

Université de Montréal

**Régulation de la production d'interleukine-12 par les
monocytes humains**

Par

Marie-Noëlle Avice

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

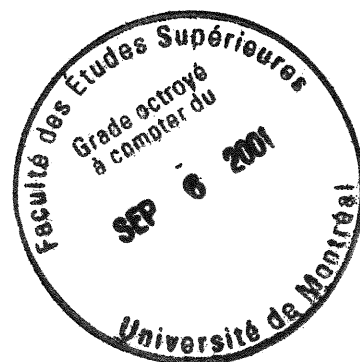
en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D)

en Microbiologie et Immunologie

Avril 2001

© Marie-Noëlle Avice, 2001



W

4

U58

2001

1.087



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

**Régulation de la production d'interleukine-12 par les
monocytes humains**

Présentée par

Marie-Noëlle Avice

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury: Dr. Jacques Thibodeau

Membre du jury: Dr. Sophie Laberge

Examineur externe: Dr. Lucie Lamontagne

Directeur de recherche: Dr. Marika Sarfati

Codirecteur: Dr. Guy Delespesse

SOMMAIRE

L'interleukine-12 est une cytokine qui possède plusieurs activités biologiques très importantes dans l'immunité innée et acquise. Au cours de ce travail de doctorat, nous avons étudié le rôle de trois molécules dont une soluble, l'IL-15, et deux membranaires, le LAG-3 et le CD47, dans la régulation de la production d'IL-12 chez l'homme.

Dans un système expérimental de cocultures de lymphocytes T et de monocytes autologues, nous avons démontré qu'en présence d'IL-15, les lymphocytes T CD4⁺CD154⁺ prolifèrent et lient le CD40 exprimé à la surface des monocytes, permettant de déclencher la production d'IL-12 par ces derniers. L'IL-12 agit à son tour sur les lymphocytes T CD4⁺ en induisant la sécrétion d'IFN- γ . Cette production endogène d'IL-12, en réponse à l'IL-15 exogène, dépend principalement de l'interaction CD40-CD154. De plus, une absence de sécrétion d'IL-12 est constatée lorsque les monocytes sont cocultivés avec des lymphocytes T CD8⁺CD154⁻.

Il a été rapporté dans la littérature que la liaison du CMH de classe II par un anticorps monoclonal induit la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques. Nous avons alors postulé que l'interaction de LAG-3 avec son ligand naturel, le CMH de classe II, pourrait représenter un second mécanisme utilisé par les lymphocytes T, en plus de l'interaction du CD154 avec le CD40 exprimé à la surface des monocytes et des cellules dendritiques, pour induire la production d'IL-12 par ces deux types cellulaires. Nos résultats démontrent une inhibition de la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ suite à l'addition d'un anticorps monoclonal neutralisant anti-LAG-3 dans notre modèle de cocultures de lymphocytes T et de monocytes autologues en présence d'IL-2. Nous avons également observé que la protéine de fusion LAG-

3Ig costimule la production d'IL-12, en réponse à des doses suboptimales de CD154 soluble, par les monocytes alors que cette même protéine de fusion induit directement la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques.

Notre travail sur le CD47 peut être divisé en deux parties. Dans le premier volet, nous avons démontré que l'engagement du CD47 par un anticorps monoclonal, par son ligand naturel, la thrombospondine (TSP), ou encore par le peptide 4N1K (peptide représentant la partie carboxy-terminale de la TSP qui lie sélectivement le CD47) inhibe de façon spécifique et sélective la production d'IL-12 par les monocytes. Sachant que l'IL-12 joue un rôle fondamental dans la différenciation Th1, nous avons alors, dans le deuxième volet de ce travail, postulé que l'engagement du CD47 inhibe la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1. Nous avons développé un modèle expérimental de différenciation des lymphocytes T naïfs à partir de cellules mononucléées isolées du sang de cordon ombilical. Nos résultats montrent que l'engagement du CD47 supprime la réponse des lymphocytes T naïfs à l'IL-12 exogène, en inhibant l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12, et empêche ainsi leur maturation en effecteurs de type Th1 sans induire leur différenciation en effecteurs de type Th2. Cette suppression résulte d'une inhibition initiale de la synthèse d'IL-2 par les lymphocytes T naïfs.

En conclusion, l'étude de ces trois molécules a permis de démontrer que l'IL-15 et le LAG-3 sont des régulateurs positifs de la production d'IL-12 chez l'homme. Par contre, le CD47 supprime non seulement la synthèse d'IL-12, mais aussi la réponse des lymphocytes T naïfs à cette cytokine.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xvii
INTRODUCTION	
1. Interleukine-12.....	2
1.1 Découverte.....	2
1.2 Caractéristiques structurales.....	2
1.3 Récepteurs.....	3
1.4 Origine cellulaire et régulation.....	5
1.5 Fonctions.....	8
1.6 IL-12 et pathologies.....	12
2. Interleukine-15.....	14
2.1 Généralités.....	14
2.2 Structure et récepteurs.....	15
2.3 Source et régulation.....	17
2.4 Fonctions.....	18
3. LAG-3.....	20
3.1 Structure et ligand.....	20
3.2 Expression cellulaire et tissulaire.....	21
3.3 Fonctions.....	23

4. CD47.....	24
4.1 Structure et récepteurs.....	24
4.2 Expression cellulaire et fonctions.....	25

RÉSULTATS

Article 1

«IL-15 Promotes IL-12 Production by Human Monocytes Via T Cell- Dependent Contact and May Contribute to IL-12-Mediated IFN- γ Secretion by CD4 ⁺ T Cells in the Absence of TCR Ligation».....	32
---	----

Article 2

«Lymphocyte Activation Gene-3, a MHC Class II Ligand Expressed on Activated T Cells, Stimulates TNF- α and IL-12 Production by Monocytes and Dendritic Cells».....	42
---	----

Article 3

«CD47 Ligation Selectively Downregulates Human Interleukin 12 Production».....	50
---	----

Article 4

«CD47 Ligation Selectively Inhibits the Development of Human Naive T Cells into Th1 Effectors».....	59
--	----

DISCUSSION.....	68
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	94
BIBLIOGRAPHIE.....	97
ANNEXES.....	xx

LISTE DES TABLEAUX

RÉSULTATS

Article 1

Table I: IL-15 or IL-2 promotes IL-12 secretion in CD4⁺ T cell
monocyte cocultures.....34

Table II: IL-12 and IFN- γ production induced by IL-15 or IL-2
depends upon T cell/monocyte contact and CD40/CD154
interactions.....35

Article 2

Table I: Anti-LAG-3 Ab inhibits IFN- γ production by T cells induced
without TCR-CD3 engagement.....45

Table II: Specific inhibition of LAG-3Ig-induced cytokine production
by anti-LAG-3 Ab.....46

Article 3

Table I: TSP selectively inhibits IL-12 production by monocytes.....52

Article 4

Table I: Cytokine profiles of CD47-primed cells in Th1 or Th2
conditions.....61

ANNEXES

Annexe 2

Table I: Profil des cytokines des lymphocytes T effecteurs pré-traités à l'anti-CD47.....	xxi
Table II: L'engagement du CD47 inhibe la réponse des lymphocytes T à l'IL-2 lors de la phase d'expansion.....	xxii

LISTE DES FIGURES

RÉSULTATS

Article 1

- Figure 1: IL-15- or IL-2-induced IFN- γ secretion by unfractionated T lymphocytes is IL-12-dependent.....33
- Figure 2: CD4⁺ but not CD8⁺ T lymphocytes promote IL-12 and IFN- γ secretion in the presence of IL-15 or IL-2.....34
- Figure 3: IL-15 and IL-2 up-regulate CD40 expression on monocytes but not CD154 expression on CD4⁺ T cells.....35
- Figure 4: IL-12-mediated IFN- γ production by CD4⁺ T cells is partly IL-15-dependent.....36
- Figure 5: IL-15 up-regulates IL-12R β 1 expression on CD4⁺ T lymphocytes.....36
- Figure 6: Regulatory effect of IL-15, IL-2, and IL-12 on proliferation and IFN- γ production by purified CD4⁺ T lymphocytes.....37
- Figure 7: IFN- γ secretion by IL-15 and IL-12-stimulated purified CD4⁺ T cells is increased by contact with monocytes.....37

Article 2

- Figure 1: Induction of LAG-3 expression on T cells in the absence of TCR engagement.....43
- Figure 2: Inhibition of T-monocyte interaction by a blocking anti-LAG-3 mAb.....44
- Figure 3: Inhibition of T cell response to IL-12 by anti-LAG-3 mAb.....44
- Figure 4: Comparison between MHC class II expression and LAG-3Ig binding.....44
- Figure 5: LAG-3Ig induces TNF- α release and costimulates CD40L-induced IL-12 production by human monocytes.....45
- Figure 6: LAG-3Ig only costimulates IL-12 production induced by suboptimal doses of sCD40L.....45
- Figure 7: LAG-3Ig induces TNF- α and IL-12 production by monocyte-derived DCs.....46

Article 3

- Figure 1: CD47 mAb selectively inhibits IL-12 release by purified monocytes.....52

Figure 2: 4N1K selectively suppresses the production of IL-12 by monocytes.....53

Figure 3: Suppression of IL-12 production by CD47 mAb is Fc and Ca²⁺ independent.....53

Figure 4: PI 3-K inhibitors restore IL-12 production.....54

Article 4

Figure 1: CD47 mAb inhibits Th1 development with no immune deviation towards Th2.....60

Figure 2: CD47 mAb-mediated inhibition of Th1 development is CD47 specific and not Fc mediated.....61

Figure 3: CD47 ligation impairs Th1 development without inducing cell death.....62

Figure 4: CD47 ligation inhibits the response of naive T cells to IL-12 and their development into IFN- γ -producing cells.....63

Figure 5: Exogenous IL-2, added at priming, restores IL-12R β 2 expression and Th1 development.....64

DISCUSSION

Figure 1: Régulation de la production d'IL-12 par l'IL-15, le LAG-3 et le CD47.....	93
---	----

ANNEXES

Annexe 1

Figure 1: Effet régulateur de l'IL-15, l'IL-2 et l'IL-12 sur la prolifération et la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8 ⁺ hautement purifiés.....	xx
---	----

Annexe 2

Figure 1: L'engagement du CD47 inhibe la production d'IL-2 par les lymphocytes T effecteurs.....	xxiii
Figure 2: L'engagement du CD47 inhibe la prolifération des lymphocytes T effecteurs.....	xxiv
Figure 3: L'engagement du CD47 inhibe la réponse des lymphocytes T effecteurs à l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-12 exogène.....	xxv
Figure 4: L'engagement du CD47 inhibe la production d'IL-2 dans la culture primaire.....	xxvi

- Figure 5: L'engagement du CD47 inhibe la réponse à l'IL-2 dans la culture primaire.....xxvii
- Figure 6: L'engagement du CD47 induit l'anergie de façon indépendante à l'IL-10 endogène.....xxviii
- Figure 7: L'anergie induite par l'engagement du CD47 est complètement restaurée par l'IL-2 ou l'IL-4, mais pas l'IL-7, exogène.....xxix
- Figure 8: L'anergie induite par l'engagement du CD47 est largement restaurée par une costimulation CD28.....xxx

ABRÉVIATIONS

4N1K	: Peptide représentant la partie carboxy-terminale de la thrombospondine
A2a receptors	: Récepteurs de type A2a pour l'adénosine
Ac	: Anticorps
Acm	: Anticorps monoclonal
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMPC	: Adénosine 3', 5' -monophosphate cyclique
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
BCG	: Bacille de Calmette-Guérin
C5a	: Petit fragment du composant C5 du complément
CBMC	: Cellules mononucléées du sang de cordon ombilical
CD	: Classe (syn.: marqueur) de différenciation
CD40L	: Ligand du CD40 (identique à CD154)
CD ^{hi}	: Classe (syn.: marqueur) de différenciation exprimée fortement
Cellule NK	: Cellule tueuse naturelle
CGRP	: Peptide alternatif du gène de la calcitonine
CLMF	: Facteur de maturation de la cytotoxicité lymphocytaire
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	: Cellule présentatrice de l'antigène
CpG	: Motif cytosine-guanine d'ADN bactérien
CR-	: Récepteur pour le complément
CTLA-4	: Antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques
CTLL	: Lignée de lymphocytes T cytotoxiques

DR	: Sous-classe DR du CMH de classe II
Fc	: Partie constante des immunoglobulines
Fc γ -R	: Récepteur de la portion Fc d'une immunoglobuline G
G-CSF	: Facteur stimulant les colonies de granulocytes
GM-CSF	: Facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages
Gp	: Glycoprotéine
HHV-	: Virus de l'herpès humain
HTLV-1	: Virus humain T lymphotrope de type 1
ICAM-	: Molécule d'adhésion intercellulaire
IFN-	: Interféron
IL-	: Interleukine
IL-12 p35	: Sous-unité p35 de l'IL-12
IL-12 p40	: Sous-unité p40 de l'IL-12
IL-12R	: Récepteur à l'IL-12
kD	: Kilodalton
LAG-3	: Gène d'activation des lymphocytes -3
LAG-3Ig	: Protéine de fusion "LAG-3Ig" soluble
LAK	: Cellule cytotoxique activée par les lymphokines
LDL	: Lipoprotéine de faible densité
LFA-	: Molécule d'adhésion leucocytaire
LIF	: Facteur inhibiteur des leucémies
LPS	: Lipopolysaccharide bactérien
MCP-	: Protéine chémoattractante des macrophages
MIP-	: Protéine inflammatoire des macrophages
NF- κ B	: Facteur de transcription nucléaire kappa B
NKSF	: Facteur de stimulation des cellules NK

NOD	: Diabétique non obèse
(p40) ₂	: Homodimère de la sous-unité p40 de l'IL-12
PACAP	: Polypeptide activant l'adénylate cyclase
PBMC	: Cellules mononucléées du sang périphérique
PGE ₂	: Prostaglandine E ₂
PHA	: Phytohémagglutinine
PMA	: Phorbol-12-myristate-13-acétate
Poly(I:C)	: Acide polyribonoinosinique polyribocytidylique
SAC	: <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I
SCF	: Facteur de croissance des cellules souches hématopoïétiques
SD	: Déviation standard
SEM	: Erreur standard sur la moyenne
STAT	: Molécule intracellulaire impliquée dans la transduction du signal et l'activation de la transcription
TCR	: Récepteur antigénique des lymphocytes T
TGF-β	: Facteur de croissance transformant-β
Th	: Lymphocyte T collaborateur ("helper")
TIL	: Lymphocyte infiltrant une tumeur
TNF-α	: Facteur de nécrose tumorale-α
TSP	: Thrombospondine
TSST-1	: Superantigène de <i>Staphylococcus aureus</i> causant le syndrome du choc toxique
VIP	: Peptide vasoactif intestinal

REMERCIEMENTS

J'aimerais grandement remercier mes directeur et codirecteur de thèse, Dr. Marika Sarfati et Dr. Guy Delespesse, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et pour m'avoir si généreusement encadrée de façon à me donner toutes les possibilités de m'épanouir scientifiquement. Merci beaucoup...

Également, un merci tout spécial pour Manu avec qui rires et confidences m'ont accompagnée tout au long de ces cinq années. Cette complicité, je ne l'oublierai jamais....

Je m'en voudrais de passer sous silence les gens que j'ai cotoyés et avec qui les effusions de rires, les encouragements, etc.... etc...., ont façonné la vie de ce laboratoire. Merci à: Christian Demeure, Patrice Hermann, Myriam Armant, Véronique Matéo, Hiroyuki Tanaka et Norma Del Bosco.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers mes parents qui, depuis que je suis toute jeune, m'ont poussée et m'ont continuellement encouragée dans les bons comme dans les durs moments à atteindre les objectifs que je m'étais fixés.

Finalement, un plus que grand merci du fond du coeur à mon "mari chéri d'amour", Huy, qui a su si patiemment m'encourager et me supporter dans le long cheminement de mes études. D'ailleurs, ce parcours se termine par deux beaux événements.... n'est-ce pas, Huy ?

À mes parents,

À Huy,

INTRODUCTION

Le thème de ma thèse porte sur la régulation de la production d'interleukine-12 chez l'homme. Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié l'implication de trois molécules soit l'IL-15, le LAG-3 et le CD47 sur la synthèse d'IL-12 par les cellules présentatrices de l'antigène. Par conséquent, la section *Introduction* fera une revue de la littérature sur ces molécules avec une emphase particulière sur l'IL-12.

1. Interleukine-12

1.1 Découverte

Décrite simultanément par deux groupes indépendants, l'IL-12 a été originellement identifiée comme un facteur produit par une lignée humaine de lymphocytes B, transformés par le virus Epstein-Barr. Le premier groupe (Gately *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1988; Stern *et al.*, 1990) a démontré que l'IL-12, en synergie avec l'IL-2, induit la maturation de lymphocytes T cytotoxiques et de cellules LAK. Au même moment, un second groupe rapportait que l'IL-12 augmente la cytotoxicité cellulaire médiée par les cellules NK et induit la sécrétion d'IFN- γ par ces dernières (Kobayashi *et al.*, 1989). Les termes CLMF (Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor) et NKSF (Natural Killer cell Stimulatory Factor) ont aussi été utilisés pour décrire cette cytokine.

1.2 Caractéristiques structurales

L'IL-12 est un hétérodimère composé de deux chaînes structurellement non apparentées et reliées par un pont disulfure: p35 (\pm 35 kD) et p40 (\pm 40 kD) (Kobayashi *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1990). La synthèse d'IL-12 bioactive résulte de

l'assemblage intracellulaire de ces sous-unités (Gubler *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991), codées par des gènes distincts qui sont situés sur les chromosomes 3 et 5 chez l'homme (Sieburth *et al.*, 1992) et 3 et 11 chez la souris (Tone *et al.*, 1992). La régulation de la transcription des chaînes p35 et p40 est largement indépendante. Le gène codant pour p40 est exprimé uniquement dans les cellules sécrétant de l'IL-12 alors que le gène du p35 est faiblement exprimé de manière ubiquitaire (D'Andrea *et al.*, 1992; Kubin *et al.*, 1994). La synthèse de ces deux chaînes résulte principalement d'une régulation au niveau transcriptionnel. En effet, le promoteur de l'IL-12 p40 contient de multiples sites de liaison pour des facteurs de transcription incluant les éléments Ets, NF- κ B et C/EBP (Murphy *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Plevy *et al.*, 1997). Des sites semblables et potentiels existent aussi dans la région promotrice du gène codant pour l'IL-12 p35 tels que les éléments GAS, ICSBP, ISRE et NF- κ B (Tone *et al.*, 1996; Yashimoto *et al.*, 1996). Les cellules produisant de l'IL-12 synthétisent et sécrètent un large excès (10 à 100X) de p40 libre, monomérique ou homodimérique, qui chez l'homme est dénué d'activité biologique (Kubin *et al.*, 1994; Ling *et al.*, 1995). Il a été démontré que l'homodimère p40 agit plutôt comme antagoniste de la réponse à l'IL-12 *in vitro* et *in vivo* (Gillissen *et al.*, 1995; Gately *et al.*, 1996; Heinzl *et al.*, 1997).

