis and autoimmune

diabetes [47]. Hence, the contribution of pDC in immune tolerance and prevention of autoimmunity remains to be clearly defined [37].

The data presented herein suggest that an elevated proportion of pDC is neither necessary nor sufficient for autoimmune diabetes progression. First, NOD.NZW-*Chr7* mice present a low proportion of pDC relative to NOD mice, but both strains show a comparable incidence of autoimmune diabetes [17], demonstrating that elevated proportion of pDC is not necessary for autoimmune diabetes progression. Second, both NOR mice, which are highly genetically related to NOD mice [48-50], and 129 mice [4] exhibit a high proportion of pDC similar to NOD mice, yet do not develop insulinitis or diabetes. This observation indicates that elevated pDC levels are not sufficient to promote T1D pathogenesis. This, however, does not preclude a potential contribution of increased pDC levels in other autoimmune diseases. Indeed, sialadenitis is less severe in NOD.NZW-*Chr7* mice [17], which correlates with low pDC proportion. Further investigation of the pathophysiological processes leading to the distinct autoimmune pathologies of insulinitis and sialadenitis in NOD mice may better characterize the contribution of pDC to specific autoimmune diseases.

Finally, as pDC have been mostly studied for the ability to effectively produce IFN- α upon viral infections, it would be interesting to investigate the efficiency of NOD and NOR inbred mice, relative to mice presenting a lower proportion of pDC, in the clearance of viral pathogens. Accordingly, elimination of pDC influences the anti-viral immune response [5]. Therefore, characterization of the *Pdcc1*, *Pdcc2* and *Pdcc3* loci could assist in the

identification of the molecular determinants that influence the size of the pDC compartment needed to improve anti-viral responses and/or immune tolerance regimens.

2.7 ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Sean Wiltshire for support and advice with regards to the use of R software, Lisa Bellemare and Marycruz Domínguez-Punaro for technical support with regards to lung and liver samples, Marie-Josée Guyon and the animal house staff for curating the mouse colonies, Dr. Nathalie Labrecque for critical review of the manuscript and Erin E. Hillhouse for help with editing the manuscript.

2.8 REFERENCES

1. Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J: **Plasmacytoid dendritic cells in immunity.** *Nature Immunology* 2004, **5**(12):1219-1226.
2. Cao W, Liu Y-J: **Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells.** *Current Opinion in Immunology* 2007, **19**(1):24-30.
3. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V: **Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions.** *Annual Review of Immunology* 2011, **29**:163-183.
4. Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Briere F, Trinchieri G: **Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody.** *J Immunol* 2003, **171**(12):6466-6477.
5. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M: **Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual.** *Immunity* 2010, **33**(6):955-966.
6. Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, Carotta S, O'Keeffe M, Bahlo M, Papenfuss A *et al*: **Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo.** *Nat Immunol* 2007, **8**(11):1217-1226.
7. Wu L, Liu YJ: **Development of dendritic-cell lineages.** *Immunity* 2007, **26**(6):741-750.
8. Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K: **The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations.** *J Immunol* 2000, **165**(12):6762-6770.
9. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M: **Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice.** *Nat Immunol* 2007, **8**(6):578-583.
10. O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Caminschi I, Miller JL, Anders EM, Wu L, Lahoud MH, Henri S, Scott B *et al*: **Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus.** *J Exp Med* 2002, **196**(10):1307-1319.
11. Schotte R, Rissoan MC, Bendriss-Vermare N, Bridon JM, Duhon T, Weijer K, Briere F, Spits H: **The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development.** *Blood* 2003, **101**(3):1015-1023.
12. Schotte R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Blom B: **The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development.** *J Exp Med* 2004, **200**(11):1503-1509.
13. Schiavoni G, Mattei F, Sestili P, Borghi P, Venditti M, Morse HC, 3rd, Belardelli F, Gabriele L: **ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells.** *J Exp Med* 2002, **196**(11):1415-1425.

14. Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, Holmberg D, Zweier C, den Hollander NS, Kant SG *et al*: **Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development.** *Cell* 2008, **135**(1):37-48.
15. Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B: **Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells.** *Immunity* 2010, **33**(6):905-916.
16. Podolin PL, Pressey A, DeLarato NH, Fischer PA, Peterson LB, Wicker LS: **I-E+ nonobese diabetic mice develop insulinitis and diabetes.** *J Exp Med* 1993, **178**(3):793-803.
17. Burt RA, Watkins L, Tan IK, Wang N, Quirk F, Mackin L, Morgan P, Zhang JG, Berzins SP, Morahan G *et al*: **An NZW-derived interval on chromosome 7 moderates sialadenitis, but not insulinitis in congenic nonobese diabetic mice.** *J Immunol* 2010, **184**(2):859-868.
18. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K: **CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen.** *J Immunol* 2000, **164**(6):2978-2986.
19. Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA: **R/qtl: QTL mapping in experimental crosses.** *Bioinformatics* 2003, **19**(7):889-890.
20. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Parks DR: **Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed.** *Nat Immunol* 2006, **7**(7):681-685.
21. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V: **Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions.** *Annu Rev Immunol* 2011, **29**:163-183.
22. Wicker LS, Todd JA, Peterson LB: **Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse.** *Annu Rev Immunol* 1995, **13**:179-200.
23. Maier LM, Wicker LS: **Genetic susceptibility to type 1 diabetes.** *Curr Opin Immunol* 2005, **17**(6):601-608.
24. Blasius AL, Giurisato E, Cella M, Schreiber RD, Shaw AS, Colonna M: **Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation.** *J Immunol* 2006, **177**(5):3260-3265.
25. Carlborg O, Haley CS: **Epistasis: too often neglected in complex trait studies?** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(8):618-625.
26. Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilson J, Townsend M, Goodnow CC: **Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes.** *J Exp Med* 2002, **196**(9):1175-1188.
27. Guimont-Desrochers F, Cappello ZJ, Chagnon M, McDuffie M, Lesage S: **Cutting edge: Genetic characterization of IFN-producing killer dendritic cells.** *J Immunol* 2009, **182**(9):5193-5197.
28. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F *et al*: **Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology.** *Nat Immunol* 2001, **2**(12):1144-1150.

29. DeKoter RP, Geadah M, Khoosal S, Xu LS, Thillainadesan G, Torchia J, Chin SS, Garrett-Sinha LA: **Regulation of follicular B cell differentiation by the related E26 transformation-specific transcription factors PU.1, Spi-B, and Spi-C.** *J Immunol* 2010, **185**(12):7374-7384.
30. Su GH, Chen HM, Muthusamy N, Garrett-Sinha LA, Baunoch D, Tenen DG, Simon MC: **Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B.** *EMBO J* 1997, **16**(23):7118-7129.
31. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ: **Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified.** *J Exp Med* 1996, **184**(5):1953-1962.
32. Swiecki M, Wang Y, Vermi W, Gilfillan S, Schreiber RD, Colonna M: **Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo.** *J Exp Med* 2011, **208**(12):2367-2374.
33. Huang Y, Bozulic LD, Miller T, Xu H, Hussain LR, Ildstad ST: **CD8alpha+ plasmacytoid precursor DCs induce antigen-specific regulatory T cells that enhance HSC engraftment in vivo.** *Blood* 2011, **117**(8):2494-2505.
34. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y *et al*: **Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts.** *Nat Immunol* 2006, **7**(6):652-662.
35. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, Qin XF, Liu YJ, Gilliet M: **Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand.** *J Exp Med* 2007, **204**(1):105-115.
36. Chen X, Makala LH, Jin Y, Hopkins D, Muir A, Garge N, Podolsky RH, She JX: **Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood.** *Clin Immunol* 2008, **129**(3):413-418.
37. Tisch R, Wang B: **Role of plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes: friend or foe?** *Diabetes* 2009, **58**(1):12-13.
38. Bowcock AM, Krueger JG: **Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**(9):699-711.
39. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL: **Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions.** *Am J Pathol* 2001, **159**(1):237-243.
40. Allen JS, Pang K, Skowera A, Ellis R, Rackham C, Lozanoska-Ochser B, Tree T, Leslie RD, Tremble JM, Dayan CM *et al*: **Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture.** *Diabetes* 2009, **58**(1):138-145.
41. Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J: **Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(9):3372-3377.
42. Li Q, Xu B, Michie SA, Rubins KH, Schreiber RD, McDevitt HO: **Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(34):12439-12444.

43. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA: **Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes.** *Science* 2009, **324**(5925):387-389.
44. Bave U, Nordmark G, Lovgren T, Ronnelid J, Cajander S, Eloranta ML, Alm GV, Ronnblom L: **Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(4):1185-1195.
45. Saxena V, Ondr JK, Magnusen AF, Munn DH, Katz JD: **The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse.** *J Immunol* 2007, **179**(8):5041-5053.
46. Li Q, McDevitt HO: **The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse.** *Clin Immunol* 2011, **140**(1):3-7.
47. Anderson MS, Bluestone JA: **THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:447-485.
48. Serreze DV, Prochazka M, Reifsnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH: **Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene.** *J Exp Med* 1994, **180**(4):1553-1558.
49. Ivakine EA, Fox CJ, Paterson AD, Mortin-Toth SM, Canty A, Walton DS, Aleksa K, Ito S, Danska JS: **Sex-specific effect of insulin-dependent diabetes 4 on regulation of diabetes pathogenesis in the nonobese diabetic mouse.** *J Immunol* 2005, **174**(11):7129-7140.
50. Reifsnyder PC, Li R, Silveira PA, Churchill G, Serreze DV, Leiter EH: **Conditioning the genome identifies additional diabetes resistance loci in Type I diabetes resistant NOR/Lt mice.** *Genes Immun* 2005, **6**(6):528-538.

2.9 FIGURES

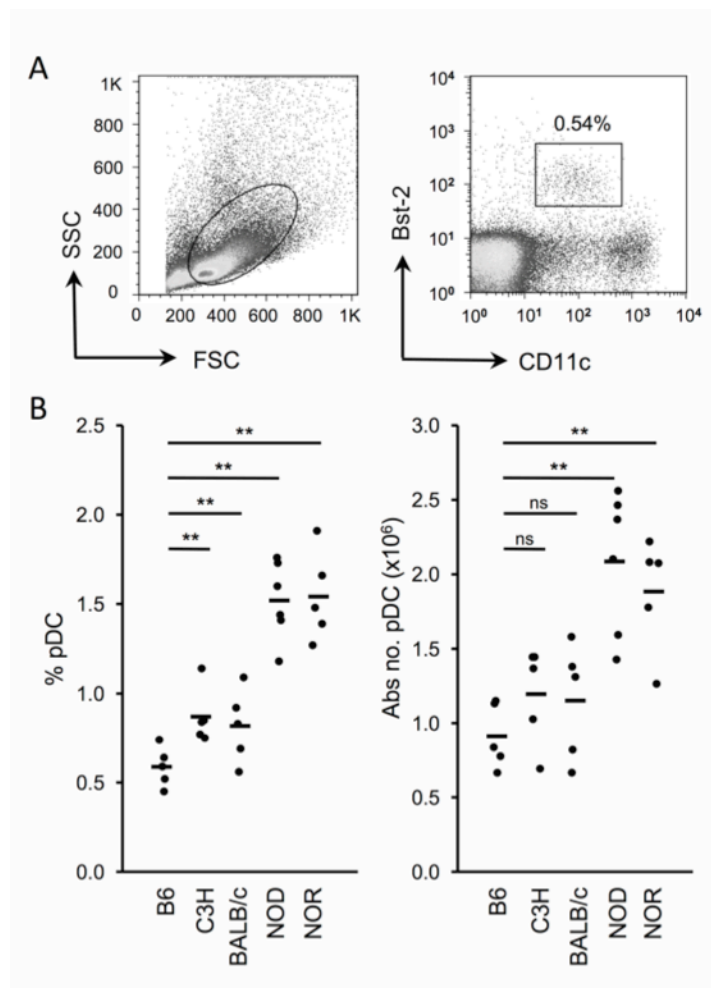


Figure 1. Inbred mouse strains exhibit variation for the proportion and absolute number of pDC. *A*, Representative flow cytometry profiles of CD11c and Bst-2 expression on total spleen cells from a B6 mouse. Application of the live gate (left). The percentage of live CD11c^{low} Bst-2⁺ cells is shown (right). *B*, pDC proportion (left) and absolute numbers (right) are indicated for various strains of mice. Each dot represents data for an individual mouse. *p* value, ** < 0.01. ns= non-significant. Data was acquired using a BD FACS Calibur flow cytometer.

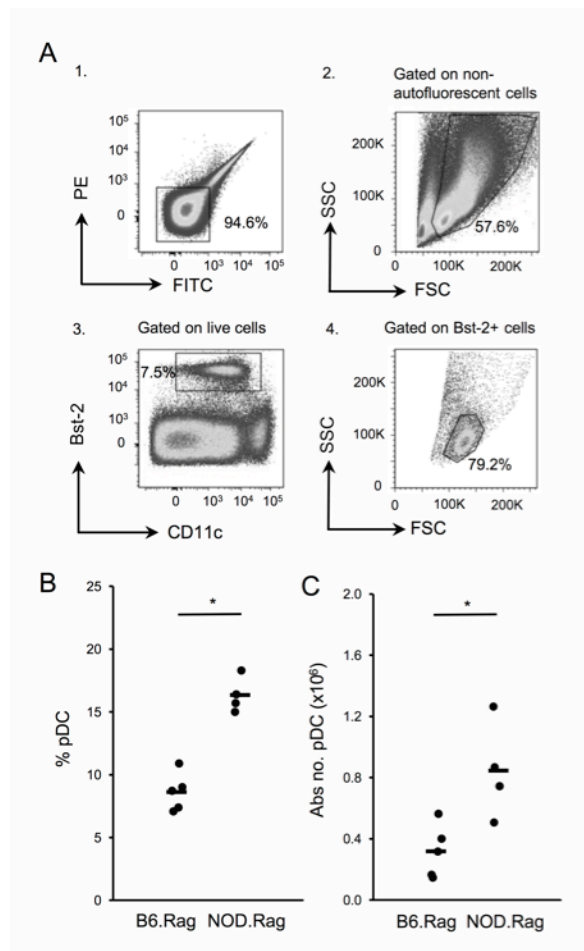


Figure 2. Increased sensitivity in the detection of pDC variation between B6.Rag and NOD.Rag mice. *A*, The stepwise logical gating strategy is shown for the detection of pDC in Rag-deficient mice. Representative plots of the analysis of a B6.Rag mouse are shown. 1- Two dump channels on the 488nm laser are used to remove autofluorescent cells, 2- Application of live gate (doublets are also removed, not shown), 3- pDC are subsequently selected based on the CD11c^{low}Bst-2⁺ phenotype, 4- A strict size exclusion gate is applied to the FSC/SSC profile, corresponding to the pDC subset. *B*, The proportion and *C*, the absolute number of pDC in the spleen of B6.Rag and NOD.Rag mice is shown. Each dot represents data for an individual mouse. *p* value, ** < 0.01. Data was acquired using a BD FACS Canto flow cytometer.

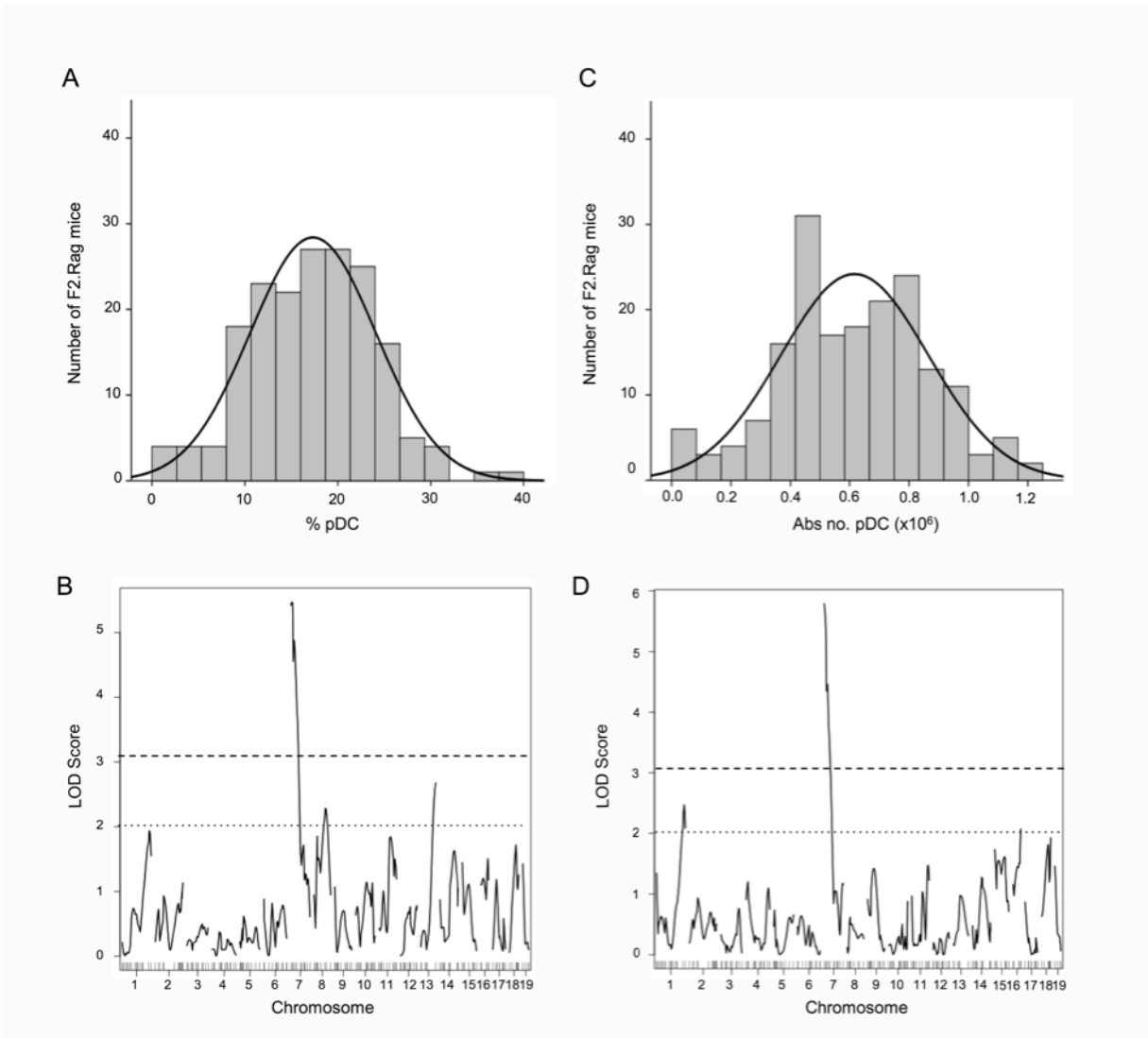


Figure 3. Linkage analysis of pDC proportion and absolute number. The distribution of the F2.Rag cohort relative to the proportion (A) and absolute number (C) of pDC are shown. Genome-wide LOD score plot (R/Qtl) for the proportion (B) and absolute number (D) of pDC in the F2.Rag cohorts are shown. The dashed and dotted lines respectively indicate the significance threshold of $p < 0.05$ and the suggestive threshold.