1.3 Récepteurs

Le récepteur à l'IL-12 est composé de deux unités soit les chaînes β 1 et β 2 qui sont apparentées à la chaîne gp130 du récepteur à l'IL-6 et aux récepteurs du LIF et du G-CSF (Stahl and Yancopoulos, 1993; Chua *et al.*, 1994; Presky *et al.*, 1995; Presky *et al.*, 1996). L'expression sélective de l'IL-12R sur les lymphocytes T activés et les cellules NK (Chizzonite *et al.*, 1992; Desai *et al.*, 1992) rend compte de trois activités biologiques essentielles de cette interleukine sur ces cellules: (1) stimulation de la

prolifération (Kobayashi *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1990; Gately *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1992), (2) induction de la production d'IFN- γ (Kobayashi *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991; Gately *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1994) et (3) facilitation de la cytotoxicité lymphocytaire (Kobayashi *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1992; Chouaib *et al.*, 1994). Tandis que les deux chaînes $\beta 1$ et $\beta 2$ sont responsables d'engager l'IL-12, seule la chaîne $\beta 2$ semble essentielle pour médier la transduction du signal intracellulaire (Gately *et al.*, 1998). La liaison de l'IL-12 à son récepteur induit rapidement l'activation des tyrosines kinases Jak 2 et Tyk 2 ainsi que la phosphorylation des facteurs de transcription STAT 3 et STAT 4 (Bacon *et al.*, 1995a; Bacon *et al.*, 1995b; Jacobson *et al.*, 1995). Une étude récente de Ahn *et al.* (1998) a tenté d'associer différents composants de cette signalisation intracellulaire à deux fonctions de l'IL-12. Plus précisément, les combinaisons Jak 2-STAT 5 et Tyk 2-STAT 4 seraient impliquées dans l'induction de la prolifération et de la production d'IFN- γ , respectivement. Cependant, des expériences avec des souris déficientes en STAT 4 ont démontré que l'activation de ce facteur de transcription par l'IL-12 est nécessaire pour induire les activités biologiques de cette cytokine, incluant la prolifération (Kaplan *et al.*, 1996; Thierfelder *et al.*, 1996). Une étude publiée depuis peu montre que le récepteur à l'IL-12 est également présent sur les neutrophiles et que sa liaison s'accompagne d'une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire, de la polymérisation de l'actine, de la phosphorylation de tyrosines et de la production de métabolites hautement réactifs (Collison *et al.*, 1998). Récemment, il a été rapporté que l'IL-12 peut aussi agir directement sur les cellules dendritiques en utilisant un récepteur quelque peu différent de celui exprimé sur les cellules T et NK puisqu'il est composé d'un isoforme de la chaîne $\beta 1$ associé à une chaîne $\beta 2$ (Grohmann *et al.*, 1998). De plus, la transduction du

signal via ce récepteur implique l'activation de molécules de la famille NF- κ B, telles que RelB et p50, plutôt que de la famille STAT (Grohmann *et al.*, 1998).

1.4 Origine cellulaire et régulation

L'IL-12 est essentiellement produite par des cellules appartenant à la première ligne de défense de l'organisme. Les cellules de la lignée des monocytes/macrophages telles que les monocytes (D'Andrea *et al.*, 1992), les macrophages (Hsieh *et al.*, 1993), les cellules de Kupffer (Takahashi *et al.*, 1996), les cellules mésangiales (Bussolati *et al.*, 1999) et les cellules gliales incluant la microglie (Park and Shin, 1996) et les astrocytes (Stalder *et al.*, 1997) contribuent toutes à sécréter de l'IL-12 en réponse à différents stimuli. D'autres cellules du système immunitaire innée comme les polymorphonucléaires neutrophiles et éosinophiles (Cassatella *et al.*, 1995; Nutku *et al.*, 2000), les mastocytes murins (Smith *et al.*, 1994) et les kératinocytes (Muller *et al.*, 1994) ont aussi la capacité de produire cette cytokine. Par contre, ce sont les cellules dendritiques (Macatonia *et al.*, 1995; Sousa *et al.*, 1997) et les cellules de Langerhans (Kang *et al.*, 1996) qui représentent les CPA les plus importantes en ce qui a trait à la production d'IL-12. Jusqu'à maintenant, quatre mécanismes principaux ont été décrits pour induire la sécrétion d'IL-12 par les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Premièrement, un grand nombre de pathogènes intracellulaires vivants ou tués induisent directement la production d'IL-12 par les CPA. Parmi ceux-ci, les plus connus sont les parasites *Leishmania major* et *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1993; Heinzl *et al.*, 1993; Sypek *et al.*, 1993; Gazzinelli *et al.*, 1994; Reiner *et al.*, 1994), les bactéries *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium tuberculosis* (Hsieh *et al.*, 1993; Tripp *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 1995) et certains virus comme le cytomégalovirus murin (Orange and Biron, 1996) et le virus de l'influenza (Monteiro *et*

al., 1998; Saurwein-Teissl *et al.*, 1998). Les produits microbiens contribuent également à induire la sécrétion de cette cytokine pro-inflammatoire comme le LPS des bactéries gram⁻ (Baron *et al.*, 1993) et l'acide lipotéichoïque des bactéries gram⁺ (Cleveland *et al.*, 1996) lorsqu'ils interagissent avec les récepteurs de la famille TLR (Toll-like receptors) (Brightbill *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999). Les superantigènes d'origine bactérienne tels que l'entérotoxine B ou le TSST-1 du staphylocoque (Lester *et al.*, 1995; Haskó *et al.*, 1998b), les ADN bactériens contenant des motifs nucléotidiques CpG non méthylés (Klinman *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996) et le poly(I:C), un ARN double-brin synthétique souvent utilisé dans les modèles d'infections virales (Verdijk *et al.*, 1999), sont d'autres dérivés d'agents infectieux capables de déclencher la production d'IL-12. Il avait été décrit que d'autres micro-organismes comme *Mycobacterium bovis* BCG n'induisent la sécrétion d'IL-12 qu'en présence d'IFN- γ (Flesch *et al.*, 1995; Kaufmann *et al.*, 1995). Dans ce dernier cas, la production initiale d'IFN- γ était donc indépendante de l'IL-12 et semblait provenir des cellules T NK1⁺ (Hayakawa *et al.*, 1992; Arase *et al.*, 1993; Arase *et al.*, 1996). Récemment, il a été cependant démontré que bien que les cellules T NK1⁺ sont de puissantes productrices d'IL-4 et peuvent promouvoir une réponse immunitaire à médiation cellulaire de type Th2, une déviation vers la sécrétion d'IFN- γ est observée suite à une infection avec *M. bovis* et ceci à travers la production d'IL-12 endogène (Emoto *et al.*, 1999). D'ailleurs, une autre étude montre que ces cellules expriment de façon constitutive le récepteur à l'IL-12 et jouent un rôle critique dans la production d'IFN- γ et dans l'initiation des réponses protectrices de type Th1 (Kawamura *et al.*, 1998). Lors d'infections avec *M. bovis*, il est également suggéré qu'en plus des cellules T NK1⁺, les macrophages pulmonaires représentent une seconde source de cellules sécrétrices d'IFN- γ , lequel est strictement produit en réponse à l'IL-12 endogène (Wang *et al.*, 1999). Deuxièmement, il est possible de déclencher la synthèse d'IL-12 lors d'une

inflammation et ce, indépendamment d'une infection active ou d'une réponse immunitaire. En effet, il a été démontré que l'interaction de certains constituants de la matrice extracellulaire tels que les petits fragments de l'acide hyaluronique induisent la production d'IL-12 par les macrophages en se liant à la molécule adhésive de surface CD44 (Hodge-Dufour *et al.*, 1997). Les deux derniers mécanismes impliqués dans la production d'IL-12 par les monocytes et les cellules dendritiques relèvent de l'interaction de ces cellules avec les lymphocytes T. L'un exige une interaction nécessitant l'engagement du TCR comme par exemple dans le cas où les CPA présentent le complexe CMH de classe II-peptide antigénique au TCR des lymphocytes T, lequel est spécifique pour le peptide immunogénique, (Grewall *et al.*, 1995; DeKruyff *et al.*, 1997) ou encore lorsque des lymphocytes T activés par un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD3 interagissent avec des CPA (Shu *et al.*, 1995). Ce dernier cas est un phénomène qui a été décrit pour la première fois dans notre laboratoire et qui résulte de la liaison du CD40 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène par le CD154 exprimé sur les lymphocytes T activés (Shu *et al.*, 1995). L'autre mécanisme, décrit par une de mes collègues, sous-tend une interaction qui a lieu en absence d'engagement du TCR et qui implique aussi l'association CD40-CD154 (Armant *et al.*, 1996). La production d'IL-12 en réponse à des stimuli microbiens ou aux lymphocytes T activés ou non par l'engagement du TCR est étroitement régulée par une multitude de molécules solubles ou membranaires qui seront décrites dans la section *Discussion* de cette thèse à l'exception de l'IL-15, du LAG-3 et du CD47 qui seront abordés dans la présente section.

1.5 Fonctions

L'IL-12 joue un rôle essentiel dans l'immunité naturelle et acquise. Les cibles principales de cette cytokine sont les lymphocytes T activés et les cellules NK dans lesquelles elle induit la synthèse de cytokines, stimule la prolifération et augmente l'activité cytotoxique (Kobayashi *et al.*, 1989; Gately *et al.*, 1994). Parmi les cytokines induites par l'IL-12, l'IFN- γ prédomine (Chan *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1992). Cependant, d'autres facteurs solubles comme le TNF- α (Naume *et al.*, 1992; Perussia *et al.*, 1992; Aste-Amezaga *et al.*, 1994; Nastala *et al.*, 1994), le GM-CSF (Naume *et al.*, 1993; Aste-Amezaga *et al.*, 1994), l'IL-2 (Perussia *et al.*, 1992) et l'IL-8 (Naume *et al.*, 1993) peuvent aussi être produits en réponse à l'IL-12. De façon surprenante, l'IL-12 est également capable d'induire la synthèse d'IL-10 *in vivo* et *in vitro* (Morris *et al.*, 1994; Daftarian *et al.*, 1996; Jeannin *et al.*, 1996; Meyaard *et al.*, 1996). Étant donné que l'IL-10 elle-même supprime la sécrétion d'IL-12 et la réponse des cellules à cette interleukine (D'Andrea *et al.*, 1993; Tripp *et al.*, 1993), l'habileté de l'IL-12 à induire la production d'IL-10 pourrait représenter un mécanisme de rétro-contrôle négatif de sa production et de ses effets biologiques. L'IL-12 est aussi un facteur de croissance pour les lymphocytes T activés et les cellules NK (Kobayashi *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1990; Gately *et al.*, 1991; Gubler *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991; Perussia *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1992) et synergise entre autres avec le SCF pour induire la prolifération et la différenciation des cellules souches du système hématopoïétique (Jacobsen *et al.*, 1993; Bellone *et al.*, 1994; Hirayama *et al.*, 1994). L'activité cytotoxique des cellules NK et LAK (Kobayashi *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1990; Gately *et al.*, 1992; Naume *et al.*, 1992; Gately *et al.*, 1994) ainsi que celle des lymphocytes T

cytotoxiques est augmentée en présence d'IL-12 (Gately *et al.*, 1992; Chouaib *et al.*, 1994; Gately *et al.*, 1994).

Dans les quelques heures suivant le début d'une infection, de nombreux pathogènes induisent directement une production précoce d'IL-12 par les phagocytes (Romani *et al.*, 1997); à son tour l'IL-12 stimule la production d'IFN- γ par les cellules NK (Kobayashi *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1991), lequel, avec l'aide d'autres cytokines, amplifie la production d'IL-12 et stimulent la bactéricidie, la phagocytose, la respiration oxydative et la production de monoxyde d'azote par les phagocytes (Trinchieri and Gerosa, 1996). Ainsi, en plus des nombreuses activités énoncées plus haut, l'IL-12 joue un rôle actif comme cytokine pro-inflammatoire en réponse à diverses infections. Lorsque tel est le cas, elle permet donc de contrôler la multiplication des pathogènes dans les stades précoces du traumatisme juste avant l'établissement d'une réponse immunitaire spécifique à médiation cellulaire. Bien que cet état inflammatoire induit par l'IL-12 est de première importance dans l'immunité naturelle aux infections, des conséquences pathologiques peuvent survenir si l'IL-12 est produite de façon incontrôlée. Des régulateurs négatifs comme l'IL-10 et le TGF- β existent pour restreindre la sécrétion d'IL-12 et/ou la réponse des cellules à l'IL-12 (D'Andrea *et al.*, 1993; Cassatella *et al.*, 1995; Hunter *et al.*, 1995; Trinchieri and Gerosa, 1996; Gorham *et al.*, 1998).

L'IL-12 produite lors des réponses inflammatoires précoces aux infections influence profondément les caractéristiques de la réponse immunitaire cellulaire acquise qui s'ensuit. En effet, l'IL-12 permet la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers un phénotype bien déterminé. De concert avec l'IFN- γ sécrété par les cellules NK chez la souris, l'IL-12 induit la maturation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules

effectrices de type Th1 (Heinzel *et al.*, 1993; Hsieh *et al.*, 1993; Manetti *et al.*, 1993; Seder *et al.*, 1993; Sypek *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1994b; Marshall *et al.*, 1995; Magram *et al.*, 1996; Mattner *et al.*, 1996). Contrairement aux cellules NK, les lymphocytes T au repos n'expriment pas la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 (Presky *et al.*, 1995; Gazzinelli, 1996) ce qui implique qu'avant qu'il y ait toute forme de différenciation vers un phénotype donné, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs doivent être activés suite à l'interaction avec le complexe CMH de classe II-peptide immunogénique et les molécules de costimulation de telle sorte qu'ils seront alors aptes à sécréter de l'IL-2, laquelle induira l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 sur ces cellules (Chang *et al.*, 2000). L'IL-12 présente localement pourra alors directement permettre la maturation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en effecteurs de type Th1 chez l'homme et inhiber la différenciation de ces cellules naïves en effecteurs de type Th2 (Manetti *et al.*, 1994; Trinchieri and Scott, 1994; Gavett *et al.*, 1995). Cette suppression du développement Th2 est due en partie à l'effet inhibiteur de l'IFN- γ . Les effecteurs Th1, par leur production d'IFN- γ et de lymphotoxine, sont responsables de diriger l'immunité à médiation cellulaire lors de l'élimination des pathogènes intracellulaires (Mosmann *et al.*, 1986; Sher and Coffman, 1992). Par opposition, les effecteurs Th2, dont la maturation est initiée non pas par l'IL-12, mais bien par l'IL-4, sécrètent entr'autres de l'IL-4 et de l'IL-5, lesquelles ont un rôle dans le développement de l'immunité humorale (Mosmann and Coffman, 1989). Bien qu'habituellement l'IL-12 promeut l'initiation d'une réponse cellulaire spécifique de type Th1, certains modèles expérimentaux ont montré que cette cytokine peut également augmenter les réponses de type Th2 (Schmitt *et al.*, 1994a; Wu *et al.*, 1994; Germann *et al.*, 1995b; Germann *et al.*, 1995c; Jeannin *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1995; Wynn *et al.*, 1995; Bliss *et al.*, 1996) et servir d'adjuvant pour l'immunité humorale (Germann *et al.*, 1995a; Germann *et al.*, 1995c). En plus de contribuer positivement à

l'initiation de certaines réponses Th2, l'IL-12 est aussi capable de dévier le phénotype Th2 déjà établi vers un phénotype Th1 tel que démontré dans le modèle de la leishmaniose (Nabors *et al.*, 1995).

Brièvement mentionné ci-haut, l'IL-12 peut être utilisée comme adjuvant dans l'immunité à médiation humorale, c'est-à-dire qu'elle possède la capacité d'augmenter la synthèse de certaines sous-classes d'immunoglobulines par les lymphocytes B conventionnels en réponse à des antigènes bien déterminés. Plus précisément, l'administration de cette cytokine chez la souris peut résulter en une élévation de la sécrétion des anticorps de type IgG2a, IgG2b et IgG3 (Buchanan *et al.*, 1995; Germann *et al.*, 1995a), ce qui est peu surprenant puisque ces isotypes sont associés avec les réponses cellulaires spécifiques de type Th1 chez la souris (Finkelman *et al.*, 1990). Par contre, suite à une première immunisation, l'IL-12 est également capable d'inhiber la production d'autres isotypes comme l'IgG1, lequel est caractéristique des réponses cellulaires de type Th2 chez la souris (McKnight *et al.*, 1994; Buchanan *et al.*, 1995). Dans plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro*, il a été démontré que l'IL-12 supprime la synthèse de l'IgE (Kiniwa *et al.*, 1992; Finkelman *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 1994; Via *et al.*, 1994; Germann *et al.*, 1995a; Germann *et al.*, 1995c; King *et al.*, 1995), mais étant donné que dans certaines conditions expérimentales l'IL-12 favorise les réponses de type Th2, cela implique que cette cytokine peut aussi augmenter la production d'IgE par les lymphocytes B (Germann *et al.*, 1995b; Wynn *et al.*, 1995).

Des études récentes ont permis d'attribuer un autre rôle immunorégulateur très important à l'IL-12. Celle-ci est impliquée dans la migration des leucocytes vers les

tissus, ce qui représente un phénomène essentiel lors des réponses de l'hôte aux infections. L'extravasation des leucocytes résulte entr'autres d'une interaction entre des ligands spécifiques exprimés à la surface des lymphocytes T effecteurs et des molécules adhésives retrouvées à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire (Springer, 1994). L'IL-12 apporte son aide de plusieurs façons. Tout d'abord, cette cytokine régule à la hausse l'expression des ligands des sélectines P et E endothéliales, lesquels sont exprimés seulement sur les lymphocytes T de type Th1, en favorisant l'activation d'une des enzymes qui catalysent cette réaction soit la $\alpha(1, 3)$ -fucosyltransférase VII (Austrup *et al.*, 1997; Wagers *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1999). Ensuite, l'IL-12 affecte positivement l'attraction des leucocytes vers les sites tissulaires en touchant à une large famille de petites cytokines soit les chimiokines. Plus précisément, l'IL-12 favorise l'expression des récepteurs des chimiokines suivantes: CCR5, CXCR3 et CCR1 (Bonecchi *et al.*, 1998; Loetscher *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998; Colantonio *et al.*, 1999). En plus des récepteurs des sélectines et des chimiokines, les molécules adhésives de la famille des intégrines sont des composantes très importantes lors du recrutement des leucocytes aux sites tissulaires inflammés. Il a été décrit que l'IL-12 augmente fortement l'expression de l'intégrine $\alpha6\beta1$ sur les lymphocytes T de type Th1 (Colantonio *et al.*, 1999).

1.6 IL-12 et pathologies

La liaison de l'IL-12 à son récepteur induit entr'autres la phosphorylation du facteur de transcription STAT 4, lequel est très important dans la médiation des activités de cette cytokine. Les souris déficientes en STAT 4 sont viables et fertiles et démontrent aucune anomalie dans les fonctions hématopoiétiques (Kaplan *et al.*, 1996; Thierfelder

et al., 1996). Cependant, toutes les activités biologiques de l'IL-12 incluant l'induction de la production d'IFN- γ , la stimulation de la prolifération, l'augmentation des activités cytotoxiques naturelles et l'initiation de la différenciation Th1 sont altérées chez ces souris (Kaplan *et al.*, 1996; Thierfelder *et al.*, 1996). Ces observations démontrent donc que l'IL-12 joue un rôle crucial dans les premières lignes de défense de l'organisme contre une infection. Par contre, il ne faut pas oublier qu'elle est également responsable, si présente en excès, de plusieurs effets négatifs de l'inflammation allant d'altérations hématologiques et de dommages tissulaires au niveau du foie et du tractus gastrointestinal jusqu'à des effets létaux comme dans le cas du choc endotoxique (Wysocka *et al.*, 1995). Étant donné que l'IL-12 permet la différenciation Th1, elle est aussi impliquée, lorsque surexprimée, dans les maladies auto-immunitaires de type Th1 spécifiques d'organes (Trembleau *et al.*, 1995a).

Tel que montré précédemment, un excès d'IL-12 est néfaste pour l'organisme, mais il faut également considérer qu'une déficience en cette cytokine peut résulter en de graves conséquences. Dans les modèles des souris déficientes pour l'IFN- γ ou pour l'IL-12, l'équipe de Jouanguy *et al.* (1999) a démontré que le groupe de souris déficientes en IFN- γ est plus vulnérable aux infections à la salmonelle ou aux mycobactéries comme *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium tuberculosis* comparativement au groupe de souris déficientes en IL-12. Il semble donc que l'IFN- γ produit indépendamment de l'IL-12 soit responsable d'une résistance partielle à ces infections chez les souris IL-12^{-/-}. Chez l'homme, les patients IFN- γ ^{-/-} sont aussi moins résistants que les patients déficients en IL-12 aux infections à la salmonelle et aux mycobactéries (Jouanguy *et al.*, 1999). Par contre, l'IFN- γ résiduel présent chez les individus IL-12^{-/-} permet parfois d'observer une rémission complète à des infections au BCG (Altare *et al.*, 1996; Altare *et al.*, 1998; de Jong *et al.*, 1998). Pour induire cette

sécrétion d'IFN- γ indépendamment de l'IL-12, des mécanismes redondants doivent exister. Deux facteurs ont des fonctions similaires à celles de l'IL-12. L'IL-18 est une cytokine qui fait partie de la famille des cytokines IL-1, en terme de structure, de récepteur et de transduction du signal intracellulaire, et qui est produite par les cellules monocytiques (Lebel-Binay *et al.*, 2000). Cette interleukine partage quelques activités biologiques avec l'IL-12 dont la stimulation de la prolifération et l'induction de la production d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 et T CD8⁺ et les cellules NK (Lebel-Binay *et al.*, 2000). L'IL-23 est une cytokine récemment découverte par le groupe de Oppmann *et al.* (2000). Elle est composée d'une sous-unité p19 et partage avec l'IL-12 la sous-unité p40 (Oppmann *et al.*, 2000). Cette interleukine est produite par les cellules dendritiques murines et humaines et possède, avec l'IL-12, la capacité de stimuler la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T activés à la PHA (Oppmann *et al.*, 2000). Ainsi, l'IL-18 et l'IL-23 pourrait représenter deux autres molécules impliquées dans la production d'IFN- γ .

2. L'interleukine-15

2.1 Généralités

L'IL-15 est une cytokine découverte simultanément par deux groupes. L'équipe de Grabstein *et al.* (1994) testait l'activité des cytokines du surnageant de la lignée épithéliale CV-1/EBNA-1 de rein de singe lorsqu'elle s'est aperçue que ces cellules produisaient un facteur soluble différent de l'IL-2 capable de promouvoir la prolifération de la lignée CTLL qui normalement croît en présence d'IL-2. L'analyse de la séquence en acides aminés de ce facteur inconnu a permis de désigner cette nouvelle cytokine comme étant l'IL-15. Le groupe de Burton *et al.* (1994) travaillait avec des

lymphocytes T induits à devenir leucémiques suite à une infection par le virus HTLV-1. Dans les phases précoces, la prolifération de ces cellules T malignes est associée à une activité autocrine qui implique la coordination de la synthèse d'IL-2 et l'expression du récepteur à l'IL-2. Par contre, dans les phases tardives, les lymphocytes T malins ne sécrètent plus d'IL-2, mais continuent à exprimer le récepteur à l'IL-2 et à proliférer. Ce groupe a montré que cette lignée de lymphocytes T produit une cytokine, qui à l'époque avait été désignée de façon provisoire IL-T, qui stimule leur prolifération. C'est un peu plus tard que l'équipe de Bamford *et al.* (1996), à l'aide d'anticorps anti-cytokines, démontra que l'IL-T était identique à l'IL-15.

2.2 Structure et récepteurs

L'IL-15 est une glycoprotéine de 14 kD (Burton *et al.*, 1994; Grabstein *et al.*, 1994). Chez l'homme, la séquence nucléotidique de cette cytokine se trouve sur le chromosome 4q31 alors que chez la souris, elle est présente dans la région centrale du chromosome 8 (Anderson *et al.*, 1995a). Les IL-15 humaine et simienne possèdent 97% d'identité de séquence dans la région de l'ADN contenant les exons codants (Grabstein *et al.*, 1994). En comparaison, l'IL-15 murine contient 73% d'identité avec l'IL-15 humaine au niveau nucléotidique et protéique (Anderson *et al.*, 1995a). La transcription à partir de l'ADN génomique puis la traduction de l'ARN messenger donnent lieu à un précurseur polypeptidique de 162 acides aminés. Ce dernier subit ensuite des modifications post-traductionnelles impliquant entr'autres le clivage de la séquence de tête d'une longueur de 48 acides aminés qui résultent finalement en l'apparition d'une protéine mature de 114 acides aminés (Grabstein *et al.*, 1994). Cependant, il a été initialement démontré dans des cellules isolées d'un cancer du poumon qu'il existe deux isoformes d'ARN messagers codant pour l'IL-15 suite à un

mécanisme d'épissage alternatif (Meazza *et al.*, 1996). Les produits de cet épissage permettent la formation de deux précurseurs polypeptidiques dont les séquences de tête sont d'une longueur de 48 ou de 21 acides aminés (Meazza *et al.*, 1996; Onu *et al.*, 1997; Tagaya *et al.*, 1997). Il semble que l'ARNm qui code pour le précurseur de l'IL-15 contenant la petite séquence de tête est traduit efficacement, mais le produit n'est pas sécrété et celui-ci est contenu dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule (Tagaya *et al.*, 1997; Gaggero *et al.*, 1999; Kurys *et al.*, 2000). Par contre, le précurseur de l'IL-15 contenant la longue séquence de tête se retrouve dans les compartiments sécrétoires de la cellule tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, mais la protéine mature est sécrétée à de faibles niveaux (Tagaya *et al.*, 1997; Kurys *et al.*, 2000). La signification biologique de ces observations nécessite d'autres investigations.

L'IL-15 possède un récepteur hétérotrimérique composé des chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2 et sa propre chaîne α de haute affinité (Bamford *et al.*, 1994; Giri *et al.*, 1994; Grabstein *et al.*, 1994; Giri *et al.*, 1995). L'affinité de liaison de l'IL-15 avec sa chaîne α est de 1000 fois supérieure à celle observée lors de l'interaction IL-2 - chaîne α du récepteur à l'IL-2 (Giri *et al.*, 1995). Jusqu'à maintenant, huit variantes de la chaîne α du récepteur à l'IL-15 ont été isolées, mais seulement quelques unes d'entre-elles sont capables de fixer l'IL-15 avec une très haute affinité (Anderson *et al.*, 1995b; Dubois *et al.*, 1999). Ainsi, lorsque l'on considère ce complexe hétérotrimérique, la chaîne α du récepteur à l'IL-15 est requise pour l'affinité de liaison seulement alors que les chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2 sont nécessaires et sont les seuls facteurs limitants pour médier la transduction du signal à l'intérieur de la cellule en réponse à l'IL-15 (Burton *et al.*, 1994; Carson *et al.*, 1994; Giri *et al.*, 1994; Giri *et al.*, 1995). La distribution cellulaire du récepteur à l'IL-15 est plutôt étendue puisque son expression a été démontrée entr'autres sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, les

lymphocytes B, les monocytes/macrophages, les cellules NK, les cellules stromales de la moëlle osseuse et du thymus ainsi que sur les cellules endothéliales vasculaires (Giri *et al.*, 1995; Chae *et al.*, 1996). Un récepteur distinct pour l'IL-15 a été identifié sur les mastocytes soit l'IL-15RX et celui-ci n'inclut pas les chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2 et l'IL-15R α (Tagaya *et al.*, 1996).

2.3 Source et régulation

Les sources cellulaires principales d'IL-15 sont les monocytes/macrophages (Grabstein *et al.*, 1994; Bamford *et al.*, 1996; Carson *et al.*, 1996; Flamand *et al.*, 1996), les cellules dendritiques (Blauvelt *et al.*, 1996; Jonuleit *et al.*, 1997), les kératinocytes, les cellules de Langerhans et les fibroblastes dermiques (Mohamadzadeh *et al.*, 1995; Blauvelt *et al.*, 1996) ainsi que les cellules épithéliales intestinales (Reinecker *et al.*, 1996). Cette cytokine est aussi sécrétée par les cellules stromales de la moëlle osseuse (Grabstein *et al.*, 1994; Mrózek *et al.*, 1996). Bien que l'ARN messager de l'IL-15 n'ait auparavant pas été détecté dans les lymphocytes T et B non transformés (Grabstein *et al.*, 1994; Bamford *et al.*, 1996), l'équipe de Onu *et al.* (1997) a découvert l'expression du transcrit primaire dans ces deux types cellulaires par la méthode du RT-PCR. Au niveau tissulaire, l'IL-15 est exprimée dans le placenta, le muscle squelettique, le coeur, les poumons, le foie et les reins (Grabstein *et al.*, 1994).

Même si l'ARN messager codant pour l'IL-15 est retrouvé de façon assez ubiquitaire, il a été jusqu'à présent excessivement difficile de démontrer la forme protéique de l'IL-15 dans le surnageant de culture de plusieurs cellules exprimant l'ARN messager de cette cytokine. Ce phénomène résulte tout d'abord d'une régulation étroite de la traduction de cet ARN qui contient en 5', dans la région non codante, de multiples

codons nucléotidiques AUG, en amont du codon AUG initiateur de la traduction, ce qui diminue dramatiquement l'efficacité de la traduction (Anderson *et al.*, 1995a; Bamford *et al.*, 1996). De ces triplets AUG, il en existe dix chez l'homme et cinq chez la souris. Ensuite, un autre mécanisme pouvant contribuer à diminuer la synthèse et la sécrétion de l'IL-15 est la séquence de tête de 48 acides aminés, inhabituellement longue, présente sur la protéine immature (Onu *et al.*, 1997). Il a été démontré que le remplacement de cette séquence de tête par la séquence de tête de l'IL-2 permet d'augmenter approximativement de 20 fois la quantité d'IL-15 produite. Plusieurs autres facteurs non intrinsèques peuvent également réguler de façon positive ou négative la sécrétion d'IL-15 par les différentes sources cellulaires mentionnées ci-haut. Par exemple, les monocytes peuvent synthétiser l'IL-15 en réponse à divers stimuli comme le LPS (Grabstein *et al.*, 1994), une combinaison de LPS et d'IFN- γ (Bamford *et al.*, 1996) ou encore suite à une infection avec les virus HHV-6 et HHV-7 (Flamand *et al.*, 1996; Atedzoe *et al.*, 1997). Dépendant des conditions expérimentales, des kératinocytes irradiés aux ultra-violets de type B peuvent soit inhiber ou soit augmenter leur production d'IL-15 (Mohamadzadeh *et al.*, 1995; Blauvelt *et al.*, 1996). La sécrétion d'IL-15 a aussi été détectée après la phagocytose de particules immunomagnétiques par les cellules dendritiques (Jonuleit *et al.*, 1997).

2.4 Fonctions

Étant donné que l'IL-15 signale via les chaînes β et γ du récepteur à l'IL-2, cette cytokine partage plusieurs activités biologiques avec l'IL-2. L'IL-15 induit la prolifération des lymphocytes T activés (Burton *et al.*, 1994; Grabstein *et al.*, 1994) et costimule avec l'IL-12 la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ , de GM-CSF et de TNF- α par les cellules NK (Carson *et al.*, 1994). L'IL-15 régule également la survie des

cellules NK (Carson *et al.*, 1997) et induit la prolifération et la synthèse d'immunoglobulines par les lymphocytes B humains, isolés d'amygdales et stimulés par l'engagement du CD40 ou du récepteur de surface (Armitage *et al.*, 1995). Puisque l'expression de l'IL-2 et de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 est restreinte aux lymphocytes T activés, ceci suggère que les signaux donnés par cette cytokine sont limités à agir principalement sur ce type cellulaire. Par contre, l'expression étendue de l'IL-15 et de la chaîne α de haute affinité de son récepteur permet de concevoir une action beaucoup plus large au niveau de plusieurs types de cellules. Ainsi, les fonctions distinctes de l'IL-15 *in vivo* sont devenues plus claires lors de la description des souris déficientes pour la chaîne α du récepteur à l'IL-15 ou des souris déficientes pour l'IL-15 (Lodolce *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000). Ces deux types de souris sont lymphopéniques et sont déficientes spécifiquement en cellules NK, en cellules NK T et en lymphocytes intra-épithéliaux de type CD8 $\alpha\alpha^+$ (Lodolce *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000). Les déficits observés au niveau des cellules du système immunitaire innée implique un rôle très important de l'IL-15 et de la chaîne α de son récepteur dans les signaux contribuant au développement et/ou à la survie de ces cellules. D'ailleurs, il avait été préalablement démontré que l'IL-15 est cruciale dans la différenciation des cellules NK humaines CD56⁺ à partir des cellules souches hématopoïétiques (Leclercq *et al.*, 1996; Mrózek *et al.*, 1996). De plus, le fait que les deux types de souris soient lymphopéniques suggère que l'IL-15 peut également contrôler l'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, lesquels jouent un rôle très important dans l'immunité acquise (Lodolce *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000). L'IL-15 semble avoir un rôle imminent dans la prolifération et/ou la survie des lymphocytes T CD8⁺ activés et mémoires (Lodolce *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000).

3. LAG-3

3.1 Structure et ligand

Le LAG-3 est une molécule qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines et qui est apparentée à la molécule CD4 tant au niveau du gène que de la protéine (Triebel *et al.*, 1990). Les portions de l'ADN génomique codant pour ces deux molécules sont d'ailleurs retrouvées sur le même chromosome soit le 12 (Triebel *et al.*, 1990). L'ADN codant pour la molécule LAG-3 permet la formation d'une protéine immature de 498 acides aminés contenant une séquence de tête de 28 acides aminés (Triebel *et al.*, 1990). Après la perte de cette séquence de tête et certaines modifications post-traductionnelles, le LAG-3, une glycoprotéine mature de 70 kD et constituée de 470 acides aminés, est transporté en périphérie puis exprimé à la surface de certains types de cellules (Triebel *et al.*, 1990; Baixeras *et al.*, 1992). La molécule LAG-3 est ainsi une protéine membranaire de type I qui est composée de quatre domaines extracellulaires, dont un de type variable et trois de type constant, ayant une homologie avec les domaines variables et constants des immunoglobulines (Triebel *et al.*, 1990). Bien que très similaire au niveau structurel avec la molécule CD4, le LAG-3 possède une particularité qui se trouve dans le premier domaine extracellulaire à partir de l'extrémité NH₂-terminale. En effet, ce domaine contient une extra-boucle de 30 acides aminés et cette insertion ne semble pas être incompatible avec les structures secondaires et tertiaires des domaines de la superfamille des immunoglobulines puisqu'elle ne modifie en rien la configuration des feuillets β formant le premier domaine extracellulaire de LAG-3 (Triebel *et al.*, 1990). Une autre différence importante entre les molécules CD4 et LAG-3 se trouve au niveau de la transduction du signal à l'intérieur de la cellule. La molécule CD4 interagit avec la protéine kinase *Lck* pour médier son signal

(Glaichenhaus *et al.*, 1991) alors que la queue cytoplasmique de LAG-3 ne contient aucun site d'interaction pour cette tyrosine kinase (Huard *et al.*, 1996).

Étant donné qu'il a été préalablement démontré dans plusieurs études que la molécule CD4 interagit avec le CMH de classe II, lequel est exprimé sur les CPA, (Doyle *et al.*, 1987; Gay *et al.*, 1987; Mazerolles *et al.*, 1988; Mazerolles *et al.*, 1990; Piatier-Tonneau *et al.*, 1991) et est le récepteur pour le virus de l'immunodéficience humaine (Klatzmann *et al.*, 1984; Maddon *et al.*, 1986), l'équipe de Baixeras *et al.* (1992) s'est penchée sur l'habileté de LAG-3 de se lier à ces ligands. Tout comme la molécule CD4, le LAG-3 possède une affinité de liaison pour le CMH de classe II. Cependant, cette molécule est incapable de se lier avec la gp120 du virus de l'immunodéficience humaine. Malgré les aspects similaires existant entre les molécules LAG-3 et CD4, la première forme des interactions stables avec le CMH de classe II. Plus précisément, il a été montré que le LAG-3 se lie au CMH de classe II avec une affinité pouvant être jusqu'à 1000 fois supérieure à celle observée lors de l'interaction CD4 - CMH de classe II (Huard *et al.*, 1995). En fait, lorsque l'on compare les affinités de liaison de ces deux molécules, le LAG-3 se lie à des concentrations de l'ordre du nM alors que la molécule CD4 n'interagit qu'à des concentrations de l'ordre du μM (Huard *et al.*, 1995). Le site de liaison de la molécule LAG-3 implique ses deux premiers domaines extracellulaires dont des résidus d'acides aminés situés à la base de l'extra-boucle présente dans le premier domaine (Huard *et al.*, 1997).

3.2 Expression cellulaire et tissulaire

Contrairement à la molécule CD4, le LAG-3 n'est pas exprimé sur les lymphocytes T au repos, mais sa transcription est rapidement induite suite à l'activation

des lymphocytes T et des cellules NK *in vitro* (Baixeras *et al.*, 1992) et *in vivo* (Huard *et al.*, 1994a). L'induction de la transcription de la molécule LAG-3 se fait autant dans les lymphocytes T CD4⁺ que dans les lymphocytes T CD8⁺. Par contre, il est à noter que l'expression transmembranaire de cette molécule est de trois à dix fois supérieure chez les lymphocytes T CD8⁺ (Huard *et al.*, 1994a). *In vivo*, le LAG-3 est détecté dans deux situations où il y a présence de lymphocytes activés. Cette molécule est exprimée dans les organes lymphoïdes secondaires subissant une inflammation, plus particulièrement au niveau des amygdales et des ganglions lymphatiques démontrant une hyperplasie folliculaire (Huard *et al.*, 1994a). Aussi, le LAG-3 est détecté sur les PBMC de patients cancéreux traités avec de fortes doses d'IL-2 (Huard *et al.*, 1994a). Il a été également observé que les lymphocytes T infiltrant le carcinome du rein chez l'homme expriment ce marqueur d'activation (Angevin *et al.*, 1997).

La plupart des études ont jusqu'à maintenant associé l'expression de la molécule LAG-3 sur les lymphocytes T activés avec le profil des cytokines sécrétées par ces cellules. L'expression de surface de cette molécule corrèle avec la production d'IFN- γ par des clones de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ayant un profil Th0 ou Th1 établi et non pas par les lymphocytes T possédant un phénotype de type Th2 (Annunziato *et al.*, 1996; Mingari *et al.*, 1996; Angevin *et al.*, 1997; Bruniquel *et al.*, 1998). La différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1 ou Th2, à partir de cellules naïves isolées du sang de cordon ombilical, montre également qu'en présence d'IL-12 et non pas d'IL-4, l'expression de LAG-3 est augmentée sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui sécrètent de grandes quantités d'IFN- γ (Annunziato *et al.*, 1997). L'ajout d'un anticorps neutralisant dirigé contre l'IFN- γ abolit l'expression de LAG-3 dans les conditions de différenciation Th1 (Annunziato *et al.*, 1997). Jusqu'à présent, une seule étude semble infirmer une partie des données précédentes. En effet,

le groupe de Scala *et al.* (1998) a observé que bien que leurs lymphocytes T CD4⁺ expriment la molécule LAG-3 seulement lorsqu'ils synthétisent de l'IFN- γ , il en va tout autrement pour leurs lymphocytes T CD8⁺. En fait, ceux-ci possèdent du LAG-3 de surface même s'ils ont un phénotype cytotoxique de type Th2 et qu'ils produisent de l'IL-4.

3.3 Fonctions

Tel que mentionné précédemment, l'expression de la molécule LAG-3 est induite seulement après l'activation des lymphocytes T, ce qui suggère fortement qu'elle ne joue pas un rôle primordial dans les phases inductrices des réponses immunitaires. LAG-3 semble exercer des activités effectrices et réceptrices. Il a été rapporté qu'un signal positif est transmis aux cellules NK LAG-3⁺, tel qu'indiqué par une défectuosité dans la capacité de tuer certaines tumeurs cibles dans des souris déficientes pour LAG-3 (Miyazaki *et al.*, 1996). Par contre, un signal négatif est donné aux lymphocytes T CD4⁺LAG-3⁺ seulement et ce, dans le but de supprimer les réponses spécifiques d'un antigène et les réactions mixtes leucocytaires allogéniques et xénogéniques (Huard *et al.*, 1994b; Huard *et al.*, 1996; Subramanyam *et al.*, 1998). Aussi, la liaison de LAG-3 sur les lymphocytes T activés peut supprimer la réponse immunitaire en cours en interférant avec le signal transmis par le TCR, c'est-à-dire qu'il y a entr'autres inhibition de la prolifération et de la synthèse de cytokines par les lymphocytes T suite à une diminution de l'expression du complexe CD3/TCR induite par LAG-3 (Hannier *et al.*, 1998).