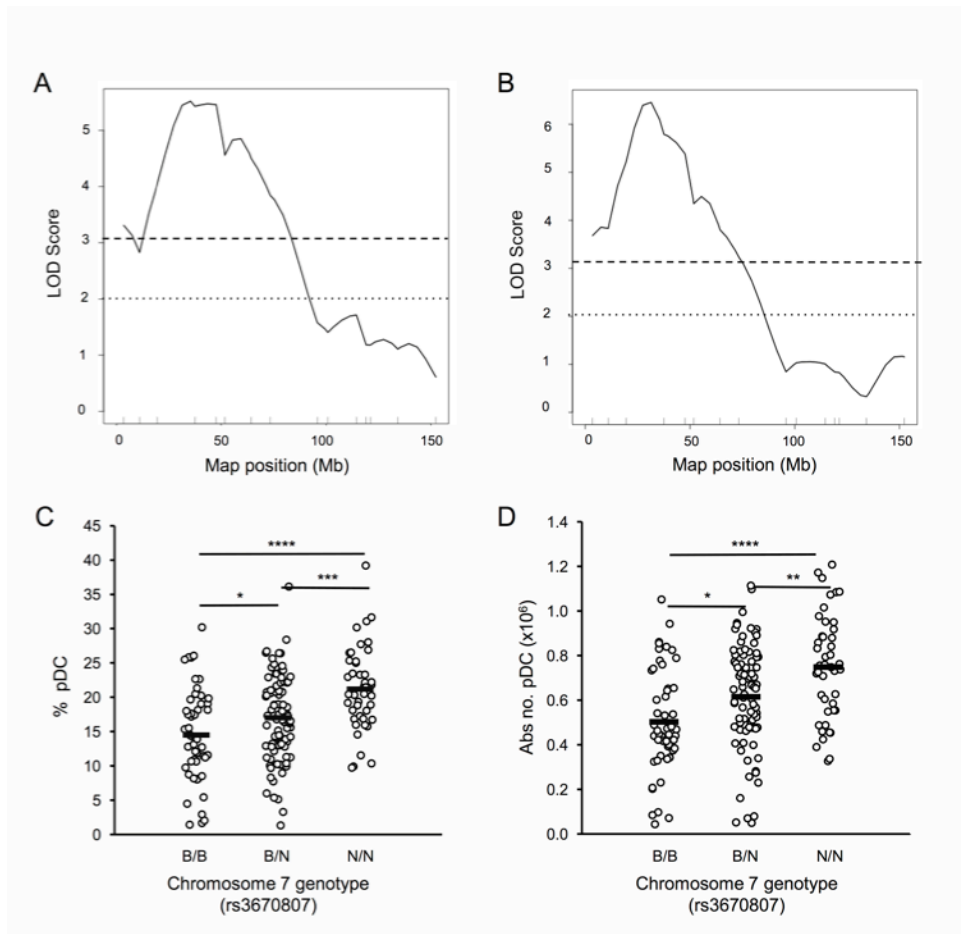


Figure 4. pDC proportion and absolute number are affected by *Pdcc1*, a dominant locus on chromosome 7. High resolution maps of the linkage of chromosome 7 to pDC proportion (A) and absolute number (B). The dashed and dotted lines respectively indicate the significance threshold of $p < 0.05$ and the suggestive threshold. C, Representation of pDC proportion (C) and absolute number (D) in F2.Rag mice segregated according to the genotype for the SNP rs3670807 on chromosome 7. B/B mice, homozygous for B6 alleles; B/N, heterozygous for B6 and NOD alleles; N/N, homozygous for NOD alleles. Each dot represents data for an individual mouse. *p* value, * < 0.05 ; ** < 0.01 , *** < 0.001 , **** < 0.0001 .

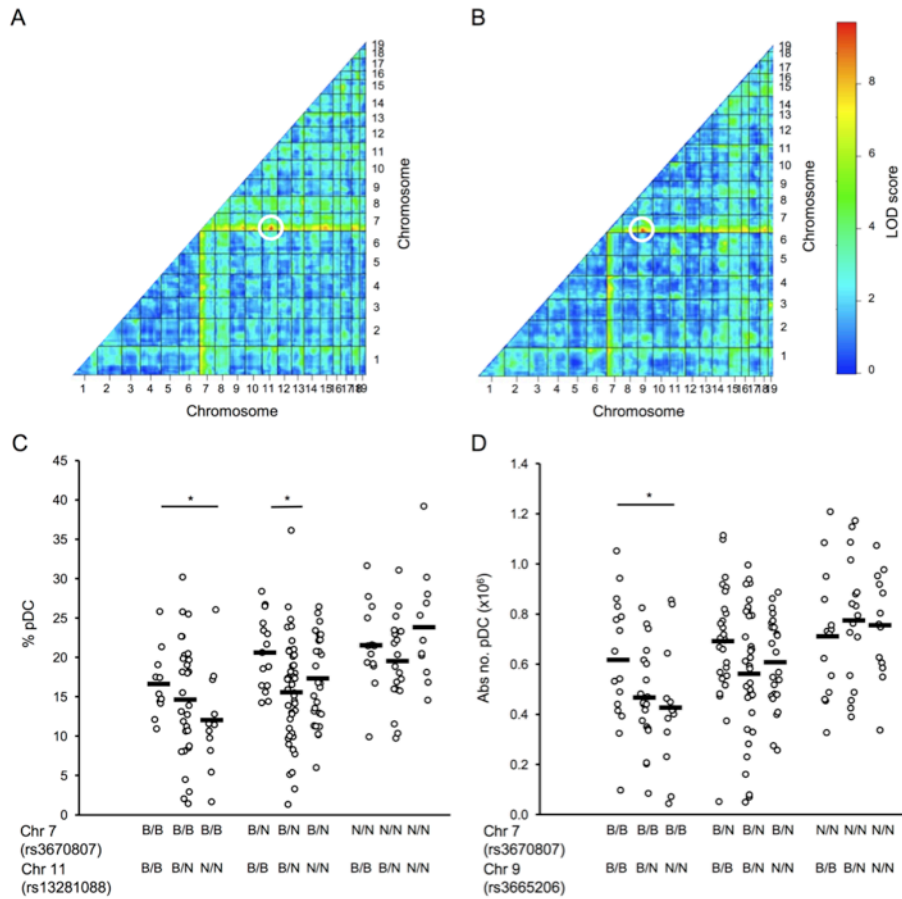


Figure 5. Genetic interactions between loci affect the size of the pDC compartment. *A*, Genome-wide two-dimensional LOD score analysis of F2.Rag mice for pDC proportion; LOD score = 9.53 for the interaction between chromosomes 7 and 11. *B*, Genome-wide two-dimensional LOD score analysis of F2.Rag mice for pDC absolute number; LOD score = 9.60 for the interaction between chromosomes 7 and 9. *C*, Representation of pDC proportion in F2.Rag mice segregated according to the combined chromosome 7 (rs3670807) and 11 (rs13481088) genotypes. *D*, Representation of pDC number in F2.Rag mice segregated according to the combined chromosome 7 (rs3670807) and 9 (rs3665206) genotypes. B/B mice, homozygous for B6 alleles; B/N, heterozygous for B6 and NOD alleles; N/N, homozygous for NOD alleles. *p value*, * < 0.05.

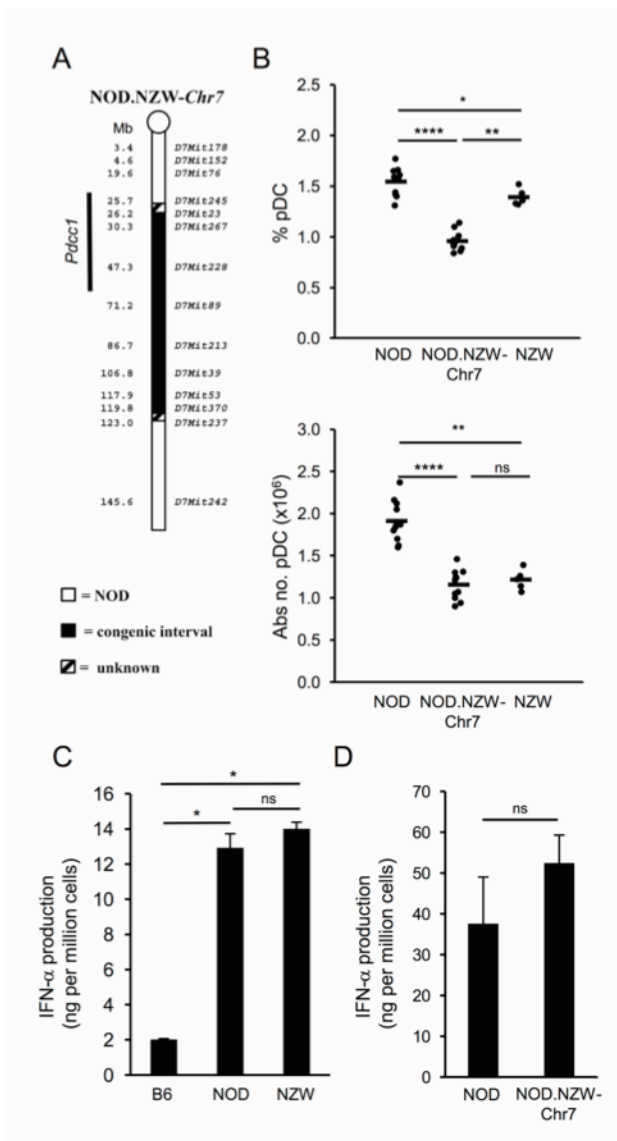


Figure 6. Validation of the contribution of chromosome 7 in defining the size of the pDC compartment. *A*, Schematic diagram of chromosome 7 for the NOD.NZW-*Chr7* mouse strain. Marker placement is shown in Mb according to the NCBI m37 build. *Pdcd1* is depicted

according to the Bayes interval. *B*, pDC proportion (top) and absolute number (bottom) in the spleen of NOD, NOD.NZW-*Chr7*, and NZW mice. *C*, *D*. Pooled spleens from either B6, NOD and NZW mice (*C*) or NOD and NOD.NZW-*Chr7* mice (*D*) were sorted according to the CD11c^{low} Bst-2⁺ B220⁺ pDC phenotype. Sorted pDC were then stimulated *in vitro* with CpG ODN 2216. Mean cytokine IFN α concentration (\pm SD) from the culture supernatant is shown, for one experiment (error bars represent SD for technical replicates, representative of three (*C*) and two (*D*) independent experiments). *p* value, * < 0.05; ** < 0.01, **** < 0.0001.

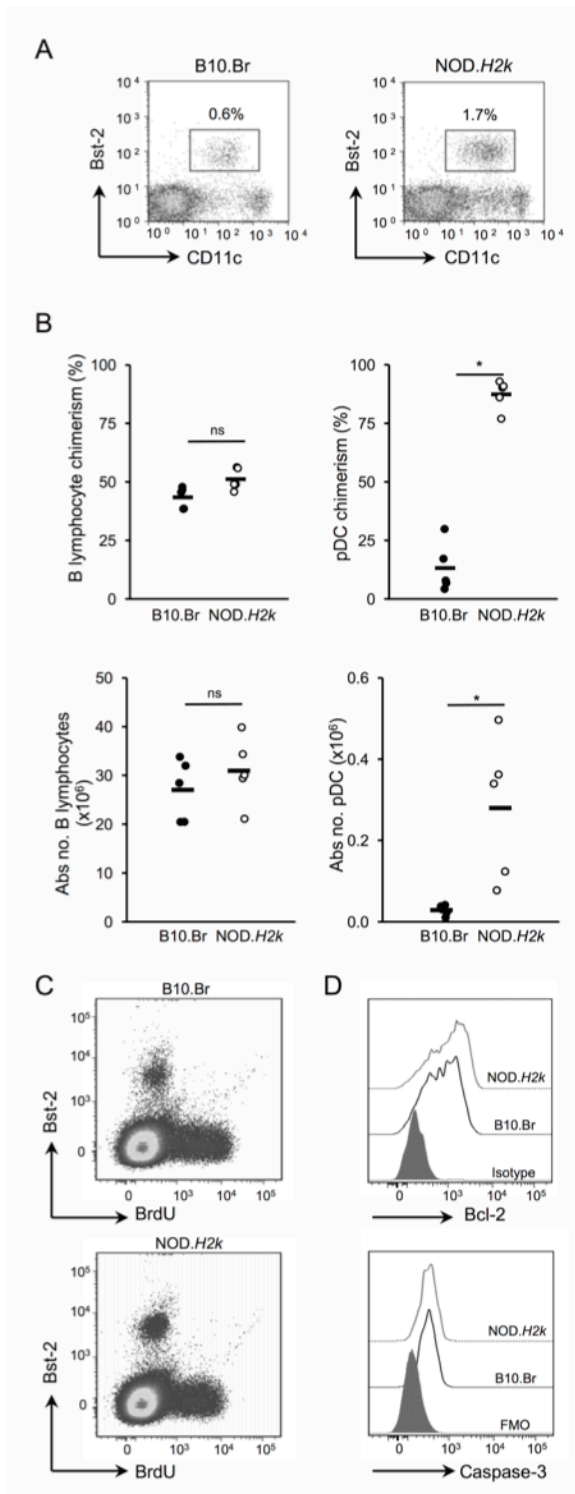
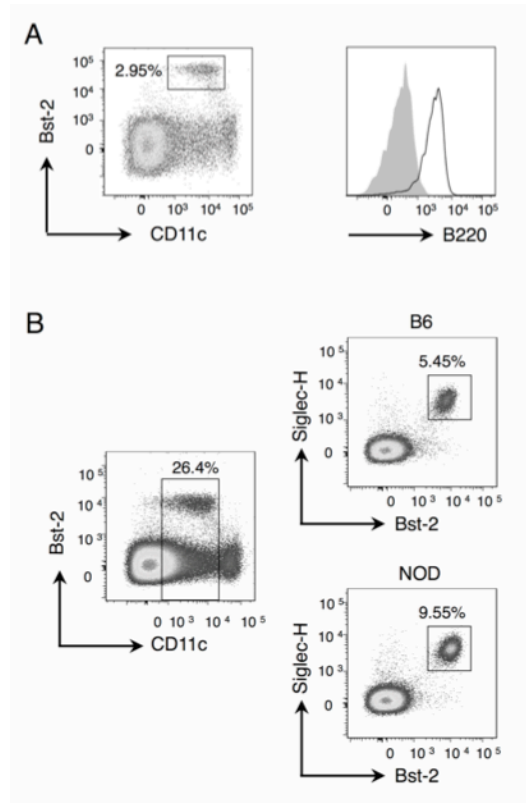


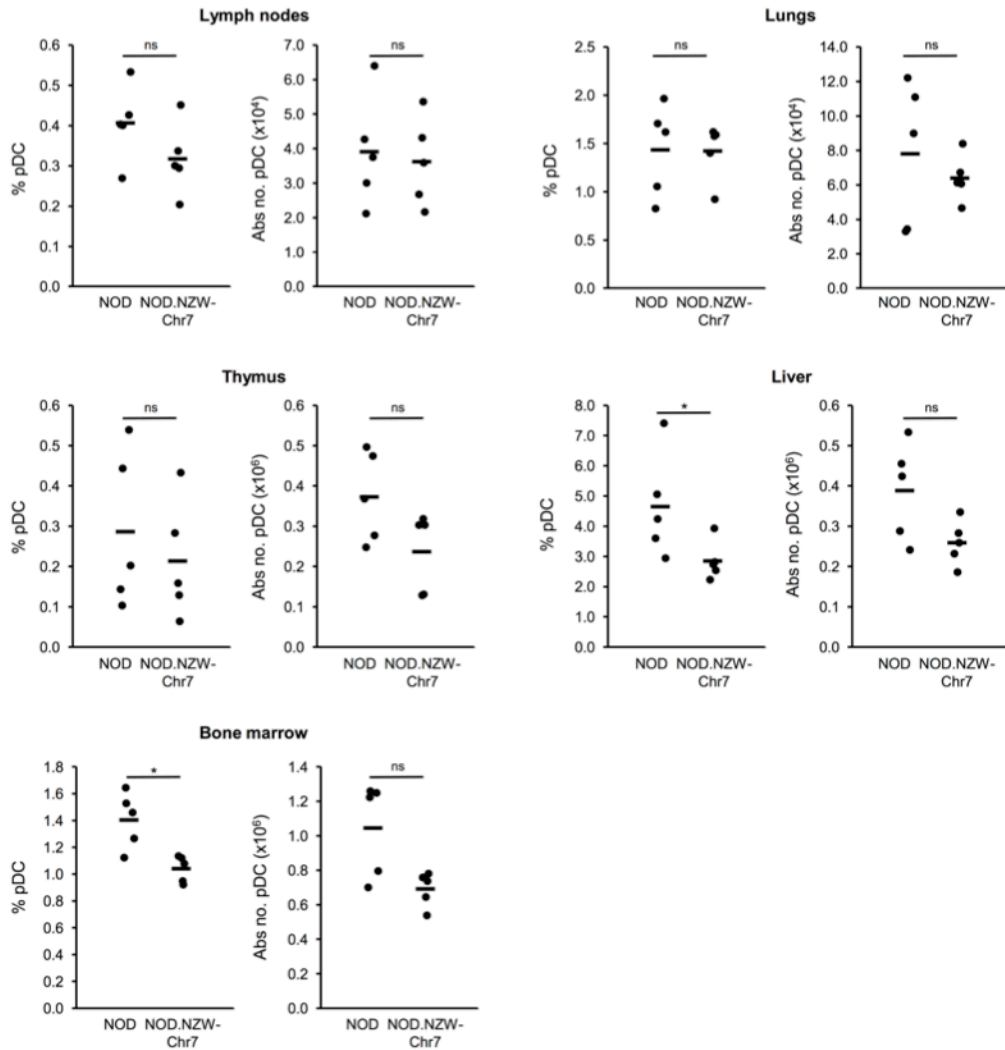
Figure 7. Analysis of cellular processes which may influence the size of the pDC compartment.

A. Representative plots demonstrating pDC proportion in the spleen of B10.Br and NOD.H2k mice. Percentages are shown. $n=4$. **B.** B10.Br and NOD.H2k bone marrow were mixed in a 1:1 ratio in F1 (B10.Br \times NOD.H2k) lethally irradiated recipient mice and left to reconstitute for 8 weeks. The percentage (top) and absolute number (bottom) of B10.Br (CD45.2+) and NOD.H2k (CD45.1+) cells is shown for B cells (left) and pDC (right). Data for **A**, **B** were acquired on a BD FACS Calibur flow cytometer. *p value*, * < 0.05 . ns= non-significant. **C.** Representative plots showing the degree of BrdU incorporation in Bst-2⁺ pDC from both B10.Br (top) and NOD.H2k mice (bottom). **D.** The histograms present the expression levels of Bcl-2 (top) and active caspase-3 (bottom) in CD11c^{low} Bst-2⁺ cells. FMO, fluorescence minus one. Data for **C**, **D** were acquired on a FACS Canto I and are representative

of four independent experiments.



Supplementary figure 1. CD11c^{low} Bst-2⁺ spleen cells express B220 and Siglec H. *A. Left*, CD11c and Bst-2 expression in spleen cells from a B6 mouse. Dead cells, doublets and autofluorescent cells are excluded. *Right*, the expression of B220 is shown for CD11c^{low} Bst-2⁺ cells (solid line), relative to unstained control (grey histogram). *B. Left*, CD11c^{low} cells were electronically gated. *Right*, The co-expression of BST-2 and Siglec-H is shown in CD11c^{low} cells from B6 and NOD mice, as indicated.



Supplementary Figure 2. The reduced proportion and absolute number of pDC in the spleen of NOD.NZW-*Chr7* congenic mice relative to NOD mice is not due to preferential accumulation of pDC in other lymphoid tissues. pDC proportion (left) and absolute number (right) in the lymph nodes, thymus, bone marrow, lungs and liver of NOD and NOD.NZW-*Chr7* mice. *p* value, * < 0.05; ns = non significant. Each dot represents data from a single mouse.

CHAPITRE 3 : ARTICLE 2

3.1 THE *IDD13* CONGENIC INTERVAL DEFINES THE NUMBER OF MEROCYTIC DENDRITIC CELLS, A NOVEL TRAIT ASSOCIATED WITH AUTOIMMUNE DIABETES SUSCEPTIBILITY

Adam-Nicolas Pelletier and Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans *Journal of Autoimmunity* **43**, 70-7 (2013).

J'évalue ma contribution à 90%. J'ai fait toutes les expériences. J'ai élaboré le design expérimental avec Sylvie Lesage. J'ai rédigé le manuscrit, avec l'aide de Sylvie Lesage.

The *Idd13* congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility

Adam-Nicolas Pelletier* and Sylvie Lesage*

* Department of Immunology-oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada and Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

Running title : Immunogenetics of merocytic dendritic cells

Keywords: Merocytic dendritic cells, Linkage analysis, Homeostasis, *Idd13*, Autoimmunity

3.2 ABSTRACT

When antigens derived from apoptotic cells are presented by conventional dendritic cells (cDC), T cell tolerance is induced. Surprisingly, the presentation of apoptotic cell antigens by an unconventional DC subset, termed merocytic dendritic cells (mcDC), can reverse T cell anergy. The potency of mcDC at breaking T cell tolerance has been demonstrated in the context of tumors and autoimmunity, suggesting that modulating the number of mcDC in vivo may be of clinical interest. To identify the genetic determinants that define the number of mcDC, we performed a linkage analysis between NOD and C57BL/6 mouse strains, where autoimmune-prone NOD mice show an increased proportion of mcDC relative to the non-autoimmune-prone C57BL/6 mice. We identified a locus on chromosome 2 significantly linked to both the proportion and the absolute number of mcDC in the spleen. Interestingly, the dominant interval on chromosome 2 overlaps with a locus previously associated with diabetes protection, namely *Idd13*. Using NOD.*Idd13* congenic mice, we validate the impact of the *Idd13* congenic interval in defining the proportion and number of mcDC in the spleen. These results show that the decreased number of mcDC is conferred by C57BL/6 alleles at the *Idd13* locus, which is linked to diabetes resistance.

3.3 INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells that actively participate in immune surveillance [1]. In non-inflammatory conditions, however, DC contribute to the maintenance of immune tolerance. Indeed, upon uptake of apoptotic self-cellular debris, the conventional DC (cDC) subsets present self-antigens to T cells inducing either T cell anergy or regulatory T cell differentiation [2]. This mechanism of peripheral tolerance is believed to perpetually eliminate T cell autoreactivity, in order to limit autoimmune reactions when inflammation arises [3].

The identification of a novel DC subset challenges the concept that all DC contribute to immune tolerance in non-inflammatory conditions. Indeed, recent work unveiled a DC population with the unexpected ability not only to prime both CD4 and CD8 T cell responses upon uptake of antigens from apoptotic cells, but also to break T cell tolerance [4-7]. This subset was termed merocytic DC (mcDC) for its unusual ability to store apoptotic antigens in cytoplasmic vesicles (μεροσ, meros = particle) [4]. Moreover, upon exposure to apoptotic cells, mcDC effectively secrete IFN- α [5, 8]. Together, the unique properties of mcDC have conferred them the ability to effectively promote tumor clearance when exposed to apoptotic tumor cells [5, 7, 8].

The role of mcDC has also been studied in the context of autoimmune diabetes. In fact, normal tissue remodeling of the pancreas leads to apoptosis of insulin-producing pancreatic β cells at weaning and this event precedes lymphocytic infiltration in the autoimmune-prone NOD mice [9, 10]. Interestingly, mcDC are found in higher numbers in the NOD mouse strain relative to

autoimmune-diabetes resistant strains, including both BALB/c and C57BL/6 (hereafter referred to as B6) [4]. In addition, mcDC isolated from the pancreatic lymph nodes of diabetic NOD mice break T cell tolerance to pancreatic β cell antigens and rapidly induce diabetes upon in vivo transfer in non-diabetic recipients [4]. These findings suggest that the increased number of mcDC in NOD mice leads to an increased presentation of apoptotic β cell antigens to T cells in NOD mice, thus promoting autoimmune diabetes progression. Therefore, the ability to modulate the number of mcDC in vivo by targeting specific molecular determinants responsible for the regulation of their homeostasis might prevent the development of autoimmune diabetes.

To identify genetic factors contributing to the regulation of mcDC number in vivo, we first validated that the increased proportion of mcDC in NOD mice relative to B6 mice was not due to the autoimmune disease process by evaluating the proportion and number of mcDC in Rag1-deficient B6 and NOD mice, which do not develop autoimmune diabetes. We next performed a linkage analysis on a (NOD \times B6) F₂ cohort deficient for *Rag1* and observed that both mcDC proportion and number linked to a dominant locus at the distal end of mouse chromosome 2, corresponding to the *Idd13* locus. Using Rag-sufficient NOD.*Idd13* congenic mice, we validated the contribution of the *Idd13* interval in defining both the proportion and number of mcDC in NOD mice. Our findings thus link the *Idd13* locus to a novel immunological phenotype, which may contribute to autoimmune susceptibility.

3.4 MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6 (hereafter denoted B6), NOD, B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory. The NOD.NOR-*Idd13* mice (denoted as NOD.*Idd13* throughout), for which the *Idd13* locus is of B6 origin [11], were generously provided by David Serreze (Jackson Laboratory). All of these strains were subsequently maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). F1.Rag (B6 Rag1^{-/-} × NOD Rag1^{-/-}) and F2.Rag (F1.Rag × F1.Rag) mice were bred in house from the parental strains. Six to 8 week-old mice were used for all phenotypic analyses. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved the experimental procedures.

Flow cytometry

Spleens were treated with collagenase (1mg/mL in PBS, Type V from *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37°C and passed through a 70µM cell strainer (BD Biosciences) to yield single-cell suspensions prior to staining with antibodies. CD11c PE-Cy7, CD8α PE, CD11b APC-Cy7 and CD11b Pacific Blue antibodies were purchased from Biolegend, while mouse pDC Ag-1 allophycocyanin, staining the Bst-2 antigen, was purchased from Miltenyi Biotec. All samples were acquired using FACSCanto I (BD Biosciences) or BD LSRII (BD Biosciences) and were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR). The gating strategy to select mDC is based on previous publications [4, 5] and the threshold for selecting CD11b^{-low} cells is based on fluorescence minus one (FMO) staining. Note that we implemented a precise gating strategy to allow for the accurate

identification of mcDC proportion in Rag1-deficient mice. Briefly, to remove autofluorescent cells [12], a dump channel is used on the 488nm laser, namely FL3. After excluding doublets, CD11c^{high} cells are selected. This is followed by the application of a strict size exclusion gate to the FSC/SSC profile, corresponding to live CD11c^{high} cells. Within this gate, mcDCs are selected based on the CD8 α ⁻ CD11b^{low/-} phenotype.

Linkage Analysis

Genomic DNA was isolated from the tails of F2.Rag male and female mice by using the DNeasy blood and tissue kit from Qiagen. 202 single nucleotide polymorphisms were then detected from the F2.Rag mice DNA using the Illumina mouse low density linkage panel serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, Ontario, Canada. Marker location (in Mb) was determined using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Build m37. The logarithm of odds (LOD) scores were obtained through a single- or two-dimensional quantitative trait locus model using the R/qtl package [13] for the R software (version 2.11.1). To increase SNP resolution, the Haley-Knott algorithm was applied [14]. LOD scores higher than 3.1 were significant for single-dimensional analysis according to permutation tests (n=10 000, $p=0.05$), and LOD scores between 2 and 3.1 were considered suggestive. Significant LOD scores above a threshold of 9.61 for a two-dimensional analysis were obtained using permutation testing (n=1000, $p=0.05$). A Pearson's χ^2 for allele frequencies confirmed that all the significant and suggestive loci did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium (supplementary Table 1 and data not shown).

Statistical analysis

Data for the various experiments were tested for significance using a non-parametric Mann-Whitney test with a minimal threshold of 0.05. Estimation of the interval coordinates was obtained using a 95% Bayes interval test. Significance for the genotype distribution differences was tested with an ANOVA. All statistical analyses and the F_2 distribution were obtained using the SPSS 19.0 software.

3.5 RESULTS

mcDC express high levels of CD11c and differ phenotypically from the cDC subsets by the lack of expression of CD8 α combined with a low to negative expression of CD11b [4, 5, 7]. First, to clearly delimit the low to negative expression of CD11b on CD11c^{high} cells, we established the baseline expression level of CD11b by FMO staining, where spleen cells from B6 mice were stained for CD11c and CD8 α expression with or without an antibody to CD11b. By gating on CD11c^{high} cells, we observe that the mean fluorescence intensity (MFI) for the low expression level of CD11b is higher than the MFI for the FMO (Figure 1), in agreement with the previously described CD11b^{low/-} phenotype of mcDC [4, 5, 7]. Hence, to quantify mcDC in the spleen, CD11c^{high} cells were electronically gated and subsequently selected for the expression of a CD8 α ⁻ CD11b^{-/low} phenotype (Figure 2a). Importantly, this gating strategy efficiently excludes plasmacytoid DC, known to be present in higher numbers in NOD mice when compared to B6 mice [15, 16] (supplementary figure 1). The proportion of mcDC is thus defined as the percentage of cells carrying the CD11c^{high} CD8 α ⁻ CD11b^{-/low} phenotype. As previously reported [4], we find that NOD mice carry a higher proportion and absolute number of mcDC relative to B6 mice (Figure 2b).

The increased number of mcDC in NOD mice relative to B6 mice could be attributed to the ongoing autoimmune process in the NOD strain. Thus, prior to undertaking a linkage analysis, we determined the proportion and number of mcDC in Rag1-deficient mice for both the B6 and NOD genetic background. Indeed, as Rag-deficiency leads to a complete lack of both T and B cells, NOD.Rag1^{-/-} mice do not develop autoimmunity [17]. In these Rag-deficient mice, the gating strategy was adapted to account for the increased proportion of

autofluorescent cells (Figure 3a and section 2.2) [15, 18]. As plasmacytoid DC are increased in NOD.Rag1^{-/-} relative to B6.Rag1^{-/-} mice [15], we carefully excluded plasmacytoid DC by gating on CD11c^{high} cells (supplementary figure 1). Similar to Rag-sufficient mice, we find that NOD.Rag1^{-/-} mice exhibit a higher proportion and absolute number of mcDC in the spleen relative to B6.Rag1^{-/-} mice (Figure 3b). Together, these findings demonstrate that higher numbers of mcDC in the NOD strain is not due to an ongoing autoimmune response and thus likely results from genetic differences between the two strains.

Interestingly, as we have previously reported for plasmacytoid DC [15], we find that the difference in proportion of mcDC between mice of the B6 and NOD genetic backgrounds is greater upon Rag-deficiency (compare data in Figures 2b and 3b). Indeed, the mean proportion of mcDC in Rag-sufficient B6 and NOD mice is 0.22% and 0.42% respectively, representing a difference of 0.20% (Figure 2b), while the difference in mcDC proportion in Rag1-deficient B6 and NOD mice is 0.75% (Figure 3b). Moreover, due to the absence of lymphocytes in Rag1-deficient mice, the proportion of mcDC is increased improving the sensitivity for their detection. Notably, the proportion of mcDC in both B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice is at least three times higher than that observed in the Rag-sufficient counterpart strain (Table 1). Together, these data present that the Rag-deficiency increases the sensitivity for detecting mcDC, as well as increases the difference in mcDC proportion between B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice. We thus argued that a linkage analysis aimed at identifying genetic loci determining the proportion and absolute number of mcDC would be more sensitive on a Rag-deficient background. Consequently, we generated a cohort of 181 (NOD.Rag x B6.Rag) F₂ mice (hereafter referred to as F2.Rag).

Both the proportion and the absolute number are key elements defining the homeostasis of cell populations. Thus, we quantified both of these parameters in the F2.Rag progeny. The proportion of mcDC in the spleen of the F2.Rag mice varied from 0.25% to 2.8% and followed a Gaussian distribution (Figure 4a, left). Similarly, the distribution of the absolute number of mcDC in the spleen of F2.Rag mice also represented a Gaussian distribution (Figure 4a, right). To perform linkage analyses of these traits, we subjected the DNA of each F2.Rag mouse to the Illumina Golden Gate low-density platform and performed a genome-wide SNP genotyping. We observed a significant linkage on chromosome 2 for both the proportion and absolute number of mcDC (Figure 4b), with respective LOD scores of 4.82 and 3.79, both of which are above the significant threshold of 3.1 established by permutation testing. Additional suggestive linkage were detected for several genetic intervals, namely on chromosomes 6, 9, 10 and 11 for the proportion and on chromosomes 3 and 7 for the absolute number of mcDC. Together, these data show that a dominant locus on chromosome 2 is significantly linked to both the proportion and the absolute number of mcDC, while additional suggestive linkage are distinctly linked to either trait. Joint LOD score analyses were subsequently performed to reveal genetic interactions that may further define the loci affecting the proportion of mcDC [19]. Interestingly, of the suggestive linkage identified on chromosomes 6, 9, 10 and 11 for the proportion of mDC (Figure 4b, left), the genetic interval on both chromosomes 6 and 11 interacted with the interval on chromosome 2 in defining the proportion of mcDC (Figure 4c, left). Moreover, one additional modifier locus on chromosome 19 was revealed in the joint LOD score analysis (Figure 4c, left). On the other hand, no significant genetic interactions were identified in the joint LOD score analysis of the

absolute number of mcDC (Figure 4c, right). These results reinforced the finding that the locus on chromosome 2 is a key genetic determinant for defining the proportion and absolute number of mcDC.

To define the interval associated with the proportion and the absolute number of mcDC on mouse chromosome 2, we produced high resolution maps of chromosome 2 (Figure 5a). The 95% Bayes interval analysis, depicted in the grey shaded area, delimits the linkage on chromosome 2 to a region between 124Mb - 170 Mb and 88Mb – 170Mb for proportion and absolute number of mcDC, respectively (Figure 5a). Interestingly, the interval corresponds almost exactly with the previously defined *Idd13* locus (119 Mb to 162 Mb) associated with autoimmune diabetes susceptibility [11, 20, 21] (Figure 5a). We next segregated F2.Rag mice on the basis of their genotype at SNP rs13476832, which presents with the highest LOD score within the genetic interval, to investigate the impact of the genotype contribution to the proportion and absolute number of mcDC (Figure 5b). As expected, F2.Rag mice homozygous for the B6 allele at the SNP rs13476832 presented with a lower proportion and absolute number of mcDC relative to those homozygous for the NOD allele. Interestingly, mice bearing a heterozygous B6/NOD genotype at the SNP rs13476832 exhibited a similar proportion and absolute number of mcDC relative to those carrying a homozygous B6 genotype (Figure 5b). This result suggests that the B6 genotype within the *Idd13* locus exhibits a dominant effect in defining the proportion and absolute number of mcDC.

To validate the in vivo impact of the *Idd13* locus on the proportion and number of mcDC in the spleen, we took advantage of the congenic NOD.*Idd13* strain, where the *Idd13* locus is of

B6 origin [11]. We were able to readily identify $CD11c^{high} CD8\alpha^{-} CD11b^{-/low}$ mcDC in NOD.*Idd13* mice (Figure 6a). In addition, we found that both the proportion and the absolute number of mcDC were reduced in NOD.*Idd13* mice when compared to NOD mice (Figure 6b). Indeed, the proportion and absolute number of mcDC in NOD.*Idd13* mice were comparable to those observed in B6 mice (Table 1). To confirm that the restoration of mcDC number in NOD.*Idd13* mice was not due to a variation in the plasmacytoid DC compartment, despite a gating strategy that effectively excludes plasmacytoid DC contamination (supplementary figure 1), we quantified the proportion of plasmacytoid DC in both NOD and NOD.*Idd13* mice according to the $CD11c^{low} BST2^{+}$ phenotype [15, 22]. We observed no differences between the two strains (supplementary figure 2), further supporting that the decrease in $CD11c^{high} CD8\alpha^{-} CD11b^{-/low}$ proportion in NOD.*Idd13* mice is specific to mcDC. These data confirm that genetic elements within the *Idd13* locus play a key role in defining the proportion and absolute number of mcDC in the spleen.

3.6 DISCUSSION

The recently discovered mcDC subset can induce both CD4 and CD8 T cell responses as well as reverse T cell anergy through the effective presentation of apoptotic cell-derived antigens [4-6]. The highlighted relevance of mcDC in promoting autoimmunity and anti-tumoral responses suggests that modulating mcDC number in vivo could be of therapeutic interest [8, 23, 24]. To identify the genetic factors defining the number of mcDC, we took advantage of inbred strains exhibiting variations in mcDC number, where B6 mice exhibited a lower number of mcDC relative to NOD mice [4]. Using an unbiased linkage analysis, we demonstrate that the congenic interval that defines the *Idd13* locus, located at the distal end of chromosome 2, influences the proportion and number of mcDC in the spleen. We further validated that genetic elements encoded within the *Idd13* locus define the number of mcDC by determining that both the proportion and absolute number of mcDC in the spleen of NOD.*Idd13* congenic mice were comparable to that observed in B6 mice.