4. CD47

4.1 Structure et récepteurs

Le CD47, préalablement appelé IAP (Integrin Associated-Protein), a été cloné chez l'homme et la souris par le groupe de Lindberg *et al.* en 1993. L'IAP a été initialement identifiée comme la cible d'anticorps bloquant l'activation des neutrophiles et des monocytes par des constituants de la matrice extracellulaire (Brown *et al.*, 1990). Le CD47 est une molécule monomérique qui possède un poids moléculaire de 50 kD et qui est composée d'un domaine extracellulaire ayant une homologie avec les domaines variables des immunoglobulines, d'une région carboxy-terminale hautement hydrophobique contenant cinq segments transmembranaires et d'une petite queue cytoplasmique de 16 résidus, dont quatre variantes existent grâce à un mécanisme d'épissage alternatif (Lindberg *et al.*, 1993; Reinhold *et al.*, 1995). Le CD47 murin partage 71% d'identité au niveau de sa séquence en acides aminés avec la forme humaine de cette protéine (Lindberg *et al.*, 1993). Initialement, lorsque le CD47 a été isolé à partir du placenta et des plaquettes sanguines, l'équipe de Lindberg *et al.* (1993) a constaté que cette molécule coprécipitait avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et β_3 , respectivement. D'ailleurs, il a été entr'autres montré que le CD47 peut être physiquement et fonctionnellement associé avec le récepteur à la vitronectine soit l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Lindberg *et al.*, 1993). Bien que la molécule CD47 ne se lie, d'aucune façon que ce soit, avec le ligand de l'intégrine auquel elle est associée, son domaine extracellulaire est par contre nécessaire et suffisant pour réguler la liaison de la vitronectine à son récepteur (Lindberg *et al.*, 1996).

L'extravasation des lymphocytes T et des monocytes des vaisseaux sanguins vers les lésions inflammatoires requiert une interaction de ces cellules avec la matrice extracellulaire qui contient plusieurs glycoprotéines et glycosaminoglycans comme la vitronectine, la fibronectine, le collagène et la laminine (Ben-Baruch *et al.*, 1995). La thrombospondine est une protéine homotrimérique de la matrice extracellulaire qui est produite non seulement par les plaquettes sanguines, mais aussi par les monocytes et les macrophages alvéolaires et est exprimée en grandes quantités dans les tissus inflammatoires (Lawler *et al.*, 1978; Schwartz *et al.*, 1989; Bornstein *et al.*, 1992; DiPietro and Polverini, 1993; Lahav *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1996b; Yehualaeshet *et al.*, 1999). Le groupe de Gao *et al.* (1996b) a démontré que la thrombospondine, via son domaine carboxy-terminal, est le ligand naturel du CD47. Il est à noter que la glycoprotéine SIRP (Signal-Regulatory Protein), exprimée de façon sélective sur les cellules neuronales et myéloïdes, a été récemment décrite comme servant de nouveau ligand pour la molécule CD47 (Jiang *et al.*, 1999; Seiffert *et al.*, 1999; Mi *et al.*, 2000; Vernon-Wilson *et al.*, 2000).

4.2 Expression cellulaire et fonctions

Le CD47 est impliqué entr'autres dans la transduction du signal lors de l'activation des neutrophiles par une variété de ligands contenant le motif RGD (Arg-Gly-Asp) (Zhou *et al.*, 1993). Cependant, le CD47 ne se lie pas par lui-même à ces ligands, lesquels sont plutôt reconnus par les intégrines associées au CD47 (Senior *et al.*, 1992). En fait, l'expression du CD47 est beaucoup plus large que celle des intégrines puisqu'il est retrouvé même sur les globules rouges qui n'expriment aucune intégrine connue, ce qui suggère que la molécule CD47 possède un ou des rôle(s) autre(s) que celui de réguler les fonctions des intégrines. Ainsi, le CD47 est présent

dans la membrane plasmique de toutes les cellules du système hématopoïétique incluant les érythrocytes, les thrombocytes et les leucocytes (Brown *et al.*, 1990). Sur les érythrocytes, il existe environ 10 000 sites de liaison avec les molécules CD47 alors que sur les polymorphonucléaires, un total de 25 000 sites ont été dénombrés (Rosales *et al.*, 1992).

Le CD47 possède de nombreuses fonctions. Tout d'abord, cette molécule peut s'associer et/ou moduler l'activité des intégrines de type β_1 (Wang and Frazier, 1998), β_2 (Van Strijp *et al.*, 1993; Ishibashi *et al.*, 1994) et β_3 (Gao *et al.*, 1996a; Gao *et al.*, 1996b; Chung *et al.*, 1997) au niveau de l'adhésion, du chimiotactisme, de la migration et de l'activation des cellules qui les expriment. Par exemple, le CD47 synergise avec l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ pour induire la migration des lymphocytes B (Yoshida *et al.*, 2000) ou encore module l'aggrégation plaquettaire via le récepteur au collagène soit l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Chung *et al.*, 1999). Sur les thrombocytes, le CD47 est aussi physiquement associé avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et régule l'activité de cette dernière (Chung *et al.*, 1997). Les souris déficientes pour la molécule CD47 meurent rapidement d'une inflammation du péritoine, suite à l'administration de la bactérie *Escherichia coli*, dû à une réduction de l'accumulation et de l'activation des leucocytes via l'intégrine β_3 au site de l'infection (Lindberg *et al.*, 1996). Par contre, ces souris CD47^{-/-} sont moins susceptibles de développer l'arthrite en réponse à une infection avec *Staphylococcus aureus* étant donné un ralentissement de la migration des leucocytes dans les articulations (Verdrengh *et al.*, 1999). Le CD47 est impliqué dans plusieurs systèmes d'adhésion suite à la formation d'un complexe avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les protéines G trimériques (Green *et al.*, 1999). Le cholestérol est crucial dans l'association de ces trois protéines puisqu'il se lie aux différents segments transmembranaires du CD47

définissant ainsi un rôle pour ces derniers dans la formation d'une configuration particulière permettant la stabilisation du complexe trimoléculaire (Green *et al.*, 1999).

Ensuite, le CD47 est aussi capable de réguler l'activité d'autres cellules telles que les lymphocytes T et les globules rouges et ce, de façon indépendante des intégrines. Des anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule CD47 peuvent augmenter ou inhiber l'activation des lymphocytes T et réguler la mort des lymphocytes T et B dépendamment de la spécificité d'épitope de ces anticorps, de leur forme physique (soluble ou immobilisée) et des conditions expérimentales (Reinhold *et al.*, 1997; Ticchioni *et al.*, 1997; Waclavicek *et al.*, 1997; Mateo *et al.*, 1999; Pettersen *et al.*, 1999; Reinhold *et al.*, 1999; Vallejo *et al.*, 2000). Sur les globules rouges de souris, l'expression de la molécule CD47 lui permet de fonctionner comme un marqueur du soi (Oldenberg *et al.*, 2000). Les érythrocytes n'exprimant pas le CD47 sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par les macrophages présents dans la pulpe rouge de la rate (Oldenberg *et al.*, 2000). L'élimination des globules rouges est ainsi prévenue lorsque la molécule CD47 interagit avec son ligand, la protéine SIRP (Oldenberg *et al.*, 2000).

Les articles présentés dans la section *Résultats* montrent l'implication de trois molécules, l'IL-15, le LAG-3 et le CD47, sur la régulation de la production d'IL-12 chez l'homme. Lorsque j'ai débuté mon travail de doctorat, plusieurs travaux démontraient l'importance des régulateurs positifs de l'IL-12, car cette dernière est cruciale dans l'élaboration d'une défense immunitaire contre des infections provoquées par différents pathogènes intracellulaires ainsi que contre certaines tumeurs murines et humaines. Dans notre laboratoire, une de mes collègues avait publié que l'IL-2 est capable d'induire la synthèse d'IL-12 par les monocytes humains dans un modèle

d'interactions lymphocytes T - monocytes et ce, en absence d'engagement du TCR, mais de façon dépendante de l'interaction CD154-CD40 (Armant *et al.*, 1996). Étant donné qu'à l'époque, l'IL-15 était connue surtout pour avoir plusieurs effets biologiques similaires à ceux de l'IL-2, nous avons émis l'hypothèse que cette cytokine pouvait se substituer à l'IL-2 et initier une réaction inflammatoire aboutissant à la production d'IL-12 par les monocytes en utilisant des mécanismes semblables (Article 1). Dans un deuxième temps, il avait été rapporté dans la littérature que l'engagement du CMH de classe II par un anticorps monoclonal induit la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques (Koch *et al.*, 1996). Puisque la molécule LAG-3 a pour ligand naturel le CMH de classe II, nous avons postulé que l'interaction LAG-3 - CMH de classe II pouvait représenter un second mécanisme, en plus de l'interaction CD154-CD40, capable de promouvoir la sécrétion d'IL-12 par les monocytes et les cellules dendritiques (Article 2).

Bien qu'importante, l'IL-12 est une cytokine qui doit être étroitement régulée, car un excès peut avoir des conséquences dangereuses pour l'organisme. À ce jour, de plus en plus d'études visent à comprendre les mécanismes qui régulent négativement la production de cette interleukine. Dans le cadre de mon travail de doctorat, j'ai collaboré aux travaux de recherche d'une de mes collègues visant à analyser les mécanismes par lesquels la molécule CD47 inhibe la synthèse d'IL-12 par les monocytes (Article 3). Sachant que l'IL-12 joue un rôle fondamental dans la différenciation Th1, nous avons par la suite proposé que l'engagement du CD47 s'opposerait à la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article 4.

RÉSULTATS

Article 1

IL-15 Promotes IL-12 Production by Human Monocytes Via T Cell-Dependent Contact
and May Contribute to IL-12-Mediated IFN- γ Secretion by CD4⁺ T Cells in the Absence
of TCR ligation

Marie-Noëlle Avice, Christian E. Demeure, Guy Delespesse, Manuel Rubio,
Myriam Armant, and Marika Sarfati

J. Immunol. 1998. **161**: 3408-3415

Ce premier article fait suite à une étude publiée par une de mes collègues qui démontrait que l'IL-2 est un régulateur positif de la synthèse d'IL-12 par les monocytes humains dans un modèle d'inflammation impliquant des interactions lymphocytes T - monocytes, en absence d'engagement du TCR, mais nécessitant l'interaction CD154-CD40. Dans le travail qui suit, nous avons montré que l'IL-15, une cytokine qui partage plusieurs activités biologiques avec l'IL-2, induit la production d'IL-12 par les monocytes humains en utilisant des mécanismes similaires à ceux de l'IL-2. L'originalité de ces résultats découle du fait que l'IL-15 peut effectivement activer les lymphocytes T CD4⁺ inflammatoires à promouvoir la sécrétion d'IL-12 par les monocytes, laquelle, en synergie avec l'IL-15, permet la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺. Ainsi, cette codépendance entre l'IL-12 et l'IL-15 représente un mécanisme potentiel d'activation des lymphocytes T inflammatoires en absence d'IL-2 endogène. Ce processus interviendrait dans des désordres chroniques dominés par une réponse de type Th1 tels que l'arthrite rhumatoïde et la sarcoïdose pulmonaire. Ma contribution à cet article représente 90% du travail expérimental.

IL-15 Promotes IL-12 Production by Human Monocytes Via T Cell-Dependent Contact and May Contribute to IL-12-Mediated IFN- γ Secretion by CD4⁺ T Cells in the Absence of TCR Ligation¹

Marie-Noëlle Avice, Christian E. Demeure, Guy Delespesse, Manuel Rubio, Myriam Armant,² and Marika Sarfati³

At inflammatory sites, the number of activated bystander T cells exceeds that of Ag-activated T cells. We investigated whether IL-15, a monocyte-derived cytokine that shares several biologic activities with IL-2, may contribute to bystander T cell activation in the absence of IL-2 and triggering Ag. The addition of IL-15 to cocultures of monocytes and T cells stimulates CD4⁺ but not CD8⁺ T cells to produce IFN- γ . IFN- γ production requires endogenous IL-12, the production of which in turn is dependent upon CD40/CD154 interactions between CD4⁺ T cells and monocytes. Indeed, non-TCR-activated CD4⁺ but not CD8⁺ T cells express significant levels of CD154. IL-15 may enhance IFN- γ in this system by up-regulating CD40 expression on monocytes and IL-12R β 1 expression on CD4⁺ T cells. Conversely, using neutralizing anti-IL-15 mAb, we show that the ability of IL-12 to augment IFN- γ secretion is partly mediated by endogenous IL-15. Finally, in the absence of monocytes, a synergistic effect between exogenous IL-12 and IL-15 is necessary to induce IFN- γ production by purified CD4⁺ T cells, while IL-15 alone induces T cell proliferation. It is proposed that this codependence between IL-12 and IL-15 for the activation of inflammatory T cells may be involved in chronic inflammatory disorders that are dominated by a Th1 response. In such a response, a self-perpetuating cycle of inflammation is set forth, because IL-15-stimulated CD4⁺ T cells may activate monocytes to release IL-12 that synergizes with IL-15 to induce IL-12 response and IFN- γ production. *The Journal of Immunology*, 1998, 161: 3408–3415.

Interleukin-15 is a 14-kDa glycoprotein characterized by an abundant level of mRNA expression in the placenta, heart, lung, liver, and kidney as well as in LPS-activated monocytes; however, in contrast to IL-2, IL-15 is not produced by untransformed, activated T cells (1, 2). It has been very difficult to demonstrate IL-15 protein in the supernatants of many of these cells that express mRNA for this cytokine. Indeed, IL-15 is tightly regulated at the translation level by having a long 5' untranslated region mRNA noncoding region encumbered with multiple AUGs (10 in humans and 5 in mice) upstream of the initiation AUG triplet (2, 3). Furthermore, the unusually long IL-15 signal peptide may contribute to an inefficiency of IL-15 synthesis and secretion (4).

IL-15 uses a heterotrimeric receptor composed of the β - and γ -chains of IL-2R and its own specific high-affinity binding α -chain (designated IL-15R α) (1, 5–7). Since IL-15 binds and signals through IL-2R subunits, this cytokine shares many biologic

activities with IL-2. IL-15 induces the proliferation of activated T lymphocytes (1, 8) and costimulates with IL-12 the proliferation of NK cells as well as their production of IFN- γ , granulocyte-macrophage (GM)-CSF,⁴ and TNF- α (9); IL-15 also regulates NK cell survival (10) and induces proliferation and Ig synthesis by human tonsillar B cells stimulated by CD40 ligand or by B cell receptor engagement (11).

Interestingly, IL-15 is present at a low but significant level in the inflamed synovium of patients suffering from rheumatoid arthritis (RA), in which it displays potent T cell chemoattractant activity (12). The mechanisms of T lymphocyte activation in RA pathogenesis are not completely elucidated, and the triggering Ag is not yet identified (13).

We reported previously that IL-2 was capable of inducing IFN- γ production by unfractionated non-TCR-activated T lymphocytes cocultured with autologous monocytes (14). Because IL-15 shares many biologic activities with IL-2, we examined whether IL-15 might substitute for IL-2 in the activation of bystander T lymphocytes and play a role in the maintenance of chronic inflammatory states. In the present report, we show that IL-15 activates monocytes to release IL-12 upon contact with CD4⁺ but not CD8⁺ T cells via a CD40-dependent pathway. Conversely, IL-12-mediated IFN- γ secretion is partly IL-15-dependent, inasmuch as IL-15 participates in IL-12 response and IFN- γ secretion.

University of Montreal, Allergy Research Laboratory, Louis-Charles Simard Research Center, Notre-Dame Hospital, Montreal, Canada

Received for publication October 27, 1997. Accepted for publication June 3, 1998.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

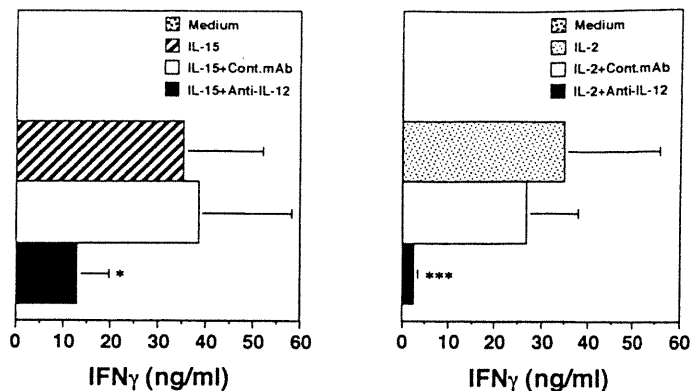
¹ This work was supported by a grant from the Medical Research Council (MRC) of Canada. M.S. is supported by an MRC Scientist Scholarship. M.-N.A. is the recipient of an Fonds Recherche Santé Québec-Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche-Santé student award.

² Current address: Laboratory for Parasitic Diseases, Bldg. 4, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-0425.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. M. Sarfati, University of Montreal, Allergy Research Laboratory (M4211-K), Louis-Charles Simard Research Center, Notre-Dame Hospital, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec, H2L 4 M1 Canada.

⁴ Abbreviations used in this paper: GM-CSF, granulocyte-macrophage CSF; RA, rheumatoid arthritis; PE, phycoerythrin; MFI, mean fluorescence intensity; EM, enriched monocyte.

FIGURE 1. IL-15- or IL-2-induced IFN- γ secretion by unfractionated T lymphocytes is IL-12-dependent. T lymphocytes were cocultured with autologous monocytes in the absence or presence of IL-15 (100 ng/ml) or IL-2 (50 U/ml). Goat IgG anti-IL-12 and control Abs were used at 5 μ g/ml. Culture supernatants were harvested at 72 h for the measurement of IFN- γ production as described in *Materials and Methods*. Data represent the mean \pm SEM of five experiments. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.005$.



Materials and Methods

Reagents

Human rIL-15 (Immunex, Seattle, WA) was used at 100 ng/ml. Human rIL-2 (50 U/ml), human rIL-12 (60 pM), neutralizing Ab to IL-12 (goat anti-human IL-12), and normal goat IgG Ab were kindly provided by Dr. M. Gately (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ). Anti-IFN- γ neutralizing mAb (clone p69) was provided by Dr. L. Garotta (Novartis, Basel, Switzerland). Two anti-CD154 mAbs, clones M90 (mouse IgG1, used for flow cytometry) and M92 (mouse IgG2a, used in culture), as well as anti-IL-15 mAb, clone M110 (mouse IgG1), were generated by Immunex. Isotype-matched control mAbs (mouse IgG1 and IgG2a) were prepared in our laboratory.

Purification of adult mononuclear cells

Monocytes. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation of heparinized blood from normal healthy volunteers using Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Enriched monocytes (EMs) were prepared by cold aggregation as described previously (15), followed by one cycle of rosetting with *S*-(2-aminoethyl)isothiuronium bromide (Aldrich, Milwaukee, WI) -treated SRBCs to deplete residual T and NK cells. Monocyte purity was shown to be >95% by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA) using phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD14 mAb (Ansell, London, Canada).

T lymphocytes. Enriched T cell populations were obtained from the monocyte-depleted PBMCs by rosetting with *S*-(2-aminoethyl) isothiuronium bromide-treated SRBCs and treating with ammonium chloride. Highly purified T cells were obtained following incubation for 20 min at 37°C with Lympho-kwik T (One Lambda, Los Angeles, CA). CD4⁺ T cells were isolated using Lympho-kwik TH (One Lambda), and CD8⁺ T cells were positively selected using anti-CD8-coated Dynabeads (Dyna, Oslo, Norway) followed by negative selection using anti-CD4-coated Dynabeads (Dyna) to remove double-positive cells (CD4⁺CD8⁺ T cells). T lymphocyte purity was assessed by flow cytometry (FACScan) using FITC-conjugated anti-CD3 mAb (Becton Dickinson), PE-conjugated anti-CD8 mAb, or FITC-conjugated anti-CD4 mAb (Ansell) and was shown to be >99% in all cases.