For the linkage analysis strategy, we exploited the Rag-deficiency. As we had previously observed for plasmacytoid DC [15], Rag-deficiency facilitates the linkage analysis by increasing the sensitivity for detecting cell types present in low number in lymphoid organs. In addition, the Rag-deficiency allows for the elimination of a potential bias caused by the inflammation associated with the underlying autoimmune diabetes pathology in NOD mice. Indeed, the well documented susceptibility of NOD mice to spontaneously develop autoimmune diabetes relies heavily on the presence of T cells and B cells [25, 26], which are absent in NOD.Rag mice [17, 27]. Notably, prior to undertaking the linkage analysis, we verified that variations in the number of mcDC between B6 and NOD were independent of T

cells, B cells and autoimmune diabetes. Finally, we demonstrate that the linkage of mcDC to the *Idd13* locus significantly defines the proportion and number of mcDC in the spleen of Rag-sufficient mice, as NOD.*Idd13* mice clearly harbor a reduction in both mcDC proportion and absolute number relative to NOD mice. Together with our previous study [15], these findings confirm that linkage analyses of rare cell types in Rag-deficient mice can identify genetic loci which contribute to cellular homeostasis in Rag-sufficient mice.

Although we identified a single dominant locus defining the number and proportion of mcDC, our results strongly suggest that these traits are multigenic. In fact, the distribution of F2.Rag mice according to either the proportion or the absolute number of mcDC both follow a Gaussian distribution pattern, indicating that more than one locus defines these traits. In addition, we identified multiple suggestive loci. Notably, for the proportion of mcDC, suggestive linkage was observed on chromosomes 6, 9, 10 or 11 and an additional modifier locus was detected on chromosome 19. Suggestive linkage on chromosomes 3 and 7 were also noted for the absolute number of mcDC. The contribution of these respective loci in defining the proportion and absolute number of mcDC will necessitate further validation.

Our data clearly support a dominant effect of the B6 alleles at the *Idd13* locus in defining both the proportion and absolute number of mcDC in the spleen. Interestingly, the impact of the *Idd13* locus on autoimmune diabetes was first uncovered in NOR mice where it was shown to be a major determinant of diabetes resistance [11]. The progression of pathogenic insulinitis is impeded in NOR mice, wherein the initial cellular infiltration is composed mostly of antigen-presenting cells with a very low number of T cells [20, 28]. In light of our data, it is tempting

to speculate that a greater proportion of mcDC are found in the initial islet infiltrates of NOD mice relative to NOD.*Idd13* congenic mice, thereby accelerating insulinitis progression. In agreement with this postulate, a relatively high number of CD11c⁺CD11b⁻ cells that were also CD8α⁻, thus likely representing mcDC, were found draining early islet infiltrates in NOD mice [29]. Additional studies are needed to define the exact contribution of mcDC in autoimmune disease progression.

A key candidate gene within the *Idd13* locus conferring resistance to autoimmune diabetes is β2-microglobulin. Indeed, through bone marrow chimera experiments it was shown that a non-hematopoietic factor contributed to diabetes resistance within the *Idd13* locus [30], where the direct effect of the β2-microglobulin allele was validated through a transgenic complementation approach [31]. Nonetheless, as exemplified by congenic sublimes, β2-microglobulin is not the only gene within the *Idd13* interval contributing to diabetes resistance [30], and it is unclear how genetic polymorphisms in β2-microglobulin could contribute to the number of mcDC. Other candidate genes within the *Idd13* locus include *Bim*, *Sirpa* and *CD93*.

The expression of the proapoptotic factor Bim is dysregulated in NOD thymocytes, a phenotype associated with an increase in the proportion of autoreactive T cells [32-34]. A similar dysregulation in Bim expression in mcDC could account for their accumulation in NOD mice. Alternatively, as mcDC break T cell tolerance by presenting apoptotic cell antigens to T cells [4, 5, 23, 24], defects in pancreatic islet cellular apoptosis as a consequence of Bim dysregulation could promote autoimmunity by acting in concert with the increase in mcDC number.

Sirpa which encodes for CD172a, the cellular ligand of CD47, is highly polymorphic among mouse strains, where the NOD allele confers specific differences in biological responses relative to other strains [35, 36]. Importantly, the CD47 pathway is associated with autoimmune diabetes progression in mice [37] and the *SIRP* locus is linked with autoimmune diabetes susceptibility in humans [38]. Moreover, CD47-CD172a interactions contribute to DC migration [39, 40]. Therefore, genetic polymorphisms in the CD47 pathway may lead to an accumulation of mcDC in the spleen. Although we have observed similar levels of SIRP α expression on mcDC in B6, NOD and NOD.*Idd13* mice (data not shown), a defect in SIRP α function attributed to the genetic polymorphism could also alter mcDC migration pattern leading to their preferential accumulation in the spleen.

In addition to the progression of insulinitis and number of mcDC, the *Idd13* locus is linked to the proportion of iNKT cells [41-43]. Manipulating iNKT cell number or activity in NOD mice protects from diabetes progression [41]. *Cd93* has been highlighted as a polymorphic candidate gene encoded within the *Idd13* locus that contributes towards defining iNKT cell number [44]. More generally, CD93 has been described as a phenotypic marker defining hematopoietic development of B cells and other antigen-presenting cells [45], and thus one could envisage a direct role for CD93 in defining the proportion and absolute number of mcDC.

Thus far, the *Idd13* locus has been linked with four distinct immunological traits, namely mcDC number, iNKT cell number, thymic negative selection and insulinitis progression. It remains to be seen how these four traits cooperate in enhancing autoimmune diabetes

susceptibility in NOD mice and whether a single or many genetic polymorphisms encoded within the *Idd13* locus contribute to these phenotypes. Arguably, the generation of congenic lines revealed at least two genetic polymorphisms that define autoimmune diabetes susceptibility within the *Idd13* locus [30, 42].

Notwithstanding the contribution of the other phenotypes, the role of mcDC in autoimmune diabetes susceptibility is striking. Indeed, mcDC break T cell tolerance by the presentation of apoptotic cellular antigens and promote autoimmune diabetes progression. Moreover, variations in the proportion and absolute number of mcDC correlate with diabetes susceptibility in NOD mice [4, 5, 23]. Notably, a reduced number of mcDC in NOD.*Idd13* mice relative to NOD mice correlates with a much reduced diabetes incidence in the NOD.*Idd13* strain. Future studies aimed at selectively reducing mcDC number in NOD mice or increasing mcDC number in NOD.*Idd13* mice by identifying the causal genetic variant associated with this trait will help define the exact contribution of mcDC to this pathology. Importantly, mcDC also effectively promote anti-tumoral responses [5, 7, 8, 24]. As such, the identification of the genetic factors associated with the regulation of mcDC number will allow the manipulation of this cell subset in the context of both autoimmunity and cancer.

3.7 ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Marie-Josée Guyon, Fany De Wilde and the animal house staff for curating the mouse colonies, the center of Applied Genomics at Sick Kids Hospital in Toronto for SNP genotyping and Tom Brodnicki for a critical review of the manuscript. This project was supported by *Diabète Québec*, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canadian Foundation for Innovation. A.N.P. holds an excellence scholarship from the University of Montreal and S.L. holds a CIHR New Investigator award.

3.8 REFERENCES

References

- [1] Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*, 2007;7:19-30.
- [2] Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun*, 2007;29:303-9.
- [3] Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*, 2000;191:411-6.
- [4] Katz JD, Ondr JK, Opoka RJ, Garcia Z, Janssen EM. Cutting edge: Merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes. *J Immunol*, 2010;185:1999-2003.
- [5] Reboulet RA, Hennies CM, Garcia Z, Nierkens S, Janssen EM. Prolonged antigen storage endows merocytic dendritic cells with enhanced capacity to prime anti-tumor responses in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 2010;185:3337-47.
- [6] Janssen E, Tabeta K, Barnes MJ, Rutschmann S, McBride S, Bahjat KS *et al*. Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. *Immunity*, 2006;24:787-99.
- [7] Hennies CM, Reboulet RA, Garcia Z, Nierkens S, Wolkers MC, Janssen EM. Selective expansion of merocytic dendritic cells and CD8DCs confers anti-tumour effect of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand treatment in vivo. *Clinical and experimental immunology*, 2011;163:381-91.
- [8] Nierkens S, den Brok MH, Garcia Z, Togher S, Wagenaars J, Wassink M *et al*. Immune adjuvant efficacy of CpG oligonucleotide in cancer treatment is founded specifically upon TLR9 function in plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Res*, 2011;71:6428-37.
- [9] Bouwens L, Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiological reviews*, 2005;85:1255-70.
- [10] Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes*, 2000;49:1-7.
- [11] Serreze DV, Prochazka M, Reifsnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH. Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med*, 1994;180:1553-8.
- [12] Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol*, 2000;164:2978-86.
- [13] Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 2003;19:889-90.
- [14] Haley CS, Knott SA. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 1992;69:315-24.
- [15] Pelletier AN, Guimont-Desrochers F, Ashton MP, Brodnicki TC, Lesage S. The size of the plasmacytoid dendritic cell compartment is a multigenic trait dominated by a locus on mouse chromosome 7. *J Immunol*, 2012;188:5561-70.

- [16] Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin J-J, Brière F, Trinchieri G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2003;171:6466-77.
- [17] Shultz LD, Lang PA, Christianson SW, Gott B, Lyons B, Umeda S *et al.* NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. *J Immunol*, 2000;164:2496-507.
- [18] Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 2000;164:2978-86.
- [19] Carlborg O, Haley CS. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nat Rev Genet*, 2004;5:618-25.
- [20] Fox CJ, Paterson AD, Mortin-Toth SM, Danska JS. Two genetic loci regulate T cell-dependent islet inflammation and drive autoimmune diabetes pathogenesis. *Am J Hum Genet*, 2000;67:67-81.
- [21] Ivakine EA, Fox CJ, Paterson AD, Mortin-Toth SM, Canty A, Walton DS *et al.* Sex-specific effect of insulin-dependent diabetes 4 on regulation of diabetes pathogenesis in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol*, 2005;174:7129-40.
- [22] Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol*, 2011;29:163-83.
- [23] Katz JD, Janssen EM. Breaking T cell tolerance to beta cell antigens by merocytic dendritic cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2011;68:2873-83.
- [24] Thacker RI, Janssen EM. Cross-presentation of cell-associated antigens by mouse splenic dendritic cell populations. *Frontiers in immunology*, 2012;3:41.
- [25] Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*, 1993;42:44-55.
- [26] Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992;89:3290-4.
- [27] Chiu PP, Ivakine E, Mortin-Toth S, Danska JS. Susceptibility to lymphoid neoplasia in immunodeficient strains of nonobese diabetic mice. *Cancer Res*, 2002;62:5828-34.
- [28] Fox CJ, Danska JS. Independent genetic regulation of T-cell and antigen-presenting cell participation in autoimmune islet inflammation. *Diabetes*, 1998;47:331-8.
- [29] Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med*, 2003;198:1527-37.
- [30] Serreze DV, Bridgett M, Chapman HD, Chen E, Richard SD, Leiter EH. Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin. *J Immunol*, 1998;160:1472-8.
- [31] Hamilton-Williams EE, Serreze DV, Charlton B, Johnson EA, Marron MP, Mullbacher A *et al.* Transgenic rescue implicates beta2-microglobulin as a diabetes susceptibility gene in nonobese diabetic (NOD) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001;98:11533-8.

- [32] Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity*, 2005;22:385-96.
- [33] Liston A, Lesage S, Gray DHD, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM *et al.* Generalized Resistance to Thymic Deletion in the NOD MouseA Polygenic Trait Characterized by Defective Induction of Bim. *Immunity*, 2004;21:817-30.
- [34] Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H *et al.* BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*, 2002;415:922-6.
- [35] Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, Mortin-Toth SM, Khalouei S, Gan OI *et al.* Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 2007;8:1313-23.
- [36] Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 2006;6:457-64.
- [37] Dugas V, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Hillhouse EE, Lesage S. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*, 2010;35:23-32.
- [38] Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*, 2009.
- [39] Van VQ, Lesage S, Bouguermouh S, Gautier P, Rubio M, Levesque M *et al.* Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *The EMBO journal*, 2006;25:5560-8.
- [40] Hagnerud S, Manna PP, Cella M, Stenberg A, Frazier WA, Colonna M *et al.* 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., 2006;176:5772-8.
- [41] Jordan MA, Baxter AG. The genetics of immunoregulatory T cells. *J Autoimmun*, 2008;31:237-44.
- [42] Chen YG, Driver JP, Silveira PA, Serreze DV. Subcongenic analysis of genetic basis for impaired development of invariant NKT cells in NOD mice. *Immunogenetics*, 2007;59:705-12.
- [43] Esteban LM, Tsoutsman T, Jordan MA, Roach D, Poulton LD, Brooks A *et al.* Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J Immunol*, 2003;171:2873-8.
- [44] Zekavat G, Mozaffari R, Arias VJ, Rostami SY, Badkerhanian A, Tenner AJ *et al.* A novel CD93 polymorphism in non-obese diabetic (NOD) and NZB/W F1 mice is linked to a CD4+ iNKT cell deficient state. *Immunogenetics*, 2010;62:397-407.
- [45] Cancro MP. Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. *Immunol Rev*, 2004;197:89-101.

3.9 FIGURES

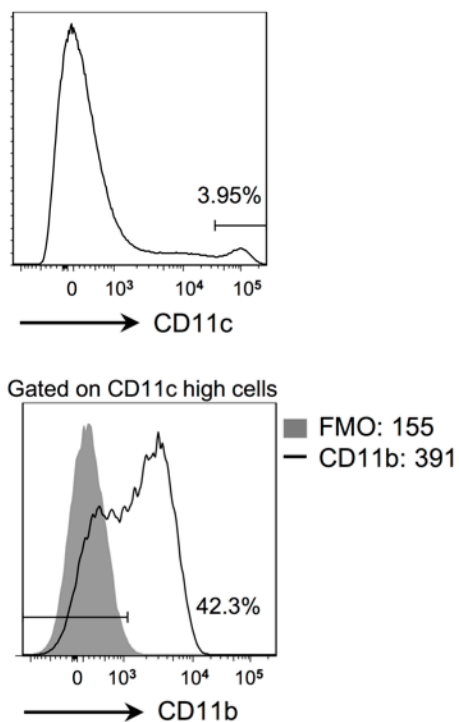


Figure 1. Determining the threshold for selecting CD11b^{-low} dendritic cells. Spleen cells from B6 mice were stained for CD11c and CD8 α without (FMO) or with CD11b. Dendritic cells were selected based on the CD11c^{high} expression (upper histogram). The histogram to the bottom presents an overlay of the APC-Cy7 fluorescence for CD11c^{high} cells stained with anti-CD11b-APC-Cy7 (CD11b) or without the antibody (FMO). MFI levels are indicated.

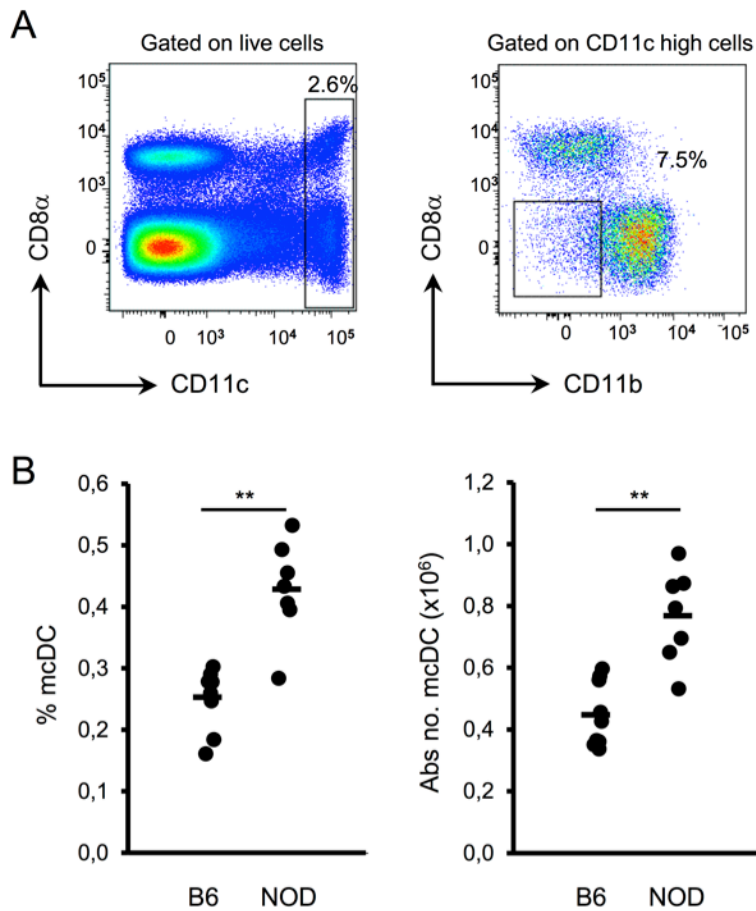


Figure 2. NOD mice exhibit an increase in the proportion and absolute number of mDC. A, Representative flow cytometry profiles of CD8 α and CD11b gated among CD11c^{high} cells on total splenocytes from a B6 mouse. The percentage of live CD11c^{high} (left) and CD8 α ⁻ CD11b^{-/low} (right) cells is shown. B, mDC proportion (left) and absolute number (right) are indicated for B6 and NOD strains. Note that mDC proportion is calculated by multiplying the % of CD8 α ⁻ CD11b^{-/low} to the % of CD11c^{high} cells to obtain the percentage of cells expressing the CD11c^{high} CD8 α ⁻ CD11b^{-/low} mDC phenotype. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. p value, **<0.01. Data was acquired using a BD FACSCanto flow cytometer.