Culture conditions

Cultures were performed in serum-free HB101 medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) supplemented with 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 100 IU penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin in the presence of polymyxin B (10 μ g/ml) (Sigma, St. Louis, MO). T cells (10⁶ cells/ml) were incubated with autologous monocytes (2 \times 10⁵ cells/ml) in flat-bottom 48-well Falcon plates (Becton Dickinson). Two-chamber cultures were performed in 24-well plates with Falcon cell culture inserts (Becton Dickinson). T cells (10⁶ cells/ml) were added to the inserts in HB101 plus polymyxin B (10 μ g/ml). Monocytes were added to the wells and supplemented with HB101 plus polymyxin B with or without T cells. When cultured alone, T cells were seeded at 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 medium containing 10% FCS and 2 mM glutamine, 100 IU penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin in the presence of polymyxin B.

Lymphokine determination

IFN- γ was measured by a sandwich solid-phase RIA using two anti-IFN- γ mAbs as described previously (16). The detection limit of the assay was 30 pg/ml. IL-12p40 and IL-12p75 were assessed by a two-site sandwich ELISA using clone 2.4A1 or clone 20C2 as capture mAbs and clone 4D6 as second mAb. Anti-IL-12 mAbs were generously provided by Dr. M. Gately (Hoffmann-La Roche). The sensitivity of the assays was 20 pg/ml and 6 pg/ml, respectively. IL-15 was measured by a sandwich ELISA using mouse mAb to human IL-15 (clone M111) and polyclonal rabbit anti-IL-15. The detection limit of the assay was 50 pg/ml.

Flow cytometric analysis

CD154 and IL-12R β 1 surface expression was assessed using a three-step procedure. Briefly, cells were first incubated with anti-CD154 mAb (clone M90), anti-IL-12R β 1 mAb (24E.6), or class-matched negative control mAbs at 5 to 10 μ g/ml in the presence of normal human IgG (150 μ g/ml) for 1 h at 4°C. Cells were then incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG (Tago, Burlingame, CA) for 1 h at 4°C followed by PE-labeled streptavidin (Ansell). A two-step staining procedure was used to examine CD40 surface expression on monocytes. Cells were initially incubated with biotinylated anti-CD40 mAb (M89) or class-matched negative control mAb at 5 to 10 μ g/ml in the presence of normal human IgG (150 μ g/ml) for 1 h at 4°C followed by staining with PE-labeled streptavidin (Ansell). After staining, cells were analyzed using a FACScan (Becton Dickinson). Mean fluorescence intensity (MFI) was calculated as follows: (MFI specific mAb - MFI control mAb).

Thymidine incorporation

T cells were cultured for 5 days at 10⁶ cells/ml in RPMI 1640/10% FCS containing polymyxin B (10 μ g/ml) in flat-bottom Falcon 96-well plates (Becton Dickinson). DNA synthesis was assessed by adding 1 μ Ci/well of [methyl-³H]thymidine (10 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL) during the last 6 h of the culture. Triplicate cultures were then harvested onto glass fiber filters, and the radioactivity was counted using liquid scintillation.

Statistical analysis

Results were analyzed by the paired Student *t* test using Instat software (GraphPad, San Diego, CA).

Results

IL-15-induced IFN- γ production by CD4⁺ T cells in the absence of Ag largely depends upon their ability to promote IL-12 secretion by monocytes

In the present study, we first examined whether IL-15, a cytokine that shares several biologic activities with IL-2, would substitute for IL-2 in the induction of IFN- γ production by unstimulated T cells cocultured with syngeneic monocytes. As shown in Figure 1, unfractionated T cells secrete IFN- γ when stimulated by IL-15 or

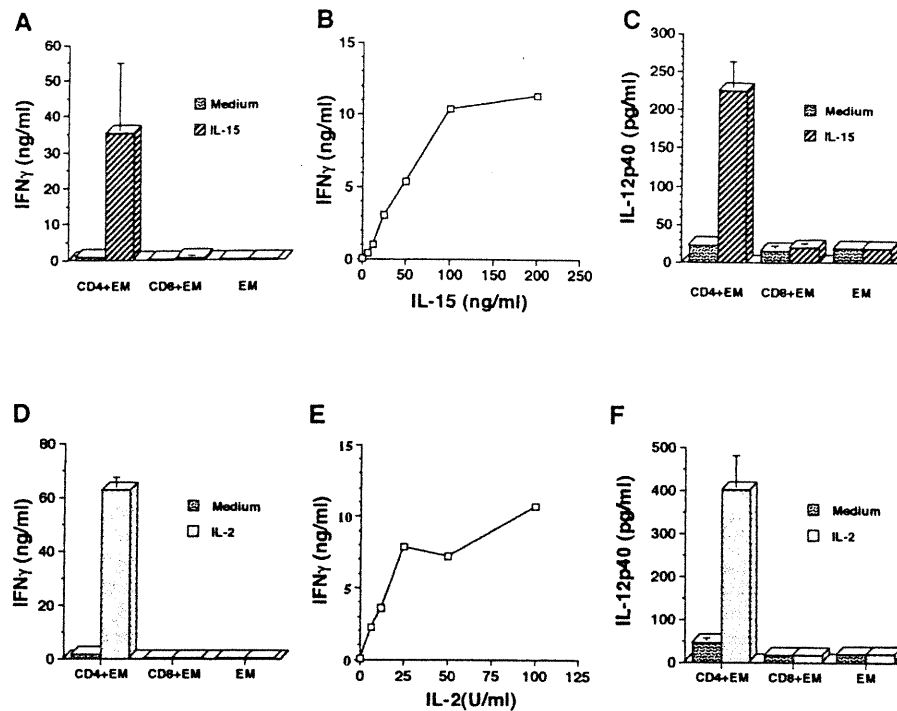


FIGURE 2. CD4⁺ but not CD8⁺ T lymphocytes promote IL-12 and IFN- γ secretion in the presence of IL-15 or IL-2. *A, C, D,* and *F.* CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were cocultured in presence of autologous monocytes. IL-15 was used at 100 ng/ml and IL-2 was used at 50 U/ml. In some experiments ($n = 3$), monocytes were cultured alone with IL-15 or IL-2. Culture supernatants were collected at 72 h and assessed for IFN- γ and IL-12p40 production. Data represent the mean \pm SEM of five experiments. *B* and *E.* Dose-response curve obtained by adding increased concentrations of IL-15 or IL-2 to cocultures of CD4⁺ T cells and autologous monocytes. Culture supernatants were harvested at 72 h for the measurement of IFN- γ production. One representative experiment of three is shown.

IL-2 in the absence of Ag but in the presence of monocytes. Anti-IL-12 Ab inhibits IFN- γ production by 70%, indicating that this response is largely IL-12-dependent. We subsequently fractionated T cells into CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations (Fig. 2) and demonstrated that only IL-15- or IL-2-stimulated CD4⁺ but not CD8⁺ T cells promote IL-12 secretion by monocytes and secrete IFN- γ . IL-15 or IL-2 induce IFN- γ production by CD4⁺ T cells in a dose-dependent manner. As shown in Table I, IL-15 or IL-2 induce both IL-12p40 and p75 release in this coculture system. Of interest, IL-15 and IL-2 display an additive effect on both IFN- γ and IL-12 secretion (data not shown). Finally, the results shown in Figure 2 also indicate that purified monocytes stimulated by IL-15 or IL-2 do not secrete IL-12, suggesting that IL-15 or IL-2-induced

IL-12 production requires the presence of CD4⁺ but not CD8⁺ T cells.

IL-15-induced IL-12 and IFN- γ secretion depends upon CD40-CD154 interaction

Next, we showed (Table II) that a physical separation of CD4⁺ T cells and monocytes abolishes IL-12 secretion, demonstrating that soluble factors produced by IL-15-activated T cells are not sufficient to trigger IL-12 release. However, the T cell-dependent IL-12 secretion is reduced by neutralizing anti-IFN- γ mAb (Table II), suggesting that part (30%) of the IFN- γ secretion produced via an IL-12-independent pathway (Fig. 1) could prime for enhanced IL-12 release in this coculture system. Nevertheless, the IL-15-induced IFN- γ secretion absolutely requires T cell contact with monocytes (Table II), which favors the hypothesis that in addition to IL-12, other monokines may be released upon contact with T cells and may contribute to IFN- γ production. Given that CD40 ligation on monocytes is a well-described mechanism to induce monokine release (including IL-12), we explored this possibility and found that anti-CD154 mAb strongly inhibits IL-12 release by monocytes and IFN- γ production by non-TCR-activated CD4⁺ T cells (Table II).

These results implied that CD154 is expressed on IL-15-stimulated CD4⁺ but not CD8⁺ T cells. Indeed, we confirmed and extended our previous studies on unfractionated T cells (14) by showing that CD4⁺ but not CD8⁺ T cells readily express a significant level of CD154 in the absence of TCR ligation (Fig. 3, A

Table I. IL-15 or IL-2 promotes IL-12 secretion in CD4⁺ T cell monocyte cocultures^a

Expt.	CD4 + EM + IL-15		CD4 + EM + IL-2	
	IL-12p40 (pg/ml)	IL-12p75 (pg/ml)	IL-12p40 (pg/ml)	IL-12p75 (pg/ml)
1	179	32	352	71
2	98	20	549	76
3	275	40	605	97
4	299	56	226	40

^a CD4⁺ T cells were cultured with syngeneic monocytes in the presence of IL-15 (100 ng/ml) or IL-2 (50 U/ml). IL-12 (p40 and p75) secretion was measured at 48 h. IL-12p40 (<20 pg/ml) and IL-12p75 (<6 pg/ml) are undetectable in unstimulated CD4⁺ T cell/monocyte cocultures.

Table II. *IL-12 and IFN- γ production induced by IL-15 or IL-2 depends upon T cell/monocyte contact and CD40/CD154 interactions^a*

	IFN- γ (ng/ml)		IL-12p40 (pg/ml)		IL-12p75 (pg/ml)	
CD4 + EM + IL-15	17		151		56	
CD4/EM + IL-15	0.2		<30		<6	
	CD4 + EM + IL-15			CD4 + EM + IL-2		
	IFN- γ (ng/ml)	IL-12p75 (pg/ml)	IFN- γ (ng/ml)	IL-12p75 (pg/ml)	IFN- γ (ng/ml)	IL-12p75 (pg/ml)
Control mAb (IgG1)	ND	97	ND	74	ND	74
Anti-IFN- γ mAb	ND	38	ND	37	ND	37
Control mAb (IgG2a)	34	106	32	108	32	108
Anti-CD154 mAb	1.1	33	1.1	29	1.1	29

^a Monocytes were cultured in wells, and CD4⁺ T lymphocytes were added either to the wells (T + EM) or to the well inserts (T/EM) as described in *Materials and Methods*. IL-15 was used at 100 ng/ml and IL-2 was used at 50 U/ml. Mouse IgG2a anti-CD154 (M92) mAb and isotype-matched control mAb were used at 5 μ g/ml; mouse IgG1, anti-IFN- γ mAb (clone p69), and isotype-matched control mAb were used at 10 μ g/ml. Culture supernatants were collected and assessed at 72 h for IFN- γ and at 48 h for IL-12 production. One representative experiment of three (for transwell assay), of six (for anti-CD154 mAb assay), and of three (for anti-IFN- γ mAb assay) are shown.

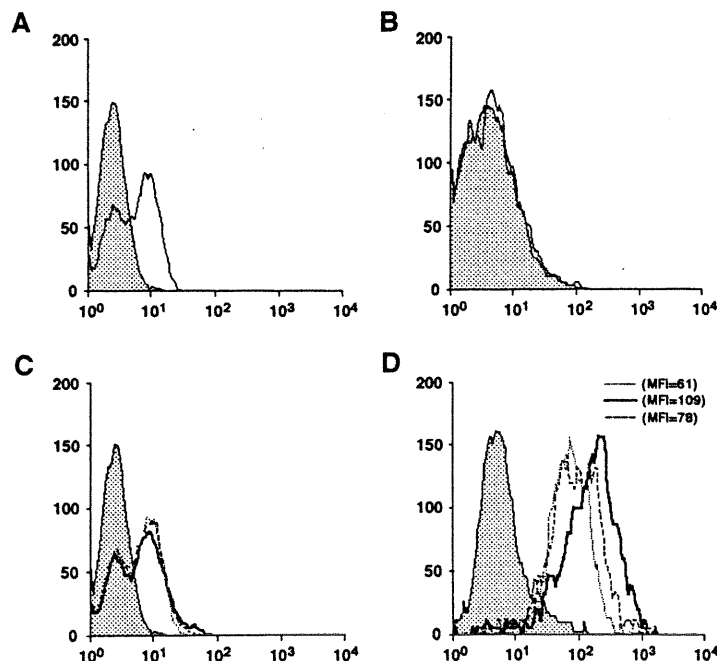
and B). This low level of CD154 expression is not up-regulated by IL-15, by IL-2, or by contact with monocytes (Fig. 3C and data not shown). However, our data further showed that IL-15 or IL-2 significantly increases the expression of CD40 Ag on purified monocytes (Fig. 3D). From these data, we propose that in the absence of TCR-activated T cells, IL-15 may substitute for IL-2 in promoting activation of bystander T cells. Indeed, IL-15 up-regulates CD40 on monocytes that, following engagement by CD154⁺CD4⁺ T cells, secrete IL-12 which may synergize with IL-15 to induce IFN- γ secretion.

IL-12-induced IFN- γ secretion by CD4⁺ T cells cocultured with monocytes is enhanced by endogenous IL-15

After having demonstrated that IL-15-induced IFN- γ production is IL-12-dependent, we subsequently provided evidence that, con-

versely, the ability of exogenous IL-12 to augment IFN- γ secretion is partly IL-15-dependent in this coculture system. As depicted in Figure 4, neutralizing anti-IL-15 mAb suppresses the IL-12-mediated IFN- γ production by CD4⁺ T cells cocultured with monocytes by 63% ($p = 0.002$). In contrast, the IL-2-mediated IFN- γ secretion is IL-15-independent. The specificity of the anti-IL-15 mAb is demonstrated by the abolition of IL-15-induced IFN- γ in parallel cultures. Since the above results using neutralizing mAb suggested that endogenous IL-15 protein is involved in IL-12-induced IFN- γ secretion, we examined whether exogenous IL-12 may increase IL-15 production. However, several experimental approaches attempting to verify this hypothesis remained unsuccessful. We failed to detect IL-15 protein (as measured by a specific ELISA or by intracytoplasmic staining) in T cell/monocyte cocultures as well as in IL-12-stimulated PBMCs activated by LPS or

FIGURE 3. IL-15 and IL-2 up-regulate CD40 expression on monocytes but not CD154 expression on CD4⁺ T cells. Purified CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T lymphocytes were cultured overnight in complete medium and stained using anti-CD154 mAb (—) or control mAb (plain histogram) as described in *Materials and Methods*. C, Purified CD4⁺ T cells were cultured overnight in complete medium (....) or in the presence of IL-15 (100 ng/ml) (—) or IL-2 (50 U/ml) (- - -) and stained using anti-CD154 mAb or control mAb (plain histogram). D, Monocytes were stimulated in complete medium (....) or in the presence of IL-15 (—) or IL-2 (- - -) and stained using anti-CD40 mAb or control mAb (plain histogram). MFI was calculated as described in *Materials and Methods*. One representative experiment of three is shown.



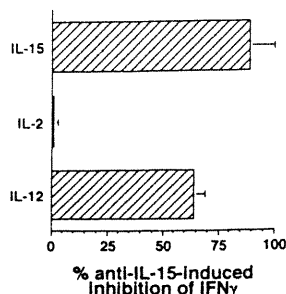


FIGURE 4. IL-12-mediated IFN- γ production by CD4⁺ T cells is partly IL-15-dependent. CD4⁺ T lymphocytes were cocultured with autologous monocytes in the presence of IL-15 (100 ng/ml) ($n = 3$), IL-2 (50 U/ml) ($n = 4$), or IL-12 (60 pM) ($n = 5$). Anti-IL-15 mAb (M110) or control mAb were added to cocultures at a concentration of 20 μ g/ml. Culture supernatants were harvested at 72 h and analyzed for IFN- γ production. The percentage of anti-IL-15 mAb-induced inhibition of IFN- γ was calculated as follows: $(1 - [\text{anti-IL-15 mAb}/\text{control mAb}]) \times 100\%$.

Staphylococcus aureus Cowan (data not shown), a culture condition that reportedly induces IL-15 secretion (17).

In view of the reciprocal dependence between IL-15 and IL-12 in the regulation of IFN- γ response, we subsequently examined whether IL-15, as reported for IL-2, may facilitate the IL-12 response by up-regulating the IL-12R β chain. The data in Figure 5 show that, regardless of the presence of monocytes, IL-15 significantly augments IL-12R β 1 expression on CD4⁺ T cells, strongly suggesting that IL-15 may increase IL-12 responsiveness of purified T cells.

IL-15 contributes to IL-12-mediated IFN- γ production by purified CD4⁺ T cells

Next, we explored the proliferative and IFN- γ response of purified CD4⁺ T cells cultured in the absence of monocytes to saturating doses of IL-15 used alone or in combination with optimal concentrations of IL-12. Despite the expression of IL-12R (Fig. 5), IL-15R (18), and IL-2R on purified CD4⁺ T cells, neither IL-15, IL-2, nor IL-12 alone stimulate IFN- γ production; IL-15 and IL-2 but not IL-12 induce significant T cell proliferation (Fig. 6). Most strikingly, IL-15 synergizes with IL-2 to strongly induce IFN- γ secretion with no significant increase in cell proliferation. Note that IL-2 may substitute for IL-15 in this synergy. Finally, although IL-15 promotes the response of purified CD4⁺ T cells to IL-12, this IL-12-mediated IFN- γ production is strongly increased upon contact with monocytes at day 3 (Fig. 7) or day 5 (data not shown), which supports previous studies underlying the role of monocyte costimulatory molecules in the response to IL-12. The data in Figure 7 also indicate that a disruption of cellular contact between IL-15- plus IL-2-stimulated T cells and monocytes completely abrogates IFN- γ production, confirming that IL-12 production is not dispensable for IFN- γ secretion by IL-15, IL-2, or IL-15 and by IL-2-stimulated CD4⁺ T cells. Taken together, it is proposed that IL-15-stimulated CD4⁺ T cells may proliferate and engage CD40 on monocytes to promote IL-12 secretion; IL-15 and IL-12 synergize to induce a T cell IFN- γ response that is further amplified upon contact with monocytes, providing a mechanism of activation of inflammatory T cells in the absence of TCR triggering.

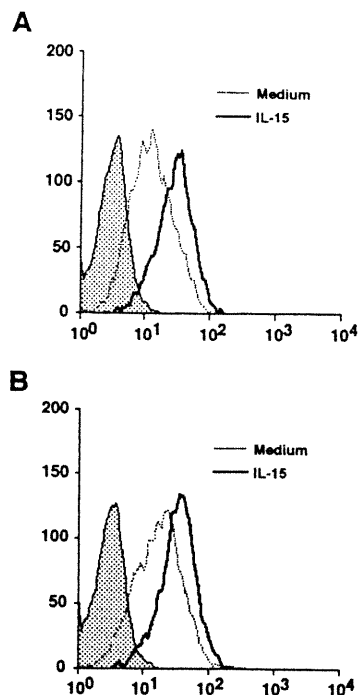


FIGURE 5. IL-15 up-regulates IL-12R β 1 expression on CD4⁺ T lymphocytes. Purified CD4⁺ T lymphocytes were cultured alone (A) or with autologous monocytes (B). Cells were stimulated for 3 days in the absence (.....) or presence (—) of IL-15 (100 ng/ml) and stained using anti-IL-12R β 1 (24E.6) mAb or control mAb (plain histogram). One representative experiment of four is shown.