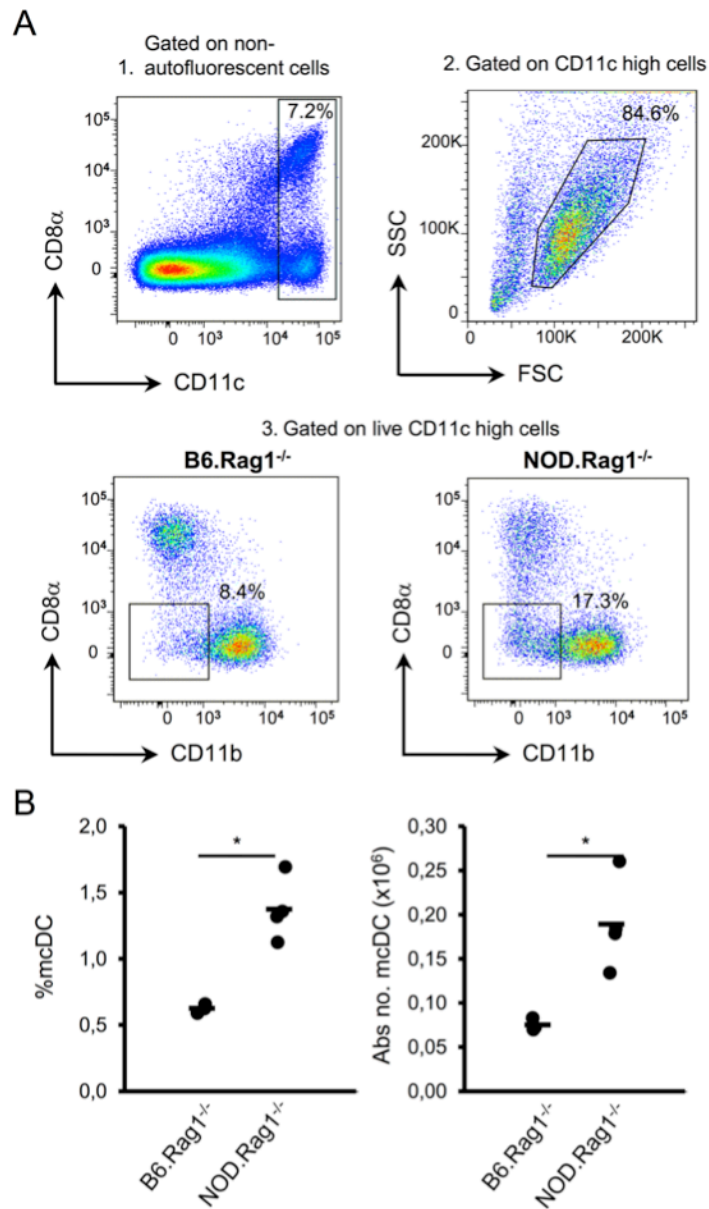


Figure 3. Increased sensitivity in the detection of mDC in B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice. A, The stepwise logical gating strategy is shown for the detection of mDC in Rag-deficient mice. Representative plots of the analysis of a B6.Rag1^{-/-} mouse are shown. 1- Cells are first selected based on the high expression of CD11c. 2- A strict size exclusion gate is applied to the FSC/SSC profile, corresponding to the live CD11c^{high} cells. 3- Finally, mDCs are selected based on the CD8α⁻ CD11b^{low} phenotype. Both B6.Rag1^{-/-} (left) and NOD.Rag1^{-/-} (right) profiles are depicted. B, The proportion (left) and the absolute number (right) of mDC (cells expressing the CD11c^{high} CD8α⁻ CD11b^{low} phenotype) in the spleen of B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice is shown. The percentage of mDC was calculated as in Fig. 2. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. p value, * <0.05 . Data was acquired using a BD FACSCanto flow cytometer.

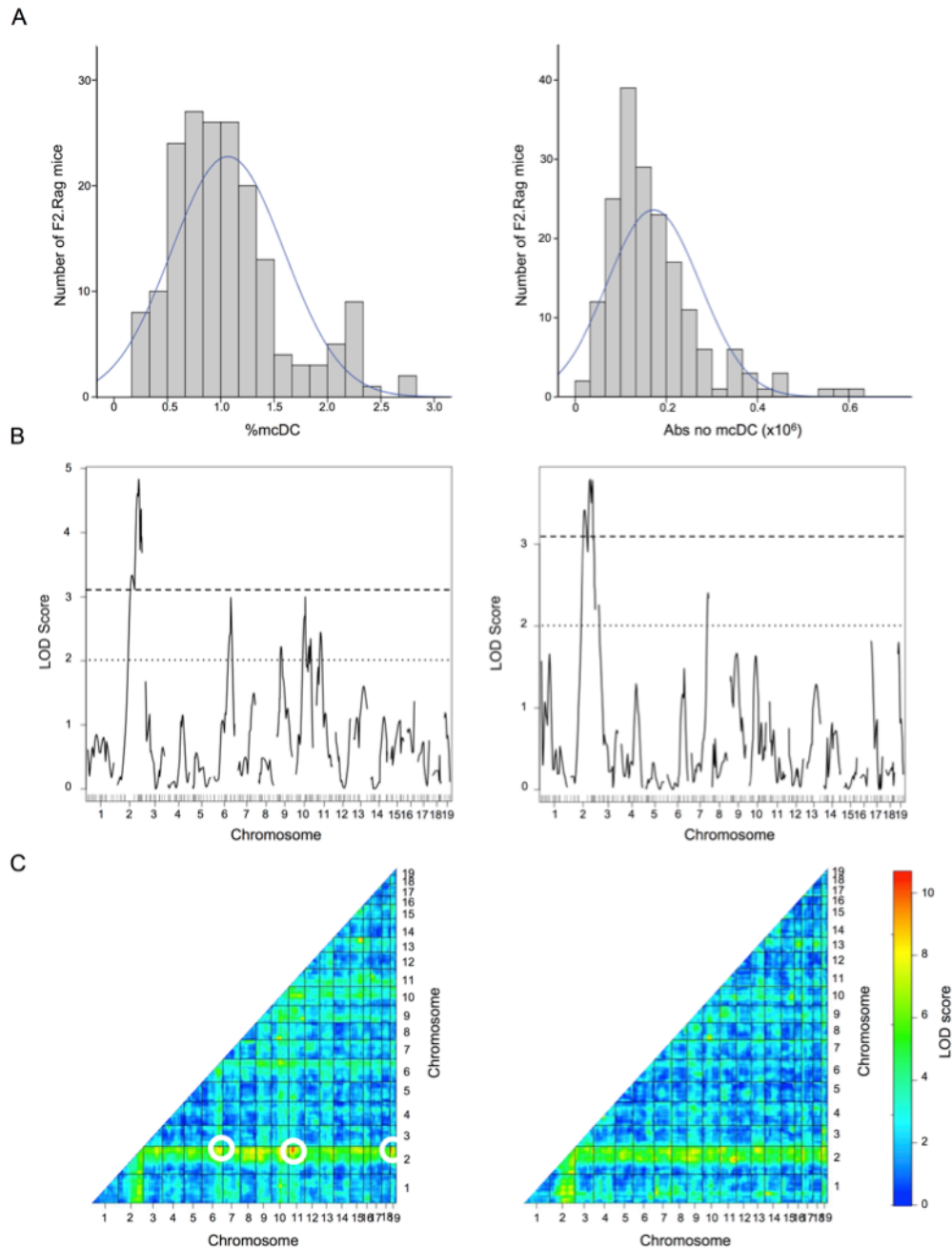


Figure 4. Linkage analysis of mcDC proportion and absolute number. A. The distribution of the F2.Rag cohort relative to the proportion (left) and absolute number (right) of mcDC are shown. B. Genome-wide LOD score plot (R/Qtl) for the proportion (left) and absolute number (right) of mcDC in the F2.Rag cohorts are shown. The dashed and dotted lines respectively indicate the significance threshold of $p < 0.05$ and the suggestive threshold. C. Genome-wide two-dimensional LOD score analysis of F2.Rag for mcDC proportion (left) and absolute number (right). White circles highlight significant LOD scores.

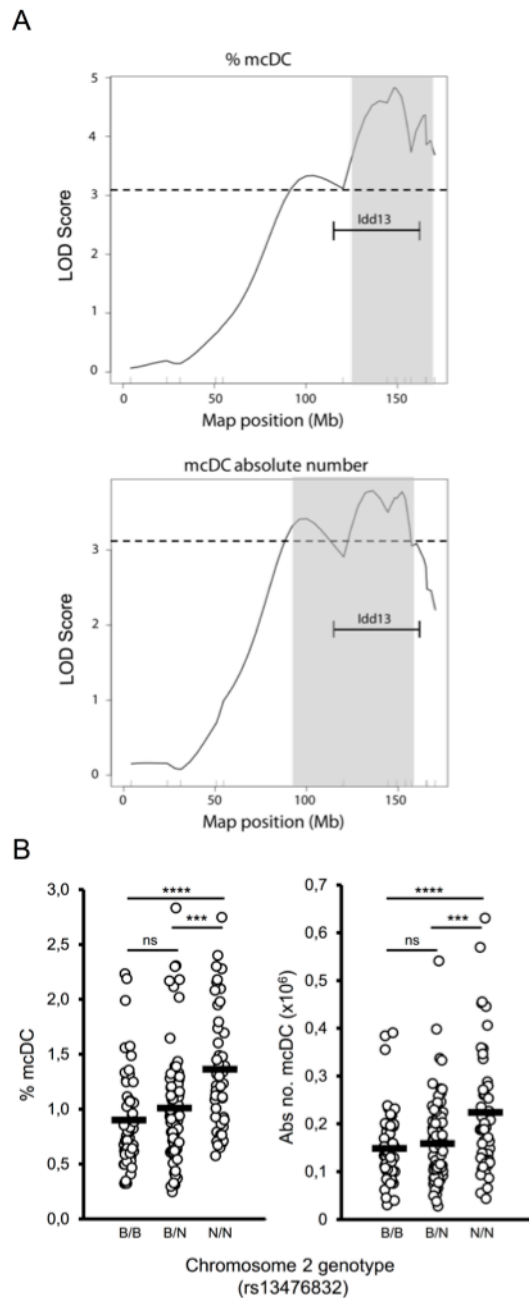


Figure 5. mcDC proportion and absolute number are linked to the *Idd13* locus. A. High resolution maps of the linkage of chromosome 2 to mcDC proportion (top) and absolute number (bottom). The dashed lines indicate the significance threshold of $p < 0.05$. B, Representation of mcDC proportion (left) and absolute number (right) in F2.Rag mice segregated according to the genotype for the SNP rs13476832 on chromosome 2. B/B mice, homozygous for B6 alleles; B/N, heterozygous for B6 and NOD alleles; N/N, homozygous for NOD alleles. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. p value, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$, ns = non-significant.

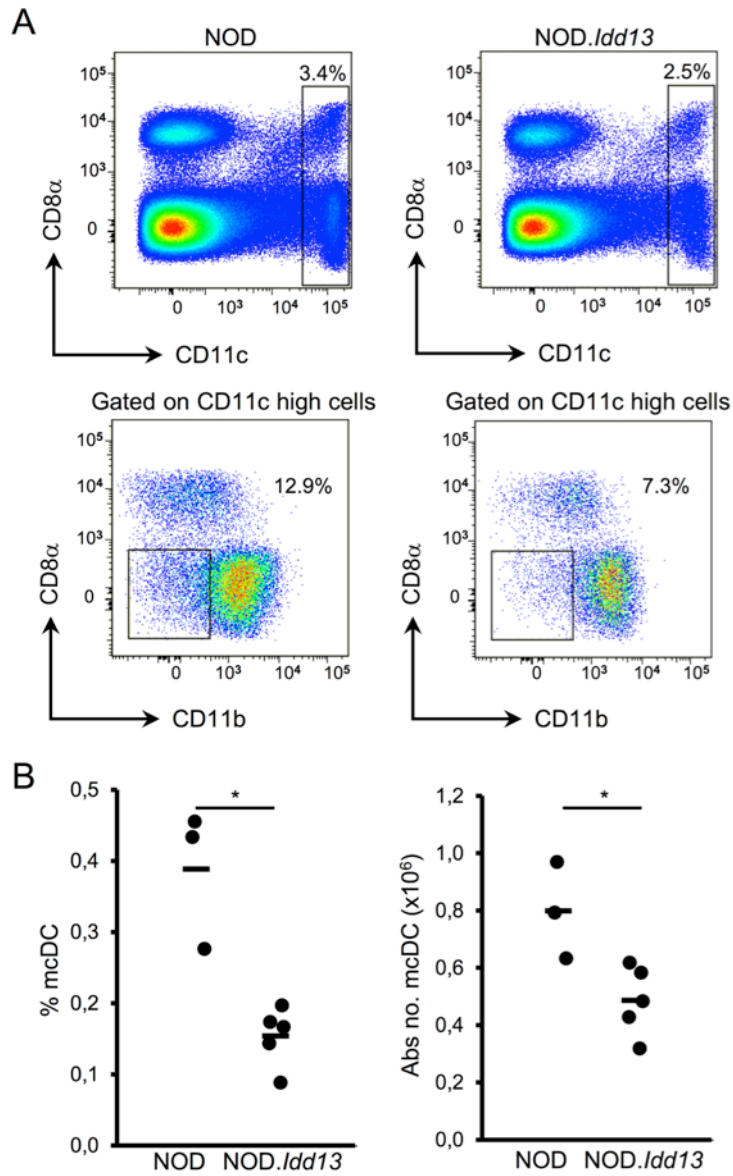
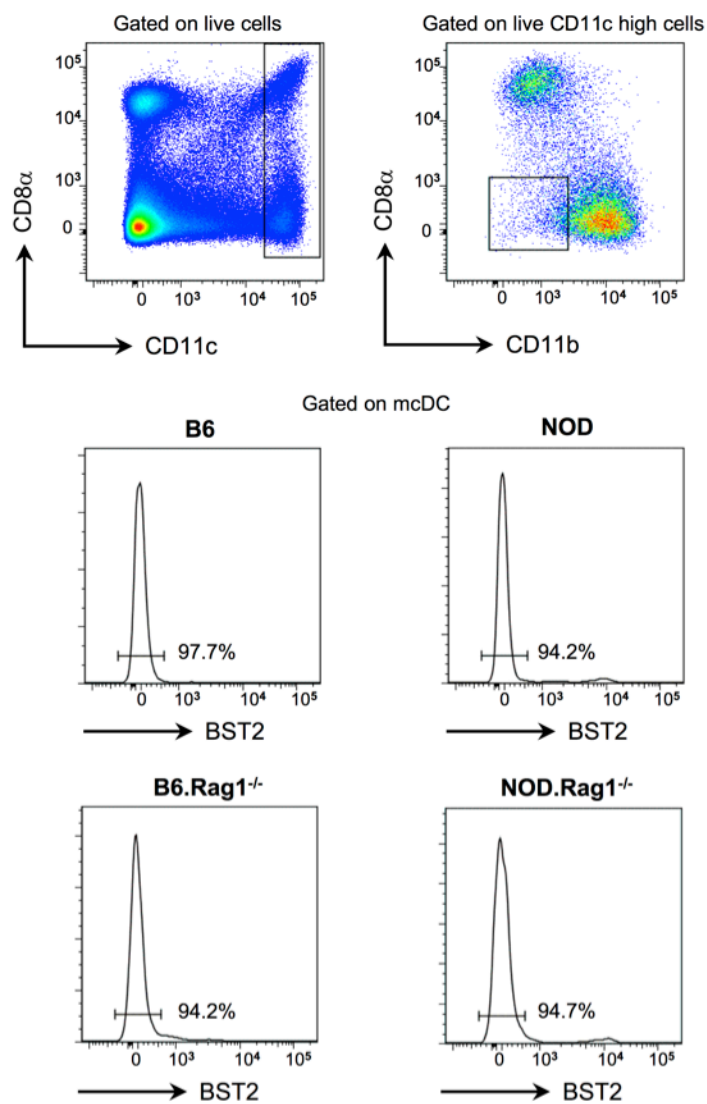
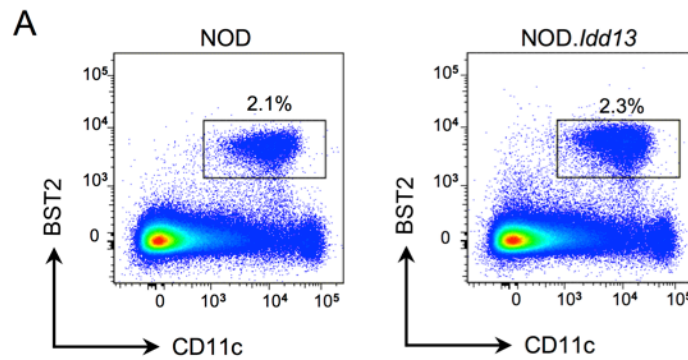


Figure 6. Validation of the contribution of *Idd13* congenic interval in defining the proportion and absolute number of mDC. A, Representative flow cytometry profiles of CD8 α and CD11b among gated CD11c^{high} cells on total splenocytes from NOD (left) and NOD.*Idd13* (right) mice. The percentage of live CD11c^{high} (top) and CD8 α ⁻ CD11b^{-/low} cells (bottom) is shown. B, mDC proportion (left) and absolute numbers (right) are indicated for NOD and NOD.*Idd13* strains. The percentage of mDC was calculated as in Fig. 2. Each dot represents data for an individual mouse. p value, * < 0.05.



Supplementary Figure 1. Adapted gating strategy for mDC excludes plasmacytoid DC contamination. Bst2 expression was determined on CD11c^{high} CD8 α ⁻ CD11b^{-/low} mDC in spleen cell suspensions from B6 and NOD Rag1-sufficient and -deficient mice. The percentage depicts the proportion of Bst-2 negative cells within the mDC gate.



Supplementary Figure 2. NOD and NOD.*Idd13* mice exhibit a similar proportion of plasmacytoid DC. The proportion of CD11c^{low} Bst2⁺ plasmacytoid DC in the spleen is shown for NOD (left) and NOD.*Idd13* (right) mice. Dead cells, doublets and autofluorescent cells were excluded.

CHAPITRE 4 : Discussion et Perspectives

4.1 LA SOURIS NOD : UN MODÈLE DE DYSFONCTION HÉMATOPOÏÉTIQUE

La souris NOD est connue principalement pour sa susceptibilité génétique au diabète auto-immun, qui s'explique par l'accumulation d'une multitude de défauts hématopoïétiques menant à un bris de la tolérance centrale et périphérique, culminant à la destruction spontanée des cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Par conséquent, la souris NOD est également un outil de choix pour l'étude du développement hématopoïétique et de la régulation de sa fonction à l'état de base. L'inflammation associée à un processus auto-immun comme le diabète de type 1 a par contre le potentiel d'influencer ou même causer ces phénotypes. Puisque les déterminants génétiques associés à ces variations du système hématopoïétique chez la NOD restent pour la plupart non-identifiés, il est nécessaire d'investiguer chacun d'entre eux pour d'abord écarter le rôle de l'inflammation et ensuite déterminer les facteurs responsables.

Une population au centre du contrôle de la réponse immunitaire, la cellule dendritique, est vitale dans l'induction de la tolérance. Plusieurs équipes de recherche ont identifié des irrégularités dans le nombre et la fonction de différents sous-types de cellules dendritiques chez la souris NOD. Par exemple, Prasad et al. ont souligné un changement du ratio des DC conventionnelles $CD8\alpha^+$ / $CD8\alpha^-$ chez la NOD (184) en comparaison avec la lignée C57Bl/6, que nous avons également observé et approfondi via une analyse de liaison (manuscrit en préparation). Cette variation, qui résulte en une diminution de la proportion de DC $CD8\alpha^+$ au profit des $CD8\alpha^- CD11b^+$ chez la NOD, est non seulement MHC indépendante, mais

également indépendante de l'inflammation associée à un processus auto-immun sous-jacent. Ces informations sont cruciales pour élucider l'identité des facteurs génétiques impliqués dans le choix de différenciation vers chacune des sous-populations ou leur homéostasie.

En contraste avec les DC $CD8\alpha^+$, les pDC sont augmentés chez la NOD, en dépit du fait que ces 2 sous-populations sont majoritairement dépendantes de facteurs communs tels que IRF8, *Ikaros*, PU.1 et Flt3L (100-104, 111, 112). Cette observation suggère qu'un ou des facteurs sont spécifiquement impliqués dans la régulation des 2 phénotypes séparément. Nous avons d'abord validé l'augmentation de pDC observée par Asselin-Paturel chez la NOD (Article 1, Fig.1). Afin d'écartier la possibilité que l'inflammation associée au développement d'un diabète auto-immun chez la NOD soit responsable de cette augmentation du nombre de pDC, nous avons également validé cette différence significative chez des souris Rag-déficientes (Article 1, Fig. 2). Cette enzyme est nécessaire pour la génération des lymphocytes T et B, qui sont à leur tour essentiels pour la pathogénèse du diabète. Par conséquent, on peut conclure que le fond génétique NOD est directement responsable de la variation phénotypique. Nous avons également validé une augmentation du nombre de mcDC chez la NOD en comparaison avec la souris C57Bl/6 (Article 2, Figure 1), initialement rapporté par Katz et al. (81). À l'instar des pDC, la variation du nombre de mcDC est indépendante de l'inflammation, via l'utilisation des souris immunodéficientes Rag^{-/-} (Article 2, Figure 2).

Hormis les cellules dendritiques, la souris NOD possède des défauts dans d'autres populations du système hématopoïétique, telles que les cellules NK et des lymphocytes T régulateurs. Ces dernières, qui sont impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique, se divisent en plusieurs sous-types, dont les $CD4^+CD25^+$ exprimant le facteur de transcription FoxP3, ou les lymphocytes T double négatifs (DN, $CD4^-CD8^-$) périphériques. Nous avons par

ailleurs observé une réduction du nombre de DN T chez la souris NOD via l'utilisation du modèle TCR transgénique 3A9 (178).

Notre laboratoire a également investigué la variation du nombre des cellules NK spléniques initialement caractérisée par Benoist et al (185). Leurs travaux rapportent l'importance d'un allèle défectueux de *Il15*, cytokine essentielle dans le développement des cellules NK, comme le facteur principal influençant le nombre de NK chez la NOD. Les travaux de notre laboratoire apportent toutefois de nouvelles informations sur ce phénotype: notre analyse de liaison met en valeur 2 nouveaux loci dans la régulation de ce phénotype. Notre étude se distingue de l'analyse précédente via l'utilisation de souris Rag-déficientes en plus de souris de type sauvage, qui a permis de mettre en valeur un impact différentiel apporté par l'allèle NOD de *Il15* dans les 2 conditions. En effet, l'analyse de liaison de souris Rag-déficientes démontre une importance modeste du locus sur le chromosome 8 (*Il15*), toutefois dominée par une association majeure sur le chromosome 9. Cette nouvelle information suggère que, contrairement aux phénotypes de DC étudiés, le nombre de cellules NK est soit influencé par l'inflammation auto-immune, soit par la présence des populations de lymphocytes T et B, via un mécanisme utilisant l'interleukine 15. Au-delà du nombre de NK matures, la souris NOD possède un nombre de pré-mNK réduit (autrefois nommés IKDC), ainsi qu'une maturation fonctionnelle inhibée, tous deux régulés par des loci distincts et indépendants. La combinaison de ces informations renforce la notion que la souris NOD, avec ou sans la présence du système adaptatif, est un modèle de dysfonction hématopoïétique complexe qui permet d'identifier de nombreux déterminants génétiques distincts.

4.2 RÉGULATION DU NOMBRE DE pDC

Beaucoup d'efforts sont appliqués à comprendre la fonction des pDC ainsi que leur ontogénie, mais très peu pour comprendre les mécanismes associés au contrôle de leur nombre. Pourtant, des variations de nombre sont associées à la susceptibilité au VIH et au lupus systémique érythémateux (SLE). Une signature IFN de type 1, présente dans ces 2 pathologies, est d'ailleurs connue pour réguler le nombre de pDC via un mécanisme de contrôle rétroactif. Effectivement, l'IFN α produit par les pDC suite à la détection de signaux activateurs est utilisé pour l'activation du système immunitaire, mais mène aussi à l'apoptose des pDC par la voie intrinsèque (186). Cependant, les facteurs responsables de variations du nombre de pDC à l'état de base sont inconnus. Nos travaux, qui utilisent une approche non-biaisée à haut débit d'analyse de liaison génétique, ont permis d'identifier une région sur le chromosome 7 proximal murin associée au nombre de pDC (Article 1). Cette région, nommée *Pdcl1*, a été validée par analyse congénique et possède plusieurs gènes candidats intéressants : *Spib*, *Tcf4*, *Irf4*, *Irf8* et *Flt3l*. Ce dernier est d'ailleurs connu comme un facteur critique dans la génération et l'expansion de tous les sous-types de DC. Par conséquent, une augmentation de l'activité de Flt3L se répercuterait en une augmentation de tous les sous-types de DC chez la souris NOD, y compris les pDC. La souris NOD observe cependant une diminution des DC CD8 α , allant à l'encontre de cette hypothèse. De plus, une analyse de liaison sur chacune de ces populations révèle des loci distincts (non-publié), suggérant la contribution de déterminants également distincts (36, 187). Les 4 autres facteurs suggérés ont été associés à la différenciation des pDC, quoique pas encore à leur nombre. Cependant, seuls *Tcf4* (E2-2) et *Spib*, tous deux encodant des facteurs de transcription critiques pour la différenciation en pDC, sont polymorphiques chez la souris NOD selon les données de

l'institut Sanger (non publié, disponible en ligne), qui a procédé au séquençage du génome de plus de 20 lignées murines courantes. De plus, seul *SpiB* possède un polymorphisme affectant sa séquence codante.

Bien que rien n'élimine de façon définitive aucun de ces gènes candidats, *SpiB* semble par conséquent être le favori. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait d'abord simple de vérifier le niveau d'expression de ces différents gènes par qRT-PCR sur des pDC de B6 et de NOD. Par contre, il est également possible que la variation du nombre de pDC soit causée par un phénotype en amont de la différenciation des pDC, soit au stade CDP dans la moelle osseuse. Par conséquent, l'expression des gènes dans ces cellules serait également à investiguer.

Pour évaluer si le polymorphisme non-synonyme dans *SpiB* a un impact fonctionnel, il serait simple de surexprimer ce variant de *SpiB* avec un système rapporteur à la luciférase, en prenant avantage d'un promoteur répondant à *SpiB* en amont. Une modulation du signal indiquerait un impact fonctionnel du variant de *SpiB*. Cependant, un résultat négatif de cette expérience ne signifie pas nécessairement une absence d'impact fonctionnel : un polymorphisme dans un facteur de transcription peut avoir un effet spécifique à un type de cellule, selon les cofacteurs exprimés. Par conséquent, une approche par CRISPR-Cas9, qui permettrait de générer une lignée B6 avec le polymorphisme de *SpiB* retrouvé chez la NOD par édition du génome d'un embryon, serait la façon la plus claire de valider le rôle du phénotype, quoique plus complexe. Cette approche est d'ailleurs aussi valable pour valider l'impact d'autres polymorphismes dans le même contexte.

Il sera également intéressant d'identifier le mécanisme utilisé pour moduler le nombre de pDC spléniques *in vivo*. Nous avons démontré qu'il n'y a pas de différence de prolifération et d'apoptose entre les pDC de B6 et de NOD. Nous commencerons par investiguer un potentiel biais de différenciation des CDP vers les pDC, dans les souris contrôles et la souris congénique. L'identification du mécanisme est non seulement d'intérêt général dans la biologie des pDC, mais pourra également diriger la recherche des gènes candidats impliqués dans la régulation du phénotype.

4.3 CONTRIBUTION DES PDC À L'AUTO-IMMUNITÉ

Le rôle des pDC dans l'induction d'une réponse immunitaire, notamment antivirale, est bien documenté. Une majeure partie de leur contribution se fait via leur sécrétion massive d'IFN de type 1. Cette signature peut toutefois s'avérer dangereuse dans un contexte non infectieux, puisque la voie IFN est associée à la susceptibilité à plusieurs maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1, le psoriasis ou le lupus (188). L'impact des pDC a d'ailleurs été mis en évidence suite à leur déplétion dans un modèle murin de lupus, la souris BXSB, prenant avantage du système DTR (récepteur à la toxine diphtérique) sous le contrôle du promoteur BDCA2 humain, menant à l'expression spécifique du DTR à la surface des pDC (189). L'injection de DTX a suffi à inhiber la réponse immunitaire, corrélant avec une réduction dans la réponse IFN de type 1 dans les tissus et une diminution dans la production d'auto-anticorps anti-nucléaires. Les pDC, qui reconnaissent des acides nucléiques viraux via leur TLR7 et 9, sont également activées suite à la reconnaissance d'acides nucléiques de l'hôte en complexe avec des protéines comme HMGB1 ou LL-37 (190), qui peuvent être relâchées par

les neutrophiles via un processus appelé NETosis. Un phénomène similaire a également été observé dans le contexte du diabète auto-immun, où un complexe dialogue entre les neutrophiles et les pDC mène à l'activation de cellules B-1a produisant des anticorps anti-nucléaires (147). Cette interaction s'avère critique pour l'initiation de la réponse T auto-immune.

Par contre, les pDC sont également connues pour leurs fonctions dans la tolérance immunitaire, soulevant plusieurs interrogations sur le rôle positif ou négatif de ces cellules dans un contexte auto-immun. En effet, les pDC ont démontré la capacité d'induire la différenciation des T CD4 naïfs en Tregs via la sécrétion de indoléamine-2,3-dioxygénase, de TGF- β ou l'expression de ICOS-L, dans des contextes d'allogreffe, de EAE ou de réponse antitumorale (191). De plus,IDO a le potentiel de moduler les réponses T effectrices, grâce à l'inhibition du catabolisme du tryptophane, un acide aminé critique dans la prolifération des T effecteurs. De plus, le transport d'antigènes vers le thymus par les pDC via une voie CCR9⁺ dépendante s'avère importante dans le processus de sélection négative (192).

Il est donc justifié de poser la question suivante : au-delà de leur fonction, une variation du nombre de pDC influence-t-elle la susceptibilité aux maladies auto-immunes? Nos travaux semblent indiquer que non, à tout le moins dans le contexte du diabète auto-immun. En effet, non seulement le locus *Pdcd1* sur le chromosome 7 ne coïncide-t-il pas avec aucun locus *Idd* associé à la susceptibilité au diabète, mais la souris congénique NOD.NZW-*Chr7* n'observe aucune diminution dans son incidence au diabète, malgré sa proportion de pDC réduite (Article 1, Fig.6)(193). Nous avons donc conclu que la proportion élevée de pDC n'est ni nécessaire ni suffisante pour induire une réponse diabétogénique. Cependant, lorsque la susceptibilité au diabète est considérée comme la somme d'une multitude de mécanismes à

impact modeste, il est très possible que la proportion élevée de pDC chez la NOD ait à la fois un impact positif et négatif, mais culminant en un tout neutre. La souris congénique NOD.NZW-*Chr7* constitue donc un outil idéal pour examiner en profondeur l'impact d'une proportion de pDC plus faible avec le reste du fond génétique NOD, pour vérifier l'induction de Tregs, la sélection négative et la réponse IFN α . Il sera aussi intéressant d'évaluer l'impact du nombre de pDC dans un contexte auto-immun différent du diabète. En effet, la souris NOD est également un modèle de sialite, caractérisée par des défauts fonctionnels et histopathologiques des glandes salivaires similaires au syndrome de Sjögren, qui est souvent associé au SLE. La souris congénique NOD.NZW-*Chr7* a d'abord été créée suite à l'identification d'un locus associé à la sialite. Cette dernière démontre une diminution de l'infiltration des glandes salivaires et de la production d'auto-anticorps, qui corrèle avec le nombre de pDC splénique. Par conséquent, le nombre de pDC est possiblement associé à d'autres maladies auto-immunes.

4.4 CARACTÉRISATION IMMUNOBIOLOGIQUE DES mcDC

La découverte d'une nouvelle sous-population rare de DC capable de renverser l'anergie et d'être activée via le contact avec des cellules apoptotiques est passée relativement inaperçue par la communauté en immunologie (40, 80). Par conséquent, le portrait sur la biologie des mcDC reste extrêmement incomplet. Les détails sur leur ontogénie, sur les facteurs responsables dans leur différenciation, leur homéostasie ou leurs fonctions restent pour l'instant inconnus. En se basant sur les informations que nous avons présentement, il est en fait très hâtif de même considérer les mcDC comme appartenant à la lignée des cellules

dendritiques. En effet, leur appartenance à la famille des DC repose entre autres sur leur morphologie apparentées aux DC conventionnelles, leur forte expression de l'intégrine CD11c ainsi que leur capacité à induire une réponse T efficace. Cependant, ces simples critères peuvent également être attribués à des macrophages. Nous savons par contre que les mcDC sont fortement dépendantes du facteur Flt3L, également responsable de la différenciation et la prolifération des autres sous-types de DC (80). Il est également possible qu'il s'agisse d'un sous-type d'une population préalablement caractérisée dans la littérature, mais retrouvé dans un état d'activation pas encore observé à ce jour. Malgré l'ensemble de ces questionnements vitaux, il reste une réalité difficile à ignorer : aucune autre population n'a démontré auparavant une capacité à renverser l'anergie in vivo. C'est d'ailleurs ce phénotype unique qui motive la recherche sur les mcDC et qui justifie la nécessité de leur caractérisation immunobiologique. Nos travaux ont entrepris d'identifier les déterminants génétiques responsables de la variation de proportion de mcDC observée entre les souris B6 et NOD. En effet, aucun facteur n'est connu pour réguler de façon spécifique la prolifération, l'apoptose ou la différenciation des mcDC in vivo. Notre approche a d'abord démontré que l'augmentation de mcDC chez la NOD n'est pas due à la présence d'une réaction auto-immune sous-jacente ou à la présence de lymphocytes T ou B via l'utilisation de souris Rag-déficientes, à l'instar des pDC (Article 2, Fig.2). Nous avons ensuite entrepris une analyse de liaison sur le croisement F2 des souris B6.Rag et NOD.Rag, identifiant un locus majeur sur le chromosome 2 distal (Article 2, Fig.4). Cette région, possède plusieurs gènes polymorphiques qui pourraient être associés à une régulation du nombre de mcDC. Parmi les gènes candidats les plus susceptibles d'influencer la proportion de mcDC, on retrouve principalement *Bcl2l11*, *Sirpa* et *B2m*. Ce dernier, qui code pour la protéine SIRPa, a démontré un rôle dans la migration des DC via son interaction avec

son ligand, CD47 (194). Il est par conséquent plausible que l'un des très nombreux SNVs dans la séquence de *Sirpa* chez la NOD mène à une accumulation de mcDC dans la rate. De son côté, *Bcl2l1l* encode pour le facteur proapoptotique BIM, qui semble défectueux chez la NOD. En effet, bien qu'aucun polymorphisme codant n'est présent dans sa séquence, on retrouve des variants dans ses régions régulatrices corrélant avec une difficulté à être induit chez la NOD dans le contexte de la sélection thymique. Nos travaux préliminaires utilisant des souris BIM-déficientes présentent également une accumulation de mcDC, validant *Bcl2l1l* comme gène candidat responsable de la régulation des mcDC.

Les questions immunobiologiques entourant les mcDC ne se limitent toutefois pas à la régulation de leur proportion. Cependant, les approches nécessaires pour répondre à la plupart d'entre elles sont limitées par le même problème technique: le manque de précision de leur isolation. En effet, nous utilisons une combinaison de marquages négatifs pour isoler les mcDC, mais aucun marqueur spécifique comme BST-2 pour les pDC. Il reste tout de même possible que la stratégie de sélection utilisée actuellement isole une population hétérogène. L'utilisation de RNA-Seq sur les cellules mcDC triées, en comparaison avec les DC CD8 α^+ , DC CD11b $^+$ et pDC, nous permettrait non seulement de pallier à ce problème en identifiant une protéine de surface spécifique, ou encore un facteur de transcription distinct, mais enrichirait également nos connaissances sur la fonction de ces cellules. Valider un tel marqueur permettra de s'assurer que la population de mcDC à l'étude ne sera pas contaminée. Il sera donc possible de procéder à des tests fonctionnels plus performants et sensibles, ou encore de caractériser leur ontogénie suite au transfert adoptif de précurseurs comme les CDP et les pré-DC. Identifier un équivalent humain des mcDC sera, bien que potentiellement difficile, d'un intérêt fondamental. Bien qu'il nous manque potentiellement d'informations sur

la fonction des mcDC in vivo pour bien établir une signature avec laquelle nous pourrions établir un parallèle, il est déjà possible d'investiguer les résultats de l'étude de transcriptomique à cellule simple faite sur les DC qui a permis l'identification d'un nouveau sous-type de DC chez l'humain, aux fonctions similaires aux mcDC.

Il sera bien sûr extrêmement intéressant d'identifier par quel mécanisme les mcDC renversent l'anergie. Nous savons par exemple que l'addition d'IL-2 a démontré une capacité à renverser l'anergie in vitro, mais jamais in vivo. Peut-être les mcDC produisent-elles d'énormes quantités d'IL-2 suite à une stimulation par des cellules apoptotiques? Nous savons également que les DC expriment l'enzyme d'édition d'ubiquitine A20 (*Tnfaip3*), qui est associée à la susceptibilité à plusieurs maladies auto-immunes. Il a été établi que l'ablation conditionnelle de *Tnfaip3* chez les cellules exprimant CD11c mène à une perte d'anergie et une rapide activation des lymphocytes T (195, 196). Au jour de cette information, il sera intéressant d'investiguer si les mcDC expriment des niveaux similaires de A20 que les DC conventionnelles.

Nos prochains travaux viseront donc à explorer toutes ces questions en intégrant le rôle des mcDC dans l'immunité. La prochaine décennie sera pour le moins excitante dans le domaine des mcDC.