Discussion

In this study, we report that in the presence of IL-15, CD154⁺CD4⁺ T cells engage CD40 Ag on monocytes and trigger IL-12, the production of which induces IFN- γ by T cells. Furthermore, the IL-12-mediated IFN- γ production by non-TCR-activated CD4⁺ T cells in this coculture system is partly IL-15-dependent. These data provide a potential mechanism of inflammatory T cell activation in chronic disorders that are dominated by a Th1 response, such as RA or sarcoidosis. Indeed, IL-15 is present in significant quantities in the inflamed synovium of patients with RA, which is in contrast to the relative absence of IL-2 (12). Similarly, bronchoalveolar lavage cells from patients with sarcoidosis express elevated levels of IL-12, IL-15, and IFN- γ mRNA (19, 20).

Previous studies indicated that synovial T cells costimulated by IL-15, TNF- α , and IL-6 induce TNF- α production by monocytes, contributing to the excessive TNF- α observed in RA joints (21). Here, we show that stimulation of CD4⁺ T cells by IL-15 alone is sufficient to trigger IL-12 release by monocytes and to allow IFN- γ production. The production of IL-12 in the IL-15-stimulated cocultures required a CD40/CD154-dependent interaction between the T cells and the monocytes. Thus, the ability of IL-15 to promote IL-12 in this system appears to be indirect and may be due in part to its ability to up-regulate CD40 expression on the monocytes and enhance the production of IFN- γ by CD4⁺ T cells. In that regard, we (22) and others (23) have demonstrated previously that

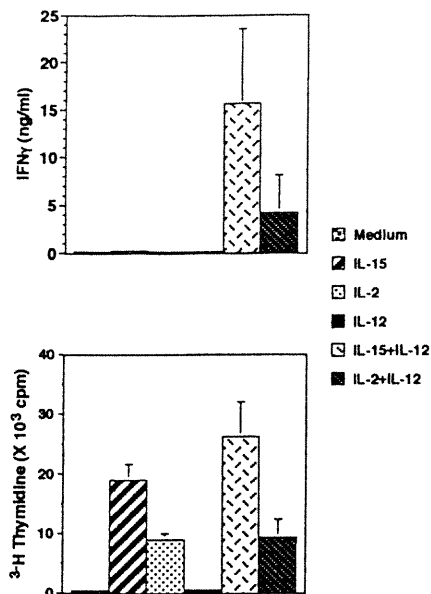


FIGURE 6. Regulatory effect of IL-15, IL-2, and IL-12 on proliferation and IFN- γ production by purified CD4⁺ T lymphocytes. Purified CD4⁺ T lymphocytes were stimulated with IL-15 (100 ng/ml), IL-2 (50 U/ml), or IL-12 (60 pM) alone or in combination. Culture supernatants were collected after 5 days for measurement of IFN- γ secretion. After 5 days of culture, proliferation of CD4⁺ T lymphocytes was assessed by [³H]thymidine incorporation. Data represent the mean \pm SD of three experiments.

T cells activated through a TCR/CD3 complex induce IL-12 production by IFN- γ and GM-CSF-treated monocytes via a CD40-dependent pathway. Indeed, IFN- γ and GM-CSF reportedly up-regulate CD40 on monocytes (24). Our results show that unstimulated CD4⁺ but not CD8⁺ T cells readily express CD154 at a sufficient level to engage CD40 on monocytes and to trigger IL-12 release in the presence of IL-15, confirming and extending our recent studies with IL-2-stimulated, unfractionated T cells (14) and underlying the failure of CD8⁺ T cells to promote IL-12 secretion.

The failure of anti-IL-12 Ab to inhibit the IL-15-induced IFN- γ secretion by >70% suggests that IL-12 may not be the only factor involved in this response and is consistent with the ability of neu-

tralizing anti-IFN- γ mAb to reduce IL-15-induced IL-12 release in this coculture system. Therefore, we propose that IL-15 or IL-2 contributes to the enhanced CD154/CD40 interactions at the early step of the cultures leading to IL-12 (and possibly other monokines) and IFN- γ production. The small amount of IFN- γ produced via an IL-12-independent pathway will subsequently prime for increased IL-12 production and enhance CD40 expression, resulting in a further increase in IFN- γ secretion and in the triggering of an amplification loop of proinflammatory cytokine secretion. Recent data published during the course of this study (25) showed that IL-15-induced IFN- γ by anti-CD3 activated T cells largely depended upon APC-derived endogenous IL-12, strongly supporting our present data.

Next, we provide evidence that IL-15 is involved not only in IL-12 production in the T cell/monocyte cocultures but is also required to synergize with IL-12 to induce IFN- γ by the CD4⁺ T cells. IL-15 increases the IL-12R β 1 chain on purified CD4⁺ T cells and supports their IL-12-induced IFN- γ secretion. Wu et al. (26) reported that IL-15 and IL-2 up-regulated the IL-12R β chain on PBMCs without defining the target cell subpopulations. Note that purified, resting CD4⁺ T cells are unable to secrete IFN- γ following IL-15 or IL-12 stimulation, while IL-12 reportedly stimulates IFN- γ production by activated T and NK cells (27, 28). In such a case, an optimal IL-12 response by T cells required the expression of costimulatory molecules, including CD80, CD86, or CD58 on APCs (29–31). In keeping with these studies, our data indicate that IL-15 or IL-2 strongly synergizes with IL-12 to allow IFN- γ production by resting, purified CD4⁺ T cells. While this response is further enhanced upon contact with APCs, it does not involve interactions between CD80, CD86, and their ligands (15). Of interest, optimal concentrations of IL-15 induce T cell proliferation, which is not further amplified by IL-12. In that regard, recent studies by Kanegane et al. indicated that IL-15 increased [³H]thymidine uptake of memory but not naive resting CD4⁺ T cells (32).

Taken together, it appears that IL-15 may directly signal resting CD4⁺ T cell proliferation but not IFN- γ production. Kumaki et al. (33) reported that IL-15 down-regulated its own high-affinity binding sites while up-regulating the IL-2R α chain. Since the IL-15R α chain is required for high-affinity binding but not for signaling by IL-15, and because IL-2R β and IL-2R γ chains are the limiting and determining factors for IL-15 responsiveness (6–9), our present data suggest that IL-15 signals through the IL-2R β/γ complex to induce resting CD4⁺ T cell proliferation. In agreement with this

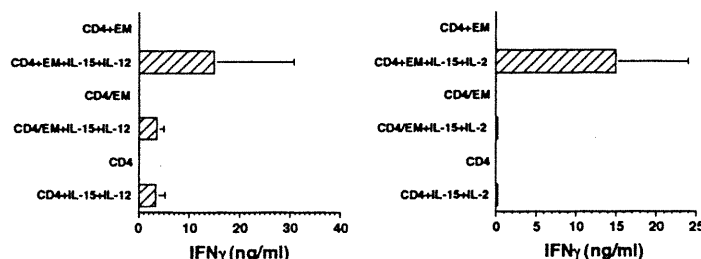


FIGURE 7. IFN- γ secretion by IL-15 and IL-12-stimulated purified CD4⁺ T cells is increased by contact with monocytes. Monocytes were cultured in wells, and CD4⁺ T lymphocytes were added either to the wells (T + EM) or to the well inserts (T/EM) as described in *Materials and Methods*. IL-15 was used at 100 ng/ml, IL-12 was used at 60 pM, and IL-2 was used at 50 U/ml. Culture supernatants were collected at 72 h and assessed for IFN- γ production. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

hypothesis. Agostini et al. reported that IL-15 signaled through the IL-2R β / γ complex to trigger the growth of CD4⁺ T cells in pulmonary sarcoidosis (20).

Ab neutralization demonstrated the involvement of monocyte-derived endogenous IL-15 in IL-12-mediated IFN- γ production by CD4⁺ T cells. In addition, exogenous IL-15 and IL-12 synergize to induce IFN- γ by purified CD4⁺ T cells. This synergistic effect is reminiscent of studies on NK cell activation. Indeed, IL-12 synergized with IL-15 or IL-2 to induce IFN- γ and TNF- α production by CD56^{dim} NK cells (9); however, this cytokine combination subsequently provoked apoptosis of the NK cells, providing a mechanism of IFN- γ production down-regulation (34). It is important to note that in the present report, purified T cells are composed of >99% CD3⁺ cells, and that IL-12 plus IL-15- or IL-2-stimulated monocyte preparations do not secrete IFN- γ (Ref. 35 and data not shown), largely excluding the possibility that IFN- γ production derives from a few contaminating NK cells.

That CD8⁺ T cells cocultured with monocytes in the presence of IL-15 or IL-2 do not produce IFN- γ likely results from their lack of CD154 expression and from a subsequent absence of IL-12 release in the cultures. However, this does not rule out the possibility that CD8⁺ T cells may respond to exogenous IL-12. IL-15 reportedly triggers the activation and growth of the CD8⁺ T cell pool in patients with HIV syndrome (36) and the proliferation of memory and naive resting CD8⁺ T cells (32). Also, our unpublished observations showed that IL-15 and IL-12 synergize to allow IFN- γ production by purified CD8⁺ T cells.

Although IL-12-induced IFN- γ production is suppressed by neutralizing anti-IL-15 mAb in the T cell/monocyte cocultures, we failed to demonstrate that IL-12 up-regulates IL-15 protein by monocyte preparations that were stimulated by bacterial Ag or left unstimulated. In contrast to the wide expression of IL-15 mRNA is the difficulty in documenting IL-15 protein in activated monocytes. First, LPS-stimulated IL-15 and IL-12 production by monocytes occurred after contact with NK cells (37). Second, endogenous IL-15 protein may be up-regulated in blood-derived dendritic cells following phagocytosis of immunomagnetic particles (38).

Taken together, the expression of IL-15 and IL-2 in different tissues and cells suggests that they may be effective at different times and/or different sites. As IL-2 is not produced by dendritic cells or monocytes, IL-15 could be a substitute molecule used instead to trigger and regulate the innate immune response. Upon bacterial or viral infection, IL-15 may act as a chemoattractant for T cells (12, 39), favor APC/T cell contact, and induce, in synergy with IL-12, IFN- γ production by inflammatory T cells (as shown in our present study) or by NK cells (9). As such, IL-15 could play a key role in the first line of host defense mechanisms. In support of this possibility, IL-15 is reportedly essential for activation of murine $\gamma\delta$ T cells during early *Salmonella* infection at a time when they do not yet produce IL-2 (40).

Acknowledgments

We thank Dr. M. Gately (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ) for providing us with IL-12 reagent. We are extremely grateful to Dr. M. Kennedy (Immunex Research and Development Corporation, Seattle, WA) for providing us with IL-15 reagents and for very helpful comments and suggestions. We thank Norma Del Bosco for her secretarial assistance.

References

- Grabstein, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh, L. Johnson, M. R. Alderson, J. D. Watson, D. M. Anderson, and J. G. Giri. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β -chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264:965.
- Bamford, R. N., A. P. Battiata, J. D. Burton, H. Sharma, and T. A. Waldmann. 1996. IL-15/IL-2 production by the adult T-cell leukemia HuT-102 is associated with an HTLV-1-R/IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuate IL-15 mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2897.
- Anderson, D. M., L. Johnson, M. B. Glaccum, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, V. Valentine, M. N. Kirstein, D. N. Shapiro, S. W. Morris, K. Grabstein, and D. Cosman. 1995. Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. *Genomics* 25:701.
- Onu, A., T. Pohl, H. Krause, and S. Bulfone-Paus. 1997. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J. Immunol.* 158:255.
- Bamford, R. N., A. J. Grant, J. D. Burton, C. Peters, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler, and T. A. Waldmann. 1994. The interleukin (IL-2) receptor β -chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4940.
- Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman, and D. Anderson. 1994. Utilization of the β - and γ -chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 13:2822.
- Giri, J. G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D. J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R. Dubose, D. Cosman, L. S. Park, and D. M. Anderson. 1995. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α -chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* 14:3654.
- Burton, J. D., R. N. Bamford, C. Peters, A. J. Grant, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler, and T. A. Waldmann. 1994. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4935.
- Carson, W. E., J. G. Giri, M. J. Lindemann, M. L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenman, K. Grabstein, and M. A. Caligiuri. 1994. Interleukin (IL)-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180:1395.
- Carson, W. E., T. A. Fehniger, S. Haldar, K. Eckhart, M. J. Lindemann, C. F. Lai, C. M. Croce, H. Baumann, and M. A. Caligiuri. 1997. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.* 99:937.
- Armitage, R. J., B. M. MacDuff, J. Eisenman, R. Paxton, and K. H. Grabstein. 1995. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. Immunol.* 154:483.
- McInnes, I. B., B. P. Leung, R. D. Sturrock, M. Field, and F. Y. Liew. 1997. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 3:189.
- Carson, D. A. 1997. Unconventional T-cell activation by IL-15 in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 3:148.
- Armant, M., R. Armitage, N. Boiani, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1996. Functional CD40 ligand expression on T lymphocytes in the absence of T cell receptor engagement: involvement in interleukin-2-induced interleukin-12 and interferon- γ production. *Eur. J. Immunol.* 26:1430.
- Armant, M., M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1995. Soluble CD23 directly activates monocytes to contribute to the antigen-independent stimulation of resting T cells. *J. Immunol.* 155:4868.
- Armant, M., H. Ishihara, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1994. Regulation of cytokine production by soluble CD23: costimulation of interferon γ secretion and triggering of tumor necrosis factor α release. *J. Exp. Med.* 180:1005.
- Chehimi, J., J. D. Marshall, O. Salvucci, I. Frank, S. Chehimi, S. Kaweck, D. Bagheller, S. Rifat, and S. Chouaib. 1997. IL-15 enhances immune functions during HIV infection. *J. Immunol.* 158:5978.
- Chae, D.-W., Y. Nosaka, T. B. Strom, and W. Maslinski. 1996. Distribution of IL-15 receptor α -chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *J. Immunol.* 157:2813.
- Moller, D. R., J. D. Forman, M. C. Liu, P. W. Noble, B. M. Greenlee, P. Vyas, D. A. Holden, J. M. Forrester, A. Lazarus, M. Wysocka, G. Trinchieri, and C. Karp. 1996. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 156:4952.
- Agostini, C., L. Trentin, M. Faccio, R. Sancezza, A. Cerutti, C. Tassinari, L. Cimarosto, F. Adami, A. Cipriani, R. Zambello, and G. Semenzato. 1996. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 157:910.
- Sebbag, M., S. L. Parry, F. M. Brennan, and M. Feldmann. 1997. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor- α , but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 27:624.
- Shu, U., M. Kuniwa, C. Y. Wu, C. Maliszewski, N. Vezzio, J. Hakimi, M. Gately, and G. Delespesse. 1995. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* 25:1125.
- Kennedy, M. K., K. S. Picha, W. C. Fanslow, K. H. Grabstein, M. R. Alderson, K. N. Clifford, W. A. Chin, and K. M. Mohler. 1996. CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur. J. Immunol.* 26:370.
- Alderson, M. R., R. J. Armitage, T. W. Tough, L. Strockbine, W. C. Fanslow, and M. K. Spriggs. 1993. CD40 expression by human monocytes: Regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* 178:669.
- Körholz, D., U. Banning, H. Bönig, M. Grewe, M. Schneider, C. Mauz-Körholz, A. Klein-Vehne, J. Krutmann, and S. Burdach. 1997. The role of interleukin-10 (IL-10) in IL-15-mediated T-cell responses. *Blood* 90:4513.

26. Wu, C. Y., R. R. Warriar, X. Wang, D. H. Presky, and M. K. Gately. 1997. Regulation of interleukin-12 receptor β 1-chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* 27:147.
27. Perussia, B., S. H. Chan, A. D'Andrea, K. Tsuji, D. Santoli, M. Pospisil, D. Young, S. F. Wolf, and G. Trinchieri. 1992. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR- $\alpha\beta^+$, TCR- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes, and NK cells. *J. Immunol.* 149:3495.
28. Chan, S. H., B. Perussia, J. W. Gupta, M. Kobayashi, M. Pospisil, H. A. Young, S. F. Wolf, D. Young, S. C. Clark, and G. Trinchieri. 1991. Induction of interferon γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 173:869.
29. Kubin, M., M. Kamoun, and G. Trinchieri. 1994. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J. Exp. Med.* 180:211.
30. Gollob, J. A., J. Li, E. L. Reinherz, and J. Ritz. 1995. CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin 12. *J. Exp. Med.* 182:721.
31. Gollob, J. A., J. Li, H. Kawasaki, J. F. Daley, C. Groves, E. L. Reinherz, and J. Ritz. 1996. Molecular interaction between CD58 and CD2 counter-receptors mediates the ability of monocytes to augment T cell activation by IL-12. *J. Immunol.* 157:1886.
32. Kanegane, H., and G. Tosato. 1996. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* 88:230.
33. Kumaki, S., R. Armitage, M. Ahdieh, L. Park, and D. Cosman. 1996. Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor α -chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells. *Eur. J. Immunol.* 26:1235.
34. Ross, M. E., and M. A. Caligiuri. 1997. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 89:910.
35. Vezzio, N., M. Sarfati, L.-P. Yang, C. E. Demeure, and G. Delespesse. 1996. Human Th2-like cell clones induce IL-12 production by dendritic cells and may express several cytokine profiles. *Int. Immunol.* 8:1963.
36. Agostini, C., L. Trentin, R. Sancetta, M. Facco, C. Tassinari, A. Cerutti, M. Bortolin, A. Milani, M. Siviero, R. Zambello, and G. Semenzato. 1997. Interleukin-15 triggers activation and growth of the CD8 T-cell pool in extravascular tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 90:1115.
37. Carson, W. E., M. E. Ross, R. A. Baiocchi, M. J. Marien, N. Boiani, K. Grabstein, and M. A. Caligiuri. 1995. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- γ by natural killer cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 96:2578.
38. Jonuleit, H., K. Wiedemann, G. Müller, J. Degwert, V. Hoppe, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J. Immunol.* 158:2610.
39. Wilkinson, P. C., and F. Y. Liew. 1995. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J. Exp. Med.* 181:1255.
40. Nishimura, H., K. Hiromatsu, N. Kobayashi, K. H. Grabstein, R. Paxton, K. Sugamura, J. A. Bluestone, and Y. Yoshikai. 1996. IL-15 is a novel growth factor for murine $\gamma\delta$ T cells induced by *Salmonella* infection. *J. Immunol.* 156:663.

Article 2

Lymphocyte Activation Gene-3, a MHC Class II Ligand Expressed on Activated T Cells, Stimulates TNF- α and IL-12 Production by Monocytes and Dendritic Cells

Marie-Noëlle Avice, Marika Sarfati, Frederic Triebel, Guy Delespesse,
and Christian E. Demeure

J. Immunol. 1999. **162**: 2748-2753

Dans ce deuxième article, nous avons étudié une autre molécule, soit LAG-3, impliquée positivement dans la production d'IL-12 par les cellules présentatrices de l'antigène humaines. L'équipe de Koch *et al.* (1996) avait rapporté que l'engagement du CMH de classe II par un anticorps monoclonal induit la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques. Puisque la molécule LAG-3 a pour ligand naturel le CMH de classe II, nous avons alors émis l'hypothèse que l'interaction LAG-3 - CMH de classe II pouvait représenter une seconde approche utilisée par les lymphocytes T inflammatoires, en plus de l'interaction du CD154 avec le CD40, pour induire la synthèse d'IL-12 par les monocytes et les cellules dendritiques humaines. Ces résultats sont innovateurs, car ils démontrent que de façon similaire au CD154, la molécule LAG-3 participe à l'activité pro-inflammatoire des lymphocytes T non activés par le TCR. Ma contribution à cette étude représente 70% du travail expérimental.