4.5 IMPACT DES MCDC EN AUTO-IMMUNITÉ

La contribution des mcDC dans la réponse immunitaire, comme la majorité des caractéristiques qui les entourent, reste floue. Nous pouvons toutefois apprécier 2 caractéristiques qui les distinguent des DC conventionnelles : leur capacité à renverser

l'anergie et à être activées par des cellules apoptotiques. En effet, les travaux de Katz et al. ont pris avantage du modèle murin RIP-mOVA, qui exprime l'ovalbumine sous le contrôle du promoteur de l'insuline du rat, pour induire l'anergie de lymphocytes CD8 T OT-1 suite à un transfert adoptif (81). Le transfert adoptif subséquent de mcDC exposées à des cellules irradiées a non seulement permis de stimuler une prolifération des cellules OT-1 de manière antigène spécifique, mais a induit une insulite importante après 12 jours. Les auteurs ont également utilisé un modèle plus physiologique, prenant avantage d'îlots pancréatiques de souris NOD irradiées pour stimuler des mcDC. Ces dernières sont ensuite transférées chez de jeunes souris NOD non diabétiques, ce qui induit rapidement l'insulite et le développement du diabète. Les auteurs démontrent finalement que le transfert de mcDC isolées de souris NOD diabétiques dans des souris non-diabétiques est suffisant pour induire le diabète dans 100% des souris seulement 12 jours après injection. Bien que ces expériences démontrent clairement un rôle important des mcDC dans le bris de tolérance, les auteurs n'expliquent pas comment ces cellules peuvent affecter différemment les souris NOD et B6, respectivement susceptibles et résistantes au diabète auto-immun. Après tout, leurs expériences qui prennent avantage du modèle OT-1 sont faites sur un fond génétique B6, prouvant que les mcDC sont tout à fait capables de briser la tolérance et d'induire une insulite à l'extérieur d'un fond génétique NOD. Leurs expériences révèlent toutefois une potentielle différence de proportion de mcDC entre les lignées de souris, qui pourrait s'avérer critique dans la susceptibilité au diabète. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord validé cette différence de proportion, puis procédé à une analyse de liaison sur des souris F2 issues du croisement B6.Rag et NOD.Rag, qui nous a révélé un locus majeur sur le chromosome 2 distal. Cette région coïncide avec le locus *Idd13*, qui est associé à la susceptibilité au diabète auto-immun et au SLE. L'utilisation

de souris NOD congéniques sur l'intervalle du locus *Idd13* nous a permis de valider l'association de la proportion de mcDC avec cette région, et a également permis de tracer une corrélation plausible entre le nombre de mcDC et la susceptibilité au diabète. La validation définitive de cette association nécessitera toutefois une modulation spécifique du nombre de mcDC in vivo chez la souris NOD, probablement après l'identification du déterminant génétique responsable au sein du locus *Idd13*. Notre investigation préliminaire du gène candidat *Bcl2l1l* suggère que le facteur pro-apoptotique BIM régule le nombre de mcDC in vivo. Il serait donc possible d'utiliser des souris *Bcl2l1l*^{-/-}, qui obtiennent une augmentation de mcDC, pour les croiser avec des souris RIP-mOVA. Un transfert adoptif de cellules mOVA irradiées suivi d'une injection de T CD8 OT-1 dans les souris RIP-mOVA *Bcl2l1l*^{-/-} ou de type sauvage permettrait potentiellement de voir une association entre le nombre de mcDC et l'insulite.

Nous croyons pouvoir élaborer un modèle préliminaire expliquant la contribution des mcDC dans le diabète, basé sur la différence de nombre de mcDC. Il est connu que la souris subit une phase de remodelage du pancréas tôt dans le développement, qui mène à une vague d'apoptose des cellules β qui coïncide avec le début de la péri-insulite (197, 198). Cette vague, présente autant dans les souris résistantes et susceptible au diabète, a été une énigme pour les immunologistes : comment une apoptose massive, connue pour être un signal tolérogène, est-elle un moment clé dans le bris de la tolérance (140)? Comment mène t-elle à une réponse auto-immune seulement chez les souris génétiquement susceptibles? Nous croyons que les mcDC sont capables de renverser l'anergie dans les souris B6 et NOD.*Idd13* suite à une stimulation des cellules β apoptotiques, mais que le signal tolérogène induit aux autres sous-types de DC par ces mêmes cellules apoptotiques ainsi que les autres mécanismes de tolérance

périphériques (Tregs, Bregs) sont suffisants pour compenser l'effet néfaste des mcDC. En contrepartie, l'accumulation des mcDC chez la NOD, possiblement due à une apoptose défectueuse liée à un polymorphisme dans *Bcl2l1l*, serait suffisante pour supplanter les mécanismes de tolérance en place.

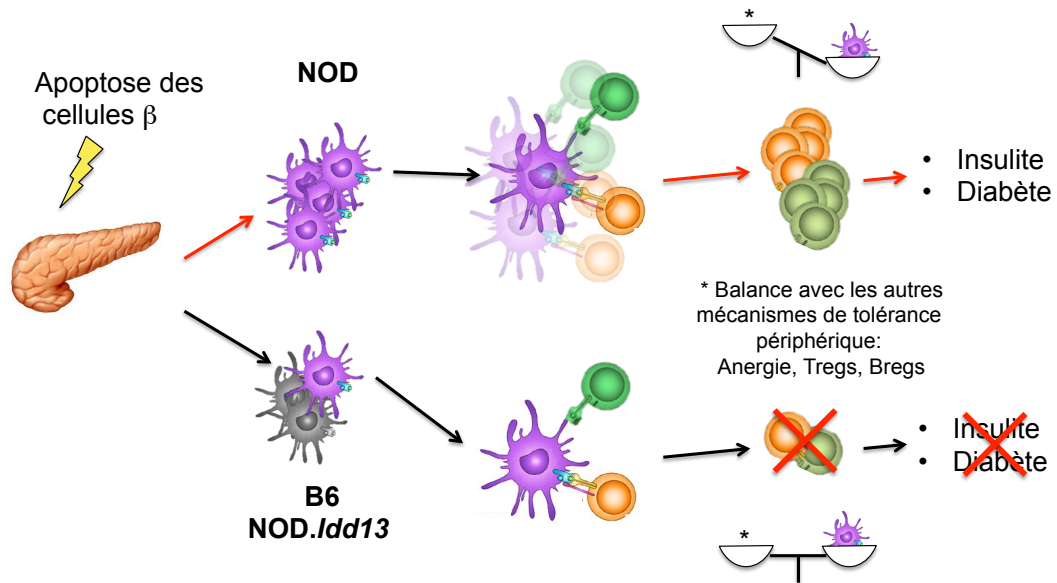


Figure 7 : Modèle de la contribution du nombre de mcDC dans la susceptibilité au diabète auto-immun

Ce modèle d'équilibre pourrait expliquer l'existence même des mcDC. Il semble en effet contre-intuitif que l'évolution ait favorisé le développement d'une population aussi dangereuse d'un point de vue auto-immun. Par contre, leur rôle démontré dans le contexte anti-tumoral semble suggérer le contraire (40). Par conséquent, l'évolution a possiblement favorisé le maintien d'un fin équilibre dans le nombre de mcDC afin de pouvoir tirer partie des avantages de cette population unique, tout en évitant leurs désavantages. Il sera intéressant de pouvoir explorer cette hypothèse en investiguant si la réponse anti-tumorale est influencée par le nombre de mcDC. Le transfert adoptif de cellules cancéreuses dans des souris B6 et *Bcl2l11*^{-/-} serait d'ailleurs une expérience simple à envisager pour répondre à cette question. En alternative, il serait possible d'utiliser un agent carcinogène tel que le méthylcholanthrène (MCA) chez la souris NOD et NOD.*Idd13* et investiguer si on observe une différence dans l'incidence de tumeurs, qui serait potentiellement attribuable à une différence dans la proportion de mcDC.

4.6 CONCLUSIONS

L'objectif principal de cette thèse était d'identifier les déterminants génétiques associés à la régulation du nombre de pDC et de mcDC in vivo. Nous avons démontré que la rate de la souris NOD possède un plus grand nombre de ces 2 sous-types en comparaison avec la souris B6, suggérant que le phénotype était régulé génétiquement. Nous avons ensuite utilisé des souris Rag-déficientes pour démontrer que ces phénotypes sont non seulement indépendants de la présence du système adaptatif, mais qu'ils ne sont également pas causés par l'inflammation associée à une possible réponse auto-immune sous-jacente. En utilisant des cohortes de souris F2 B6.Rag x NOD.Rag, nous avons identifié des locus associés à la régulation spécifique de chacune des populations. Le nombre de pDC est régulé par un locus proximal du chromosome 7, que nous avons appelé *Pdcl1*. Ce locus a ensuite été validé via l'utilisation d'une lignée congénique NOD.NZW-Chr7, qui possède une quantité réduite de pDC spléniques en comparaison avec la lignée NOD parentale. Cependant, l'incidence du diabète n'est pas significativement différente entre cette lignée congénique et la NOD, ce qui coïncide avec le fait qu'aucune région de susceptibilité au diabète ne se situe au niveau de *Pdcl1*. Bien que nous investiguerons davantage les facteurs régulant la proportion de pDC, il semble que ce phénotype ne soit pas associé à la susceptibilité au diabète auto-immun.

En contraste, notre analyse de liaison a permis d'identifier un QTL associé au nombre de mcDC sur la portion distale du chromosome 2, qui coïncide avec la région de susceptibilité au diabète auto-immun nommée *Idd13*. Cet intervalle, qui possède plusieurs gènes candidats intéressants comme *Bcl2l11*, *Sirpa* ou *B2m*, semble en effet suggérer que la proportion de mcDC est en étroite relation avec la susceptibilité au diabète auto-immun, selon nos études congéniques. Nos travaux futurs porteront sur la validation de gènes candidats de l'intervalle

Idd13 et l'identification du mécanisme utilisé par ce gène candidat dans la modulation du nombre de mcDC.

Finalement, l'ensemble de ces résultats, certains étant non-publiés, montre que le nombre des différents sous-types de DC spléniques est régulé par des facteurs distincts, étant associés à des locus différents. Ces nouvelles informations nous permettront de pouvoir moduler chaque sous-population indépendamment pour obtenir la réponse désirée, possiblement dans un contexte de vaccins de DC.

BIBLIOGRAPHIE

References

1. Hayden MS, Ghosh S. 2011. NF- κ B in immunobiology. *Cell Research* 21: 223-44
2. Turvey SE, Broide DH. 2010. Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125: S24-32
3. Pancer Z, Cooper MD. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* 24: 497-518
4. Jung D, Alt FW. 2004. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116: 299-311
5. Burnet FM. 1959. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*: University Press
6. BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172: 603-6
7. Lafferty KJ, Cunningham AJ. 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 53: 27-42
8. Janeway CA. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1: 1-13
9. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-83
10. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-8
11. Mogensen TH. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 22: 240-73- Table of Contents
12. Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology* 12: 991-1045
13. Schaefer L. 2014. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *Journal of Biological Chemistry* 289: 35237-45
14. Matzinger P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-5
15. Latz E, Xiao TS, Stutz A. 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology* 13: 397-411
16. Hudson BI, Lippman ME. 2017. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annual review of medicine*
17. Langerhans P. 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 44: 325-37
18. Schuler G, Romani N, Steinman RM. 1985. A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology* 85: 99s-106s
19. Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137: 1142-62

20. Steinman RM, Cohn ZA. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *The Journal of experimental medicine* 139: 380-97
21. Steinman RM. 2004. *Dendritic cells: from the fabric of immunology*.
22. Steinman RM. 2007. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology* 37 Suppl 1: S53-60
23. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. 1979. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *The Journal of experimental medicine* 149: 1-16
24. Nussenzweig MC, Steinman RM, Gutchinov B, Cohn ZA. 1980. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 152: 1070-84
25. Steinman RM, Witmer MD. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 5132-6
26. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 18: 767-811
27. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *The Journal of biological chemistry* 272: 13803-9
28. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Aït-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of experimental medicine* 188: 373-86
29. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 258-63
30. Ngo VN, Tang HL, Cyster JG. 1998. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *The Journal of experimental medicine* 188: 181-91
31. Chan VW, Kothakota S, Rohan MC, Panganiban-Lustan L, Gardner JP, Wachowicz MS, Winter JA, Williams LT. 1999. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 93: 3610-6
32. Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. 1999. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162: 2472-5
33. Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. 2007. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. 29: 303-9
34. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* 80: 477-83

35. ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W. 2013. MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5: a016873
36. Pelletier A-N, Lesage S. 2013. The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *Journal of Autoimmunity*
37. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology* 31: 563-604
38. Mildner A, Jung S. 2014. Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity* 40: 642-56
39. Cheong C, Matos I, Choi J-H, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, Jeffrey KL, Anthony RM, Kluger C, Nchinda G, Koh H, Rodriguez A, Idoyaga J, Pack M, Velinzon K, Park CG, Steinman RM. 2010. Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209+ Dendritic Cells for Immune T Cell Areas. *Cell* 143: 416-29
40. Reboulet RA, Hennies CM, Garcia Z, Nierkens S, Janssen EM. 2010. Prolonged Antigen Storage Endows Merocytic Dendritic Cells with Enhanced Capacity To Prime Anti-Tumor Responses in Tumor-Bearing Mice. *The Journal of Immunology* 185: 3337-47
41. Vremec D, Shortman K. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159: 565-73
42. Poulin LF, Reyat Y, Uronen-Hansson H, Schraml BU, Sancho D, Murphy KM, Håkansson UK, Ferreira Moita L, Agace WW, Bonnet D, Reis e Sousa C. 2012. DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* 119: 6052-62
43. Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman RM. 1989. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cellular immunology* 118: 108-25
44. Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, Hogquist KA. 2007. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 204: 3147-56
45. del Rio M-L, Rodriguez-Barbosa J-I, Kremmer E, Förster R. 2007. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178: 6861-6
46. Shortman K, Heath WR. 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological reviews* 234: 18-31
47. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 20: 621-67
48. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* 12: 557-69

49. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee H-W, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315: 107-11
50. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 186: 665-72
51. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *The Journal of experimental medicine* 186: 1819-29
52. van der Aa E, van Montfoort N, Woltman AM. 2015. BDCA3(+)/CLEC9A(+) human dendritic cell function and development. *Seminars in cell & developmental biology* 41: 39-48
53. Walzer T, Dalod M, Vivier E, Zitvogel L. 2005. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert opinion on biological therapy* 5 Suppl 1: S49-59
54. Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen J-L, Keller AM, Joffre O, Zelenay S, Nye E, Le Moine A, Faure F, Donckier V, Sancho D, Cerundolo V, Bonnet D, Reis e Sousa C. 2010. Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 207: 1261-71
55. Robbins SH, Walzer T, Dembélé D, Thibault C, Defays A, Bessou G, Xu H, Vivier E, Sellars M, Pierre P, Sharp FR, Chan S, Kastner P, Dalod M. 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biology* 9: R17
56. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. 2013. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57: 1705-15
57. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 1036-41
58. Lewis KL, Caton ML, Bogunovic M, Greter M, Grajkowska LT, Ng D, Klinakis A, Charo IF, Jung S, Gommerman JL, Ivanov II, Liu K, Merad M, Reizis B. 2011. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* 35: 780-91
59. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E, Nilsson E, Grundberg I, McDonald D, Filby A, Li W, De Jager PL, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N. 2017. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356
60. Facchetti F, Vergoni F. 2000. The plasmacytoid monocyte: from morphology to function. *Advances in clinical pathology : the official journal of Adriatic Society of Pathology* 4: 187-90

61. Lande R, Gilliet M. 2010. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183: 89-103
62. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *The Journal of experimental medicine* 185: 1101-11
63. Rönnblom L, Ramstedt U, Alm GV. 1983. Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *European Journal of Immunology* 13: 471-6
64. Fitzgerald-Bocarsly P. 1993. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacology & therapeutics* 60: 39-62
65. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-7
66. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine* 5: 919-23
67. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual Review of Immunology* 29: 163-83
68. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G. 2003. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170: 4465-74
69. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology* 8: 594-606
70. Blasius AL, Beutler B. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32: 305-15
71. Kawai T, Akira S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637-50
72. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M. 2010. Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and Antiviral NK and CD8+ T Cell Accrual. *Immunity* 33: 955-66
73. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger J-M. 2005. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews Immunology* 5: 793-806
74. Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, Trinchieri G, Kaiserlian D. 2008. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29: 464-75
75. Sharma MD, Hou D-Y, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, Mellor AL, He Y, Munn DH. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 113: 6102-11
76. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou D-Y, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation* 117: 2570-82

77. Guéry L, Hugues S. 2013. Tolerogenic and activatory plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Frontiers in Immunology* 4: 59
78. Katz JD, Janssen EM. 2011. Breaking T cell tolerance to beta cell antigens by merocytic dendritic cells. *68*: 2873-83
79. Schwartz RH. 2003. T cell anergy. *Annual Review of Immunology* 21: 305-34
80. Janssen E, Tabeta K, Barnes MJ, Rutschmann S, McBride S, Bahjat KS, Schoenberger SP, Theofilopoulos AN, Beutler B, Hoebe K. 2006. Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. *24*: 787-99
81. Katz JD, Ondr JK, Opoka RJ, Garcia Z, Janssen EM. 2010. Cutting Edge: Merocytic Dendritic Cells Break T Cell Tolerance to Cell Antigens in Nonobese Diabetic Mouse Diabetes. *The Journal of Immunology* 185: 1999-2003
82. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology* 25: 267-96
83. Hennies CM, Reboulet RA, Garcia Z, Nierkens S, Wolkers MC, Janssen EM. 2011. Selective expansion of merocytic dendritic cells and CD8DCs confers anti-tumour effect of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand treatment in vivo. *Clinical and Experimental Immunology* 163: 381-91
84. Wu L, Shortman K. 2005. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Seminars in Immunology* 17: 304-12
85. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, Price J, Yin N, Bromberg J, Lira SA, Stanley ER, Nussenzweig M, Merad M. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *Journal of Experimental Medicine* 206: 3115-30
86. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, Ho AWS, See P, Shin A, Wasan PS, Hoeffel G, Malleret B, Heiseke A, Chew S, Jardine L, Purvis HA, Hilkens CMU, Tam J, Poidinger M, Stanley ER, Krug AB, Renia L, Sivasankar B, Ng LG, Collin M, Ricciardi-Castagnoli P, Honda K, Haniffa M, Ginhoux F. 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38: 970-83
87. Holt PG, Schon-Hegrad MA, McMenemy PG. 1990. Dendritic cells in the respiratory tract. *International reviews of immunology* 6: 139-49
88. Shigematsu H, Reizis B, Iwasaki H, Mizuno S-i, Hu D, Traver D, Leder P, Sakaguchi N, Akashi K. 2004. Plasmacytoid Dendritic Cells Activate Lymphoid-Specific Genetic Programs Irrespective of Their Cellular Origin. *Immunity* 21: 43-53
89. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290: 2152-4
90. Wu L, Amico A, Hochrein H, Keeffe M, Shortman K, Lucas K. 2001. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98: 3376-82
91. Chicha L, Jarrossay D, Manz MG. 2004. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *The Journal of experimental medicine* 200: 1519-24
92. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97: 3333-41

93. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nature Immunology* 8: 1207-16
94. Naik SH, Sathe P, Park H-Y, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, Carotta S, O'Keefe M, Bahlo M, Papenfuss A, Kwak J-Y, Wu L, Shortman K. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature Immunology* 8: 1217-26
95. Schlitzer A, Sivakamasundari V, Chen J, Sumatoh HRB, Schreuder J, Lum J, Malleret B, Zhang S, Larbi A, Zolezzi F, Renia L, Poidinger M, Naik S, Newell EW, Robson P, Ginhoux F. 2015. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nature Immunology* 16: 718-28
96. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95: 3489-97
97. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M. 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunology* 8: 578-83
98. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *The Journal of experimental medicine* 184: 1953-62
99. Belz GT, Nutt SL. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nature Reviews Immunology* 12: 101-13
100. Carotta S, Dakic A, Amico AD, Pang SHM, Greig KT, Nutt SL, Wu L. 2010. The Transcription Factor PU.1 Controls Dendritic Cell Development and Flt3 Cytokine Receptor Expression in a Dose-Dependent Manner. *Immunity* 32: 628-41
101. Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. 2005. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Experimental hematology* 33: 395-402
102. Guerriero A, Langmuir PB, Spain LM, Scott EW. 2000. PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* 95: 879-85
103. Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. 1997. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7: 483-92
104. Allman D, Dalod M, Asselin-Paturel C, Delale T, Robbins SH, Trinchieri G, Biron CA, Kastner P, Chan S. 2006. Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 108: 4025-34
105. Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D. 1995. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 373: 531-6
106. Wu L, Amico A, Winkel KD, Suter M, Lo D, 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: 839-47
107. Ichikawa E, Hida S, Omatsu Y, Shimoyama S, Takahara K, Miyagawa S, Inaba K, Taki S. 2004. Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in

- mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3909-14
108. Suzuki S, Honma K, Matsuyama T, Suzuki K, Toriyama K, Akitoyo I, Yamamoto K, Suematsu T, Nakamura M, Yui K, Kumatori A. 2004. Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8 α - dendritic cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8981-6
 109. Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffolleau E, King CG, Hancock WW, Caamano JH, Hunter CA, Scott P, Turka LA, Choi Y. 2003. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* 19: 353-63
 110. Schiavoni G, Mattei F, Sestili P, Borghi P, Venditti M, Morse HC, Belardelli F, Gabriele L. 2002. ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8 α (+) dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 196: 1415-25
 111. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, Fortin A, Haniffa M, Ceron-Gutierrez L, Bacon CM, Menon G, Trouillet C, McDonald D, Carey P, Ginhoux F, Alsina L, Zumwalt TJ, Kong X-F, Kumararatne D, Butler K, Hubeau M, Feinberg J, Al-Muhsen S, Cant A, Abel L, Chaussabel D, Doffinger R, Talesnik E, Grumach A, Duarte A, Abarca K, Moraes-Vasconcelos D, Burk D, Berghuis A, Geissmann F, Collin M, Casanova J-L, Gros P. 2011. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 365: 127-38
 112. Taylor P, Tamura T, Morse HC, Ozato K. 2008. The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood* 111: 1942-5
 113. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM. 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322: 1097-100
 114. Grajales-Reyes GE, Iwata A, Albring J, Wu X, Tussiwand R, KC W, Kretzer NM, Briseño CG, Durai V, Bagadia P, Haldar M, Schönheit J, Rosenbauer F, Murphy TL, Murphy KM. 2015. Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 α (+) conventional DC clonogenic progenitor. *Nature Immunology* 16: 708-17
 115. Kashiwada M, Pham N-LL, Pewe LL, Harty JT, Rothman PB. 2011. NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 α ⁺ dendritic cell development. *Blood* 117: 6193-7
 116. Hacker C, Kirsch RD, Ju X-S, Hieronymus T, Gust TC, Kuhl C, Jorgas T, Kurz SM, Rose-John S, Yokota Y, Zenke M. 2003. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nature Immunology* 4: 380-6
 117. Schotte R, Rissoan M-C, Bendriss-Vermare N, Bridon J-M, Duhon T, Weijer K, Brière F, Spits H. 2003. The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood* 101: 1015-23
 118. Schotte R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Blom B. 2004. The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *The Journal of experimental medicine* 200: 1503-9
 119. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H,

- Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. 2012. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.
120. Swiecki M, Colonna M. 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* 15: 471-85
 121. Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, Holmberg D, Zweier C, den Hollander NS, Kant SG, Holter W, Rauch A, Zhuang Y, Reizis B. 2008. Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *Cell* 135: 37-48
 122. Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B. 2010. Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 33: 905-16
 123. Li HS, Yang CY, Nallaparaju KC, Zhang H, Liu Y-J, Goldrath AW, Watowich SS. 2012. The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development. *Blood* 120: 4363-73
 124. Ghosh HS, Ceribelli M, Matos I, Lazarovici A, Bussemaker HJ, Lasorella A, Hiebert SW, Liu K, Staudt LM, Reizis B. 2014. ETO family protein Mtg16 regulates the balance of dendritic cell subsets by repressing Id2. *Journal of Experimental Medicine* 211: 1623-35
 125. Ramírez-Domínguez M. 2016. Historical Background of Pancreatic Islet Isolation. *Advances in experimental medicine and biology* 938: 1-9
 126. Karamanou M, Protogerou A, Tsoucalas G, Androutsos G, Poulakou-Rebelakou E. 2016. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World journal of diabetes* 7: 1-7
 127. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. 1922. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Canadian Medical Association journal* 12: 141-6
 128. Noble JA, Erlich HA. 2012. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: a007732
 129. Onengut-Gumuscu S, Chen W-M, Burren O, Cooper NJ, Quinlan AR, Mychaleckyj JC, Farber E, Bonnie JK, Szpak M, Schofield E, Achuthan P, Guo H, Fortune MD, Stevens H, Walker NM, Ward LD, Kundaje A, Kellis M, Daly MJ, Barrett JC, Cooper JD, Deloukas P, Consortium TDG, Todd JA, Wallace C, Concannon P, Rich SS. 2015. Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers. *Nature Publishing Group* 47: 381-6
 130. Ram R, Morahan G. 2017. Effects of Type 1 Diabetes Risk Alleles on Immune Cell Gene Expression. *Genes* 8
 131. Jerram ST, Leslie RD. 2017. The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes. *Genes* 8
 132. Størling J, Pociot F. 2017. Type 1 Diabetes Candidate Genes Linked to Pancreatic Islet Cell Inflammation and Beta-Cell Apoptosis. *Genes* 8
 133. Lincez PJ, Shanina I, Horwitz MS. 2015. Reduced expression of the MDA5 Gene IFIH1 prevents autoimmune diabetes. *Diabetes* 64: 2184-93
 134. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. 2009. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324: 387-9
 135. Mullen Y. 2017. Development of the Nonobese Diabetic Mouse and Contribution of Animal Models for Understanding Type 1 Diabetes. *Pancreas* 46: 455-66

136. Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. 1992. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *The American journal of physiology* 263: E607-14
137. Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. 1997. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. *European Journal of Immunology* 27: 2854-62
138. Jonsson MV, Delaleu N, Jonsson R. 2007. Animal models of Sjögren's syndrome. *Clinical reviews in allergy & immunology* 32: 215-24
139. Anderson MS, Bluestone JA. 2005. THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annual Review of Immunology* 23: 447-85
140. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. 2003. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *The Journal of experimental medicine* 198: 1527-37
141. Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA. 1994. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43: 667-75
142. Serreze DV, Leiter EH, Christianson GJ, Greiner D, Roopenian DC. 1994. Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2m null mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes* 43: 505-9
143. Hamilton-Williams EE, Serreze DV, Charlton B, Johnson EA, Marron MP, Mullbacher A, Slattery RM. 2001. Transgenic rescue implicates beta2-microglobulin as a diabetes susceptibility gene in nonobese diabetic (NOD) mice. 98: 11533-8
144. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews. Disease primers* 3: 17016
145. Saxena V, Ondr JK, Magnusen AF, Munn DH, Katz JD. 2007. The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179: 5041-53
146. Marleau AM, Summers KL, Singh B. 2008. Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180: 5235-49
147. Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F, Lehuen A. 2013. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature Medicine* 19: 65-73
148. Allen JS, Pang K, Skowera A, Ellis R, Rackham C, Lozanoska-Ochser B, Tree T, Leslie RDG, Tremble JM, Dayan CM, Peakman M. 2009. Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture. *Diabetes* 58: 138-45
149. Morelli AE, Thomson AW. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Reviews Immunology* 7: 610-21
150. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 21: 685-711

151. Morel PA. 2013. Dendritic cell subsets in type 1 diabetes: friend or foe? *Frontiers in Immunology* 4: 415
152. Creusot RJ, Giannoukakis N, Trucco M, Clare-Salzler MJ, Fathman CG. 2014. It's time to bring dendritic cell therapy to type 1 diabetes. *Diabetes* 63: 20-30
153. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. 1998. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161: 3912-8
154. Yang M, Charlton B, Gautam AM. 1997. Development of insulinitis and diabetes in B cell-deficient NOD mice. *Journal of Autoimmunity* 10: 257-60
155. Mariño E, Tan B, Binge L, Mackay CR, Grey ST. 2012. B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes. *Diabetes* 61: 2893-905
156. Serreze DV, Prochazka M, Reifsnnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH. 1994. Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *The Journal of experimental medicine* 180: 1553-8
157. Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annual Review of Immunology* 13: 179-200
158. Latek RR, Suri A, Petzold SJ, Nelson CA, Kanagawa O, Unanue ER, Fremont DH. 2000. Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. *Immunity* 12: 699-710
159. Stratmann T, Apostolopoulos V, Mallet-Designe V, Corper AL, Scott CA, Wilson IA, Kang AS, Teyton L. 2000. The I-Ag7 MHC class II molecule linked to murine diabetes is a promiscuous peptide binder. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165: 3214-25
160. Castaño L, Eisenbarth GS. 1990. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annual Review of Immunology* 8: 647-79
161. Schmidt D, Verdaguer J, Averill N, Santamaria P. 1997. A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 186: 1059-75
162. Delovitch TL, Singh B. 1997. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7: 727-38
163. Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner VES, Gonzalez-Munoz A, Clark J, Veijola R, Cubbon R, Chen S-L, Rosa R, Cumiskey AM, Serreze DV, Gregory S, Rogers J, Lyons PA, Healy B, Smink LJ, Todd JA, Peterson LB, Wicker LS, Santamaria P. 2007. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nature genetics* 39: 329-37
164. Hamilton-Williams EE, Martinez X, Clark J, Howlett S, Hunter KM, Rainbow DB, Wen L, Shlomchik MJ, Katz JD, Beilhack GF, Wicker LS, Sherman LA. 2009. Expression of Diabetes-Associated Genes by Dendritic Cells and CD4 T Cells Drives the Loss of Tolerance in Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology* 183: 1533-41
165. Goudy KS, Johnson MC, Garland A, Li C, Samulski RJ, Wang B, Tisch R. 2011. Reduced IL-2 expression in NOD mice leads to a temporal increase in CD62Llo FoxP3+ CD4+ T cells with limited suppressor activity. *European Journal of Immunology* 41: 1480-90

166. Anderson AC, Chandwaskar R, Lee DH, Kuchroo VK. 2008. Cutting edge: the Idd3 genetic interval determines regulatory T cell function through CD11b+CD11c- APC. *The Journal of Immunology* 181: 7449-52
167. McGuire HM, Vogelzang A, Hill N, Flodström-Tullberg M, Sprent J, King C. 2009. Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 19438-43
168. Ueda H, Howson JMM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KMD, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RCJ, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Rønningen KS, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SCL. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423: 506-11
169. Greve B, Vijaykrishnan L, Kubal A, Sobel RA, Peterson LB, Wicker LS, Kuchroo VK. 2004. The diabetes susceptibility locus Idd5.1 on mouse chromosome 1 regulates ICOS expression and modulates murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173: 157-63
170. Esteban LM, Tsoutsman T, Jordan MA, Roach D, Poulton LD, Brooks A, Naidenko OV, Sidobre S, Godfrey DI, Baxter AG. 2003. Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171: 2873-8
171. Jordan MA, Baxter AG. 2008. The genetics of immunoregulatory T cells. *Journal of Autoimmunity* 31: 237-44
172. Chen Y-G, Driver JP, Silveira PA, Serreze DV. 2007. Subcongenic analysis of genetic basis for impaired development of invariant NKT cells in NOD mice. *Immunogenetics* 59: 705-12
173. Serreze DV, Bridgett M, Chapman HD, Chen E, Richard SD, Leiter EH. 1998. Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin. 160: 1472-8
174. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang L-C, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A. 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415: 922-6
175. Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D. 2005. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity* 22: 385-96
176. Liston A, Lesage S, Gray DHD, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM, Crabtree GR, Peng K, Wilson SR, Goodnow CC. 2004. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 21: 817-30
177. Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B, Heger A, Agam A, Slater G, Goodson M, Furlotte NA, Eskin E, Nellåker C, Whitley H, Cleak J, Janowitz D, Hernandez-Pliego P, Edwards A, Belgard TG, Oliver PL, McIntyre RE, Bhomra A, Nicod J, Gan X, Yuan W, Van Der Weyden L, Steward CA, Bala S,

- Stalker J, Mott R, Durbin R, Jackson IJ, Czechanski A, Guerra-Assunção JA, Donahue LR, Reinholdt LG, Payseur BA, Ponting CP, Birney E, Flint J, Adams DJ. 2011. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 477: 289-94
178. Dugas V, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Hillhouse EE, Lesage S. 2010. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity* 35: 23-32
179. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS, Consortium TDG. 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature Publishing Group* 41: 703-7
180. Zekavat G, Mozaffari R, Arias VJ, Rostami SY, Badkerhanian A, Tenner AJ, Nichols KE, Naji A, Noorchashm H. 2010. A novel CD93 polymorphism in non-obese diabetic (NOD) and NZB/W F1 mice is linked to a CD4+ iNKT cell deficient state. *62*: 397-407
181. Johansson ACM, Lindqvist AKB, Johannesson M, Holmdahl R. 2003. Genetic heterogeneity of autoimmune disorders in the nonobese diabetic mouse. *Scandinavian journal of immunology* 57: 203-13
182. Höpken UE, Lehmann I, Droese J, Lipp M, Schüler T, Rehm A. 2005. The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: proliferation versus deletion. *European Journal of Immunology* 35: 2851-63
183. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, Goujard C, Meyer L, Oksenhendler E, Sinet M, Hosmalin A. 2001. Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 98: 3016-21
184. Prasad SJ, Goodnow CC. 2002. Cell-intrinsic effects of non-MHC NOD genes on dendritic cell generation in vivo. *International Immunology* 14: 677-84
185. Suwanai H, Wilcox MA, Mathis D, Benoist C. 2010. A defective Ii15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9305-10
186. Swiecki M, Wang Y, Vermi W, Gilfillan S, Schreiber RD, Colonna M. 2011. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 208: 2367-74
187. Pelletier A-N, Guimont-Desrochers F, Ashton MP, Brodnicki TC, Lesage S. 2012. The Size of the Plasmacytoid Dendritic Cell Compartment Is a Multigenic Trait Dominated by a Locus on Mouse Chromosome 7. *The Journal of Immunology*
188. Li Q, Xu B, Michie SA, Rubins KH, Schreiber RD, McDevitt HO. 2008. Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 12439-44
189. Rowland SL, Riggs JM, Gilfillan S, Bugatti M, Vermi W, Kolbeck R, Unanue ER, Sanjuan MA, Colonna M. 2014. Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *Journal of Experimental Medicine* 211: 1977-91
190. Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. 2007.

- Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature Immunology* 8: 487-96
191. Matta BM, Castellaneta A, Thomson AW. 2010. Tolerogenic plasmacytoid DC. *European Journal of Immunology* 40: 2667-76
 192. Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A, Pachynski R, Nguyen L, Ghodsi A, Adler S, Butcher EC. 2012. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity* 36: 438-50
 193. Burt RA, Watkins L, Tan IKL, Wang N, Quirk F, Mackin L, Morgan P, Zhang J-G, Berzins SP, Morahan G, Brodnicki TC. 2010. An NZW-derived interval on chromosome 7 moderates sialadenitis, but not insulinitis in congenic nonobese diabetic mice. *The Journal of Immunology* 184: 859-68
 194. Van VQ, Lesage S, Bouguermouh S, Gautier P, Rubio M, Levesque M, Nguyen S, Galibert L, Sarfati M. 2006. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *The EMBO journal* 25: 5560-8
 195. Ma A, Malynn BA. 2012. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nature Reviews Immunology* 12: 774-85
 196. Hammer GE, Turer EE, Taylor KE, Fang CJ, Advincula R, Oshima S, Barrera J, Huang EJ, Hou B, Malynn BA, Reizis B, DeFranco A, Criswell LA, Nakamura MC, Ma A. 2011. Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nature Immunology* 12: 1184-93
 197. Bouwens L, Rooman I. 2005. Regulation of pancreatic beta-cell mass. 85: 1255-70
 198. Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. 2000. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* 49: 1-7

AUTRES CONTRIBUTIONS

À titre de premier auteur :

1. **Pelletier A.N.**, Aliesky H., Banuelos B., Dexheimer P., Chabot-Roy G., Rapoport B., Lesage S. and McLachlan S.M. , “Evidence that MHC I-E dampens thyroid autoantibodies and prevents spreading to a second thyroid autoantigen in I-A^k NOD mice”, *Genes and Immunity*, 2015, **PubMed ID** 25811933
2. **Pelletier A.N.**, Guilbault L., Guimont-Desrochers F., Hillhouse E.E., Lesage S., Nk cell proportion and number are influenced by genetic loci on chromosomes 8, 9 and 17, *Journal of Immunology*, 2016, **PubMed ID** 26851217
3. Chognard G*, Bellemare L*, **Pelletier A.N.***, Dominguez-Punaro MC, Beauchamp C, Guyon MJ, Charron G, Morin N, Sivanesan D, Kuchroo V, Michnick S, Chemtob S, Rioux J and Lesage S. “IL12R and IL23R expression pattern elucidates the dichotomous role for IL-12 and IL-23 pathways in intestinal inflammation”. *PLoS One.* , volume 9 no.2, e890292 pp. 1-15, Feb 2014 **PubMed ID** 24586521 ***Authors contributed equally to this work**

À titre de coauteur :

4. Collin, R., St-Pierre, C., Guilbault L., Mullins-Dansereau V., Policheni A., Guimont-Desrochers F, **Pelletier A.N.**, Gray DH., Drobetsky E., Perreault, C., Hillhouse E., Lesage S., “An unbiased linkage approach reveals that the p53 pathway is coupled to NK cell maturation”, *Journal of Immunology*, 2017, **PubMed ID** 28710252
5. Collin R., Dugas V., **Pelletier A.N.**, Chabot-Roy G., Lesage S., “The mouse *Idd2* locus is linked to the proportion of immunoregulatory double-negative T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance.”, *Journal of Immunology*, volume 193 no.7, pp. 3503-3512 October 2014. **PubMed ID** 25165153
6. Dugas V., Liston A., Hillhouse E., Chabot-Roy G., Beauchamp C., Collin R., **Pelletier A.N.**, Hardy K., Lesage S. “*Idd13* is involved in determining immunoregulatory DN T cell number in NOD mice”, *Genes and Immunity*, , volume 15 no.2, pp. 82-87, March 2014. **PubMed ID** 24335706