Lymphocyte Activation Gene-3, a MHC Class II Ligand Expressed on Activated T Cells, Stimulates TNF- α and IL-12 Production by Monocytes and Dendritic Cells¹

Marie-Noëlle Avice,* Marika Sarfati,* Frederic Triebel,[†] Guy Delespesse,* and Christian E. Demeure^{2*}

Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) is an MHC class II ligand structurally and genetically related to CD4. Although its expression is restricted to activated T cells and NK cells, the functions of LAG-3 remain to be elucidated. Here, we report on the expression and function of LAG-3 on proinflammatory bystander T cells that are activated in the absence of TCR engagement. LAG-3 is expressed at high levels on human T cells cocultured with autologous monocytes and IL-2 and synergizes with the low levels of CD40 ligand (CD40L) expressed on these cells to trigger TNF- α and IL-12 production by monocytes. Indeed, anti-LAG-3 mAb inhibits both IL-12 and IFN- γ production in IL-2-stimulated cocultures of T cells and autologous monocytes. Soluble LAG-3Ig fusion protein markedly enhances IL-12 production by monocytes stimulated with infra-optimal concentrations of sCD40L, whereas it directly stimulates monocyte-derived dendritic cells (DC) for the production of TNF- α and IL-12, unravelling an enhanced responsiveness to MHC class II engagement in DC as compared with activated monocytes. Thus similar to CD40L, LAG-3 may be involved in the proinflammatory activity of cytokine-activated bystander T cells and most importantly it may directly activate DC. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 2748–2753.

Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)³ is an MHC class II ligand that is structurally related to CD4 (1, 2). Like CD4, LAG-3 was recently found to associate with the CD3-TCR complex (3). In spite of these similarities, LAG-3 differs from CD4 in several regards. It has higher affinity than CD4 for MHC class II molecules (4), and whereas CD4 transduces signals via the protein tyrosine kinase *lck* (5), the intracytoplasmic tail of LAG-3 has no site to interact with *lck* (6). Unlike CD4, LAG-3 is not expressed on resting T cells but is readily induced on activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as NK cells (2, 7). The expression of LAG-3 on human T cells correlates with their capacity to produce IFN- γ and is up-regulated by IL-2 and IL-12 (8, 9). In vivo, it has been detected in lymphoid tissues (10) and on T cells infiltrating renal cell carcinoma (11).

The function of LAG-3 has not been investigated thoroughly. LAG-3 seems to have the capacity to exert both effector and receptor activities. It was reported to transduce a positive signal into LAG-3⁺ NK cells, as indicated by the defective killing of certain

tumor targets by NK cells from LAG-3^{-/-} mice (12). However, blocking LAG-3-MHC class II interactions with a neutralizing anti-LAG-3 mAb fails to inhibit Ag-driven T cell cytotoxicity and MLR, suggesting that LAG-3 does not provide a positive signal in TCR-driven interactions (10). Conversely, LAG-3 cross-linking on activated T cells before restimulation via the CD3-TCR complex induces a state of unresponsiveness at both proliferation and cytokine production levels (3). Finally, during T-T cell interaction, MHC class II engagement by LAG-3 was found to provide a negative signal leading to decreased proliferation and cytokine production (6).

Here, we first report on the role of LAG-3 in the cytokine-driven activation of T cells cocultured with autologous monocytes in the absence of TCR/CD3-mediated stimulation. We show that T cells express LAG-3 and that LAG-3-MHC class II interaction, together with CD40-CD40 ligand (CD40L) interaction, is involved in both IL-12 and IFN- γ production. Blocking LAG-3/MHC contact with anti-LAG-3 mAb not only suppresses the positive signal given to monocytes via MHC class II but also inhibits T cell response to IL-12. In addition, we show that recombinant soluble LAG-3 (LAG-3Ig) dose-dependently induces TNF- α production and costimulates sCD40L-induced IL-12 production by monocytes. Most interestingly, LAG-3Ig also directly stimulates dendritic cells (DC) to produce both IL-12 and TNF- α without additional stimulatory or costimulatory signal.

Materials and Methods

Reagents and cell lines

sLAG-3Ig molecules produced in Chinese hamster ovary cells as described (6) were kindly provided by M. Subramanyam and M. Tepper (Ares Advanced Technology, Randolph, MA). Preparations contained no detectable endotoxin (<15 pg/ml) as determined by the Limulus amoebocyte lysate assay (QCL-100; BioWhittaker, Walkersville, MD). The anti-LAG-3 mAb 17B4 was previously described (2), and the anti-CD3 UCHT-1 was kindly provided by Dr. P. Beverley (University College and Middlesex School of Medicine, London, U.K.). PHA was from Sigma (St. Louis, MO), and the tuberculin purified protein derivative was from BCG Seizo (Tokyo, Japan). The blocking goat anti-human IL-12 Ab and rIL-2 were kind gifts from Dr.

*Laboratoire de Recherche sur l'Allergie, Université de Montréal, Centre de Recherche Louis-Charles Simard, Montréal, Québec, Canada; and [†]Unité d'Immunologie Cellulaire, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France

Received for publication July 21, 1998. Accepted for publication December 1, 1998.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (to C.E.D.) and from the Medical Research Council of Canada (to G.D.). M.-N.A. is recipient of an Fonds de la Recherche en Santé du Québec-Fonds de la Recherche en Santé du Québec-Santé student award. M.S. is a Medical Research Council of Canada Scientist, and C.E.D. is a Fonds de la Recherche en Santé du Québec Scholar.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Christian E. Demeure, Laboratoire de Recherche sur l'Allergie, Université de Montréal, CHUM Pavillon Notre-Dame, porte M4211-K, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, H2L 4 M1, Canada. E-mail address: demeuere@poste.umontreal.ca

³ Abbreviations used in this paper: LAG-3, lymphocyte activation gene-3; LAG-3Ig, LAG-3 immunoadhesin; DC, dendritic cells; GM-CSF, granulocyte-macrophage CSF; PE, phycoerythrin; CD40L, CD40 ligand; s, soluble.

M. Gately and F. K. Kahn, respectively (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ). sCD40L and IL-4 were kindly provided by Dr. C. Maliszewski (Immunex, Seattle, WA), and recombinant granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF) was provided by Dr. D. Bron (Bordet Institute, Brussels, Belgium).

Purification of human monocytes and generation of monocyte-derived DC

Monocytes were obtained by aggregation of adult PBMCs in the cold (13) and were depleted of T cells by rosetting on 2-aminoethylisothiuronium bromide (AET)-treated SRBC as previously described (14). The resulting preparations were >95% CD14⁺ as determined by FACS (Becton Dickinson, Mountain View, CA) using phycoerythrin- (PE-) conjugated anti-CD14 mAb (Ancell, London, Canada). Autologous T cells were purified by rosetting the monocyte-depleted PBMC with AET-SRBC followed by Lympho-Kwik T treatment (One Lambda, Canoga Park, CA).

Human immature DC were prepared as described (15–17). Briefly, monocytes were incubated in 6-well culture plates (5×10^6 cells/3 ml per well) in serum-free RPMI 1640. After 1 h, nonadherent cells were removed and adherent cells were cultured in 3 ml of complete RPMI 1640 medium supplemented with 25 ng/ml GM-CSF and 25 ng/ml IL-4. On day 4, one-half of the culture medium was replaced by fresh medium containing GM-CSF and IL-4, and nonadherent cells were harvested on day 7. Upon microscopic analysis, >98% nonadherent cells presented cellular projections. Analysis by FACS revealed that preparations consisted in a homogenous (>96%) population of CD2⁺, CD14^{low}+, CD16⁺, CD40⁺, CD54⁺, CD80⁺, CD83^{low}+, CD86⁺, CD115⁺, and HLA-DR⁺ large cells, in agreement with previous reports (15–17). Less than 1% of CD3⁺, CD19⁺, or CD56⁺ cells could be detected.

Culture conditions

All cultures were performed in complete HB101 medium (Irvine, Santa Ana, CA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 100 IU penicillin, 100 µg/ml streptomycin (BioWhittaker), and 10 µg/ml Polymyxin B (Sigma).

For coculture experiments, T cells (10^6 /ml) were incubated with autologous monocytes (0.2×10^6 /ml) and IL-2 (50 IU/ml). Cell supernatant was collected at day 3 and DNA synthesis at that time was assessed by the addition of [³H]thymidine (1 mCi/well; Amersham, Arlington Heights, IL) for 6 h before harvesting the cells and counting incorporated radioactivity by liquid scintillation. T cell cultures in the presence of IL-1 and IL-12 were performed exactly as described (19). The anti-LAG-3 mAb 17B4 and its isotype-matched control (anti-CD5, clone OKT1; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were used in culture at 5 µg/ml. Neither anti-CD5 nor a control mAb of the same isotype not binding to T cells (anti-Rye, prepared in our laboratory) affected proliferation or cytokine production. When cultured alone, monocytes (2×10^6 /ml) were preincubated overnight in the presence of GM-CSF (25 ng/ml) and IFN-γ (500 IU/ml) as previously reported (18) before stimulation at 10^6 /ml. DC were also stimulated at 10^6 /ml.

Cytofluorometric analysis

Binding of LAG-3Ig to monocytes and DC was assessed by indirect immunofluorescence. Briefly, preactivated monocytes or DC were incubated with LAG-3Ig (5 µg/ml) in the presence of normal human IgG (300 µg/ml) for 1 h at 4°C. Cells were then stained with biotinylated Goat anti-human IgG (Tago, Burlingame, CA) for 1 h at 4°C followed by PE-labeled streptavidin (Ancell). Expression of LAG-3 and CD40L was assessed using anti-LAG-3 mAb clone 17B4 (2) and anti-CD40L mAb clone 90 (13) respectively, or isotype matched control mAb (anti-Rye), at 5 µg/ml in the presence of normal human IgG (300 µg/ml) for 1 h at 4°C. The cells were then stained with biotinylated goat anti-mouse IgG (Tago) for 1 h at 4°C followed by PE-streptavidin. Stained cells were analyzed using a FACScan (Becton Dickinson). To assess the purity of cellular preparations, fluorochrome-coupled mAbs to CD2, CD16, CD19, CD40, CD54, CD56, CD86, and isotype-matched negative controls (all from Ancell) were used; mAb against CD80 and CD83 mAbs were from Immunotech (Coulter, Burlington, Ontario, Canada). The rat anti-CD115 was used in tandem with FITC-coupled goat anti-rat IgG (both from Zymed, San Francisco, CA).

Cytokine measurement

TNF-α was measured by two-site sandwich ELISA, and IFN-γ was determined by a solid phase RIA as previously described (20). IL-12 was detected as previously reported (18) using Ab kindly provided by Dr. M. Gately (Hoffmann-La Roche). The anti-IL10 assay has been previously described (21), and anti-IL-10 rat mAb were obtained from American Type Culture Collection.

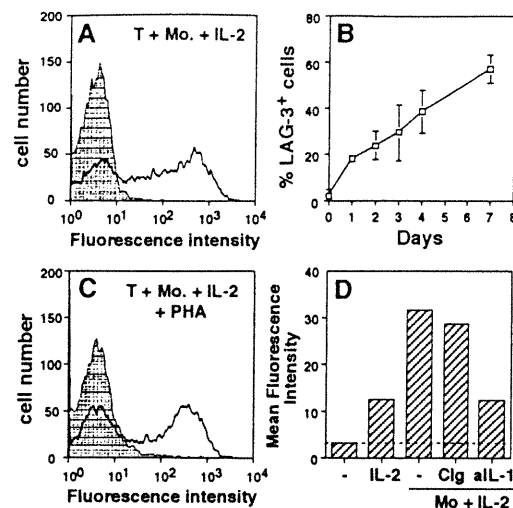


FIGURE 1. Induction of LAG-3 expression on T cells in the absence of TCR engagement. Peripheral blood T cells (10^6 cells/ml) were cocultured with autologous monocytes (Mo, 0.2×10^6 cells/ml) and IL-2 (50 U/ml). LAG-3 expression on T cells was assessed by immunofluorescence using the anti-LAG-3 mAb 17B4. **A**, LAG-3 expression at day 7. **B**, Time course expression of LAG-3. **C**, LAG-3 expression at day 7 obtained in the same conditions as in **A** except that the cultures were supplemented with 0.1% PHA. **D**, LAG-3 expression by T cells cultured with the indicated additives for 5 days. Goat anti-IL-12 and control goat IgG were used at 5 µg/ml. The dotted line indicates control staining mean fluorescence intensity. Identical results were obtained in two additional experiments.

Statistical analysis

Wilcoxon's test was performed using the Instat Software (GraphPad, San Diego, CA), where * = $p < 0.05$ ** = $p < 0.005$.

Results

Expression and function of LAG-3 on human T cells stimulated with IL-2 in the presence of autologous monocytes

In previous studies, LAG-3 was found to be expressed on TCR-activated T cells. In the experiments summarized in Fig. 1, primary T cells isolated from blood of healthy donors were cocultured with autologous monocytes in the presence of exogenous IL-2 (50 U/ml) and the expression of LAG-3 was monitored daily by flow cytometry. LAG-3 is absent from resting T cells, becomes detectable after 24 h of culture, and is expressed on 60% of the cells at day 7 (Fig. 1, **A** and **B**). LAG-3 is expressed on T cells and not on monocytes as revealed by two-color analysis (data not shown). Interestingly, the level of LAG-3 on IL-2-stimulated T cells is not increased by the addition of PHA (Fig. 1, **A** and **C**). Thus LAG-3 may be expressed at high levels in the absence of TCR signaling. Optimal induction of LAG-3 is dependent on both exogenous IL-2 and endogenous IL-12; indeed, IL-2 induces low levels of LAG-3 on purified T cells in the absence of monocytes, and anti-IL-12 significantly reduces its expression (Fig. 1D).

T cells cocultured with autologous monocytes and IL-2 proliferate and secrete IFN-γ by a mechanism involving CD40-CD40L interaction and IL-12 production (13). To examine the role of LAG-3 in this TCR-independent T cell activation, cultures were supplemented with neutralizing anti-LAG-3 mAb. As seen in Fig. 2, anti-LAG-3 inhibits T cell proliferation (42% suppression) and the production of both IFN-γ (83% suppression) and IL-12 (56%

2750

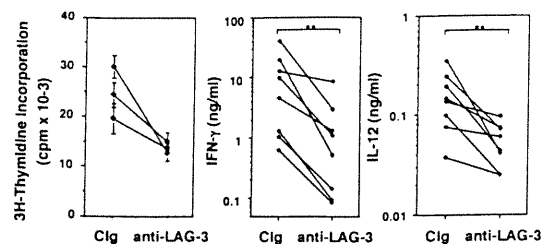


FIGURE 2. Inhibition of T-monocyte interaction by a blocking anti-LAG-3 mAb. T cells were cocultured with autologous monocytes and IL-2 in the presence of the anti-LAG-3 mAb 17B4 or isotype-matched negative control (noted Clg) mAb (both at 5 μ g/ml). After 3 days, culture supernatants were collected for assessment of IFN- γ and IL-12 levels, and cellular proliferation was measured by the addition of [3 H]thymidine for 16 h.

inhibition). Anti-CD5 mAb, used as an IgG1 isotype control that also binds to T cells, has no effect. Anti-LAG-3 mAb does not inhibit IL-12 production by down-regulating CD40L expression or by inducing the release of IL-10, which remained undetectable (data not shown). Therefore, it was possible that anti-LAG-3 suppressed IL-12 production by inhibiting the interaction between LAG-3 on T cells and MHC class II molecules on monocytes. Indeed, ligation of MHC class II on murine DC by means of Abs was shown to stimulate IL-12 production (22).

To determine whether the suppressive effect of anti-LAG-3 mAb on IFN- γ production results only from IL-12 inhibition, we next examined whether it could be over-riden by exogenous IL-12. These experiments (Fig. 3A) reveal that in addition to suppressing IL-12 production, anti-LAG-3 mAb also inhibits the response of T cells to IL-12 (51% suppression). This effect is confirmed by the finding that anti-LAG-3 mAb inhibits IFN- γ production (69% suppression) by highly purified CD4 $^+$ T cells stimulated with both IL-12 and IL-1 (Fig. 3B).

Recombinant LAG-3 induces TNF- α and costimulates IL-12 production by monocytes

To directly examine whether LAG-3 may regulate or stimulate cytokine production by monocytes, these cells were first allowed to up-regulate MHC class II molecules by overnight culture in the

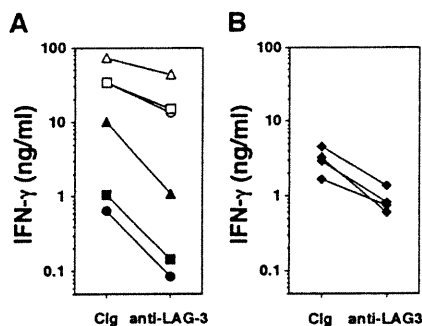


FIGURE 3. Inhibition of T cell response to IL-12 by anti-LAG-3 mAb. T cells were cocultured with either (A) autologous monocytes and IL-2 in the presence (open symbols) or absence (corresponding filled symbols) of exogenous IL-12 (50 pM) or (B) IL-12 (50 pM) and IL-1 (10 U/ml). Anti-LAG-3 mAb 17B4 or isotype-matched control (noted Clg) mAb (both at 5 μ g/ml) were added as indicated. Culture supernatants were collected at day 3 (A) or day 5 (B) for assessment of IFN- γ levels.

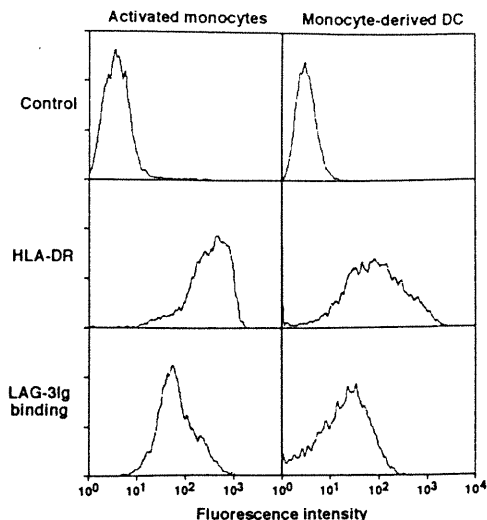
LAG-3-DEPENDENT TNF- α AND IL-12 RELEASE BY APC

FIGURE 4. Comparison between MHC class II expression and LAG-3Ig binding. Monocyte-derived DC and monocytes preactivated with GM-CSF + IFN- γ were stained with LAG-3Ig (25 μ g/ml) for 1 h on ice, then with biotinylated goat anti-human IgG, which was revealed by streptavidin-PE. In parallel, HLA-DR was detected using a commercial PE-coupled Ab.

presence of GM-CSF and IFN- γ (23). As seen in Fig. 4, the cells express elevated levels of MHC class II that correlate with a strong capacity to bind LAG-3Ig. Such activated monocytes were then stimulated with either sCD40L, LAG-3Ig, or both. As expected, sCD40L induces the production of both TNF- α and IL-12 (Fig. 5, A and B), whereas LAG-3Ig stimulates only the release of TNF- α . However and most interestingly, LAG-3Ig markedly costimulates IL-12, as well as TNF- α , production in response to suboptimal concentrations of sCD40L, and this effect is dose-dependent (Fig. 5B). The enhancing effect of LAG-3Ig on sCD40L-induced IL-12 production is observed only when sCD40L is used at an infraoptimal concentration (Fig. 6). The ability of LAG-3Ig to markedly enhance IL-12 production in response to suboptimal but not optimal sCD40L stimulation may explain the suppressive effect of anti-LAG-3 mAb on IL-12 production in IL-2-stimulated cocultures of CD4 $^+$ T cells and autologous monocytes. Indeed, in these cultures T cells express very low, albeit functionally significant, levels of CD40L (13). These observations may also account for the finding that the same anti-LAG-3 mAb fails to inhibit IFN- γ production when T cells are activated with Ag or mitogen (Table I), stimuli known to induce high levels of CD40L expression (24). These effects of LAG-3Ig on monocytes are specific inasmuch as they are prevented (75%) by preincubation of LAG-3Ig with anti-LAG-3 mAb (Table II).

LAG-3Ig stimulates IL-12 production by monocyte-derived DC

Because DC are an important source of IL-12 and express high levels of MHC class II, we next examined the ability of LAG-3Ig to stimulate IL-12 production by monocyte-derived DC. Whereas LAG-3Ig binds similarly to monocyte-derived DC and to activated monocytes (Fig. 4), LAG-3Ig directly and dose-dependently induces the production of IL-12 as well as TNF- α by monocyte-derived DC (Fig. 7, A and B) and costimulates the production of these cytokines, induced by a low dose of sCD40L. These effects of LAG-3Ig on DC are specific inasmuch as they are prevented

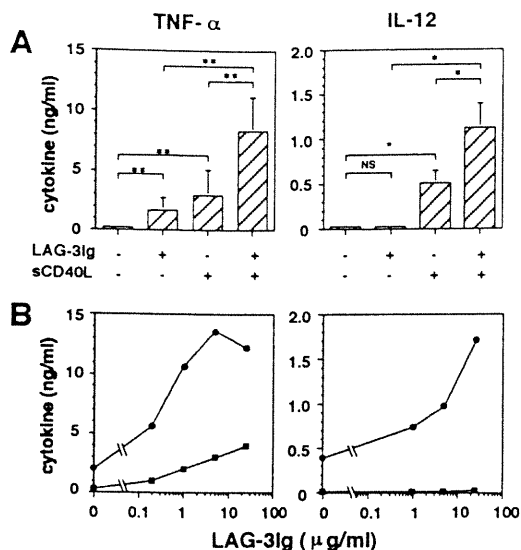


FIGURE 5. LAG-3Ig induces TNF- α release and costimulates CD40L-induced IL-12 production by human monocytes. *A*, GM-CSF + IFN- γ -activated monocytes were stimulated with LAG-3Ig (5 μ g/ml) and/or sCD40L (0.2 μ g/ml) and supernatants were analyzed after 24 h for TNF- α production ($n = 8$) and after 72 h for IL-12 production ($n = 4$). The mean \pm SD is shown. *B*, GM-CSF + IFN- γ -activated monocytes were stimulated with graded doses of LAG-3Ig in the presence (circles) or absence (squares) of sCD40L (0.2 μ g/ml) as above. Shown is one representative experiment of three.

(95%) by the preincubation of LAG-3Ig with anti-LAG-3 mAb (Table II).

Discussion

In addition to their essential role in innate and adaptive protective immunity, IL-12, TNF- α , and IFN- γ are also implicated in Th1-mediated chronic inflammatory diseases (25). These are presumably initiated by Ag-specific T cells, and recent evidence (26) further suggests that they may be amplified and perhaps also perpetuated by bystander T cells of unrelated Ag specificity that

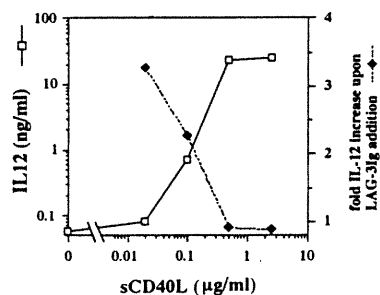


FIGURE 6. LAG-3Ig only costimulates IL-12 production induced by suboptimal doses of sCD40L. Monocytes were stimulated with graded doses of sCD40L in the presence or absence of LAG-3Ig (10 μ g/ml), and supernatants were analyzed after 72 h for IL-12 production. Shown is IL-12 production induced by sCD40L alone (squares) as well as the increase in IL-12 production due to the presence of LAG-3Ig (diamonds) calculated as the ratio of IL-12 value with LAG-3Ig/IL-12 value without LAG-3Ig.

Table I. Anti-LAG-3 Ab inhibits IFN- γ production by T cells induced without TCR-CD3 engagement^a

Expt. No.	Conditions	IFN- γ (pg/ml) ^b	
		Control Ab	Anti-LAG-3 Ab
1	T cells + Mo + IL-2	2,815	654
	T cells + Mo + IL-2 + anti-CD3	43,450	52,910
2	T cells + Mo + IL-2	37,557	13,020
	T cells + Mo + IL-2 + anti-CD3	71,225	50,223
3	T cells + allogenic DC + IL-2	2,051	1,709
4	PBMC + PPD	3,613	3,899
5	PBMC + PPD	7,211	4,647

^a T cells purified from peripheral blood were stimulated with either syngenic monocytes (Mo) and IL-2 (50 U/ml) with or without anti-CD3 mAb (UCHT-1, 200 ng/ml) or allogenic monocyte-derived DC and IL-2 (50 U/ml). PBMC were stimulated with purified protein derivative (PPD) (2 μ g/ml) only. Cultures were performed in the presence of anti-LAG-3 mAb 17B4 or its isotype-matched control (10 μ g/ml). ^b Supernatants were collected after 4 days for IFN- γ measurement.

constitute the majority of the lesional T lymphocyte infiltrate. Our previous in vitro studies have suggested a mechanism accounting for the activation of bystander T cells. Resting peripheral blood T cells were shown to be stimulated for proliferation and IFN- γ production during coculture with autologous monocytes in the presence of either IL-2 or IL-15, a non-T cell-derived cytokine that is produced at inflammatory sites. Such TCR-independent T cell activation is dependent upon endogenous IL-12 and TNF- α production by monocytes that in turn requires the engagement of monocyte-associated CD40 with T cell-associated CD40L. The latter was shown to be expressed at very low but functionally sufficient levels on freshly isolated primary T cells in the absence of TCR/CD3 signal (13). The present results show that LAG-3 is expressed on cytokine-activated "bystander" T cells and that it regulates their proinflammatory activity. Addition of neutralizing anti-LAG-3 mAb suppresses both endogenous production of IL-12 and T cell response to IL-12. The ability to block IL-12 production by either anti-LAG-3 or anti-CD40L mAbs (13) suggests that the LAG-3/MHC class II and CD40/CD40L signaling pathways act in synergy to induce IL-12 production in this culture system. This view is supported by the finding that LAG-3Ig markedly costimulates IL-12 production in response to suboptimal concentrations of sCD40L trimer and allows the production of IL-12 in response to suboptimal sCD40L stimulation. In contrast to IL-12, the production of TNF- α is directly triggered by LAG-3Ig without CD40L stimulation, underlining the differential regulation of these cytokines. In addition to their well-defined functions as peptide-presenting structures and response restriction elements, MHC class II molecules can also transduce signals in the APCs on which they are expressed (27, 28). Cross-linking of MHC class II molecules has been reported to up-regulate TNF- α expression (29–32) as well as IL-1, IL-6, and nitric oxide production by myeloid cells (30, 33, 34) and to induce IL-12 production by murine DC (22). Most interestingly, the enhancing effect of LAG-3Ig on IL-12 production is observed only with suboptimal, and not with optimal, CD40L stimulation. This is consistent with the observations (Ref. 10 and Table I) that anti-LAG-3 mAb does not suppress IFN- γ production by Ag- or mitogen-stimulated T cells, which express much more CD40L than cytokine-activated cells (24). Addition of exogenous IL-12 only partly overcomes the suppressive effect of anti-LAG-3 mAb on IFN- γ production in the T cell/monocyte coculture system, indicating that ligation of T cell-associated LAG-3 inhibits the response to IL-12. This inhibition might result from two mechanisms. First, the blockade of LAG-3-MHC class II interaction may inhibit response to IL-12; this view implies that

Table II. Specific inhibition of LAG-3Ig-induced cytokine production by anti LAG-3 Ab.^a

Expt. No.	Culture	Stimulus	Ab Added	Cytokine Production (pg/ml) ^b	
				TNF- α	IL-12
1	Mo.	LAG-3Ig	Control Ab	<100	<50
	Mo.	LAG-3Ig	Anti LAG-3	1,500	<50
	Mo.	LAG-3Ig	Anti LAG-3	386	<50
2	Mo.		Control Ab	<100	<50
	Mo.		Anti-LAG-3	<100	<50
	Mo.	sCD40L	Control Ab	2,300	8,920
	Mo.	sCD40L	Anti-LAG-3	2,208	9,580
	Mo.	LPS	Control Ab	1,988	14,460
	Mo.	LPS	Anti LAG-3	2,056	13,820
3	DC			62	232
	DC	LAG-3Ig	Control Ab	830	1,648
	DC	LAG-3Ig	Anti-LAG-3	88	292

^a Monocytes preincubated with GM-CSF and IFN- γ or monocyte-derived DC were stimulated with either LAG-3Ig (5 μ g/ml), sCD40L (0.2 μ g/ml) or LPS (1 μ g/ml) preincubated with either anti LAG-3 mAb 17B4 alone (50 μ g/ml; expts. 2 and 3) or a combination of two anti-LAG-3 mAbs (17B4 and 8F5, 25 μ g/ml each; expt. 1) or adequate isotype-matched controls or medium for 2 h at 4°C.

^b supernatants were collected after 24 h for TNF- α measurement and 72 h for IL-12 measurement. Each experiment shown is representative of at least two experiments.

engagement of LAG-3 by its ligand expressed on monocytes delivers a positive signal to T cells, allowing them to respond to IL-12. Alternatively, LAG-3 ligation may provide direct inhibitory signal to T cells. The second mechanism is supported by the finding that anti-LAG-3 suppresses the response of highly purified T cells to IL-12 plus IL-1. Indeed, this cytokine mixture does not induce the expression of class II molecules on T cells. This view is further supported by the previous findings that ligation of LAG-3 before TCR/CD3 stimulation markedly inhibits T cell proliferation and cytokine production (3).

Taken collectively, the present data are consistent with the concept that LAG-3 is a two-way signaling molecule, providing a negative signal to the cells on which it is expressed and a stimu-

latory signal to those expressing its ligand, MHC class II. Our results further show that the stimulatory activity of LAG-3 on monocytes differs from that on monocyte-derived DC. Indeed, unlike in monocytes, LAG-3Ig directly stimulates IL-12 production by DC without the need of CD40L signal. This differential effect of LAG-3 cannot be explained by the differential expression of MHC class II molecules on these two types of APCs. Indeed, the preactivated monocytes employed in our study expressed similar levels of HLA-DR as the DC. The ability of LAG-3Ig to directly stimulate IL-12 production by DC is consistent with its protective effect on experimental tumor growth.⁴ In that study, coinjection of LAG-3Ig together with wild-type tumor cells (or injection of tumor cells transfected with LAG-3) inhibits tumor expansion and confers T cell-dependent protection against rechallenge with wild-type tumor.

In conclusion, the present results indicate that LAG-3, which is typically expressed on TH1-like cells (8), stimulates APC for increased TNF- α and IL-12 production. They further suggest that some anti-LAG3 mAbs have the profile of anti-inflammatory agent capable of blocking the activation of bystander proinflammatory T cells.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Gately (Hoffmann La Roche) for his generous gift of anti-IL-12 mAb, and Dr. C. Maliszewski (Immunex) for kindly providing sCD40L.

References

1. Triebel, F., S. Jitsukawa, E. Baixeras, R. S. Roman, C. Genevee, P. E. Viegas, and T. Hercend. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* 171:1393.
2. Baixeras, E., B. Huard, C. Miossec, S. Jitsukawa, M. Martin, T. Hercend, C. Auffray, F. Triebel, and T. D. Plautier. 1992. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein: a new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. *J. Exp. Med.* 176:327.
3. Hannier, S., M. Tournier, G. Bismuth, and F. Triebel. 1998. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J. Immunol.* 161:4058.
4. Huard, B., P. Prigent, M. Tournier, D. Bruniquel, and F. Triebel. 1995. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4⁻ and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur. J. Immunol.* 25:2718.

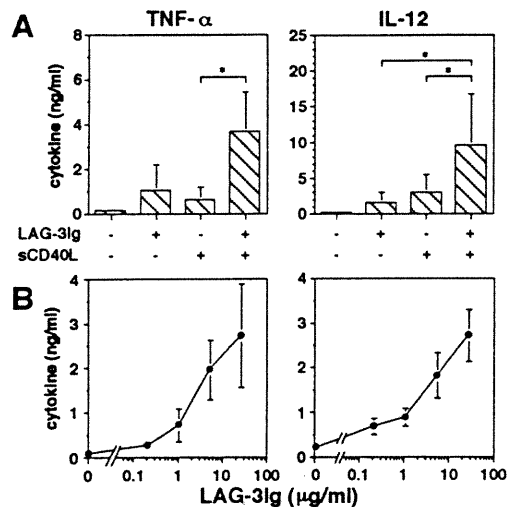


FIGURE 7. LAG-3Ig induces TNF- α and IL-12 production by monocyte-derived DCs. **A.** DC derived from blood monocytes by culture in GM-CSF and IL-4 were washed and stimulated with LAG-3Ig (5 μ g/ml) and/or sCD40L (0.2 μ g/ml) as described in *Materials and Methods*. Supernatants were analyzed after 24 h for TNF- α production and after 72 h for IL-12 production. **B.** DC were stimulated with graded doses of LAG-3Ig. Shown is mean \pm SD of four experiments.

⁴ P. Prigent, C. Demeure, S. El Mir, S. Hannier, M. Tournier, M. Dreano, G. Deslespess, and F. Triebel. 1998. LAG-3 induces tumor regression and anti-tumor immune responses in vivo. *Submitted for publication*.

5. Glaichenhaus, N., N. Shastri, D. R. Littman, and J. M. Turner. 1991. Requirement for association of p56^{lck} with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* 64:511.
6. Huard, B., P. Prigent, F. Pages, D. Bruniquel, and F. Triebel. 1996. T cell major histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4⁺ T cell clone responses following LAG-3 binding. *Eur. J. Immunol.* 26:1180.
7. Huard, B., P. Gaulard, F. Faure, T. Hercend, and F. Triebel. 1994. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics* 39:213.
8. Annunziato, F., R. Manetti, I. Tomasevic, M. G. Guidizi, R. Biagiotti, V. Gianni, P. Germano, C. Mavilia, E. Maggi, and S. Romagnani. 1996. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4⁺ T cells are associated with IFN- γ production. *FASEB J.* 10:769.
9. Bruniquel, D., N. Borie, S. Hannier, and F. Triebel. 1998. Expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics* 47.
10. Huard, B., M. Tourmier, T. Hercend, F. Triebel, and F. Faure. 1994. Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4⁺ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24:3216.
11. Angevin, E., F. Kremer, C. Gaudin, T. Hercend, and F. Triebel. 1997. Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 72:431.
12. Miyazaki, T., A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science* 272:405.
13. Armant, M., R. Armitage, N. Boiani, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1996. Functional CD40 ligand expression on T lymphocytes in the absence of T cell receptor engagement: involvement in interleukin-2-induced interleukin-12 and interferon- γ production. *Eur. J. Immunol.* 26:1430.
14. Armant, M., H. Ishihara, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1994. Regulation of cytokine production by soluble CD23: costimulation of interferon γ secretion and triggering of tumor necrosis factor α release. *J. Exp. Med.* 180:1005.
15. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109.
16. Zhou, L. J., and T. F. Tedder. 1996. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:2588.
17. Ohshima, Y., Y. Tanaka, H. Tozawa, Y. Takahashi, C. Maliszewski, and G. Delespesse. 1997. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J. Immunol.* 159:3838.
18. Shu, U., M. Kuniwa, C. Y. Wu, C. Maliszewski, N. Vezzi, J. Hakimi, M. Gately, and G. Delespesse. 1995. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* 25:1125.
19. Wu, C. Y., C. Demeure, M. Kuniwa, M. Gately, and G. Delespesse. 1993. IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells. *J. Immunol.* 151:1938.
20. Armant, M., M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1995. Soluble CD23 directly activates monocytes to contribute to the antigen-independent stimulation of resting T cells. *J. Immunol.* 155:4868.
21. Abrams, J. S., M. G. Roncarolo, H. Yssel, U. Andersson, G. J. Gleich, and J. E. Silver. 1992. Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development: immunoassay of IL-10 and IL-5 in clinical samples. *Immunol. Rev.* 127:5.
22. Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani, and G. Schuler. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184:741.
23. Basham, T. Y., and T. C. Merigan. 1983. Recombinant interferon- γ increases HLA-DR synthesis and expression. *J. Immunol.* 130:1492.
24. Lane, P., A. Traunecker, S. Hubele, S. Inui, A. Lanzavecchia, and D. Gray. 1992. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 22:2573.
25. Romagnani, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 12:227.
26. Iannone, F., V. M. Corrigan, G. H. Kingsley, and G. S. Panayi. 1994. Evidence for the continuous recruitment and activation of T cells into the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 24:2706.
27. Wade, W. F., J. Davoust, J. Salamerio, P. Andre, T. H. Watts, and J. C. Cambier. 1993. Structural compartmentalization of MHC class II signaling function. *Immunol. Today* 14:539.
28. Mourad, W., R. al Daccak, T. Chatila, and R. S. Geha. 1993. Staphylococcal superantigens as inducers of signal transduction in MHC class II-positive cells. *Semin. Immunol.* 5:47.
29. Parsonnet, J., and Z. A. Gillis. 1988. Production of tumor necrosis factor by human monocytes in response to toxic-shock-syndrome toxin-1. *J. Infect. Dis.* 158:1026.
30. Fleming, S. D., J. J. Iandolo, and S. K. Chapes. 1991. Murine macrophage activation by staphylococcal exotoxins. *Infect. Immun.* 59:4049.
31. Trede, N. S., R. S. Geha, and T. Chatila. 1991. Transcriptional activation of IL-1 β and tumor necrosis factor- α genes by MHC class II ligands. *J. Immunol.* 146:2310.
32. Mehindate, K., D. R. al, F. Damdoui, and W. Mourad. 1996. Synergistic effect between CD40 and class II signals overcome the requirement for class II dimerization in superantigen-induced cytokine gene expression. *Eur. J. Immunol.* 26:2075.
33. Ikejima, T., C. A. Dinarello, D. M. Gill, and S. M. Wolff. 1984. Induction of human interleukin-1 by a product of *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. *J. Clin. Invest.* 73:1312.
34. Mourad, W., K. Mehindate, T. J. Schall, and S. R. McColl. 1992. Engagement of major histocompatibility complex class II molecules by superantigen induces inflammatory cytokine gene expression in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J. Exp. Med.* 175:613.

Article 3

CD47 Ligation Selectively Downregulates Human Interleukin 12 Production

Myriam Armant, Marie-Noëlle Avice, Patrice Hermann, Manuel Rubio,
Mamoru Kiniwa, Guy Delespesse, and Marika Sarfati

J. Exp. Med. 1999. **190**: 1175-1181

À l'heure actuelle, de nombreuses études visent également à comprendre les mécanismes qui régulent négativement la production d'IL-12 puisqu'un excès de cette cytokine peut s'avérer néfaste pour l'organisme. Ce travail, initié par une de mes collègues, a permis de démontrer que l'engagement du CD47 par un anticorps monoclonal, par son ligand naturel, la thrombospondine, ou encore par le peptide 4N1K (peptide correspondant à la partie carboxy-terminale de la TSP qui lie sélectivement le CD47) inhibe de façon spécifique la synthèse d'IL-12 par les monocytes humains. Ma contribution à cette étude a été de démontrer que la suppression de la production d'IL-12 suite à la liaison du CD47 ne s'effectue pas par l'intermédiaire d'une augmentation de la sécrétion d'IL-10 ou de TGF- β endogènes, deux molécules sécrétées par les monocytes et bien connues pour leur rôle inhibiteur sur la synthèse d'IL-12 (Fig.1 C et D).

*Brief Definitive Report***CD47 Ligation Selectively Downregulates Human Interleukin 12 Production**

By Myriam Armant, Marie-Noëlle Avice, Patrice Hermann,
Manuel Rubio, Mamoru Kiniwa, Guy Delespesse, and Marika Sarfati

From Laboratoire Allergie, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Campus Notre-Dame, Québec H2L 4M1, Canada

Summary

Interleukin (IL)-12 plays a key role not only in protective innate and adaptive T helper cell type 1 (Th1) responses but also in chronic inflammatory diseases. We report here that engagement of CD47 by either monoclonal antibody, its natural ligand thrombospondin (TSP), or 4N1K (a peptide of the COOH-terminal domain of TSP selectively binding CD47) inhibits IL-12 release by monocytes. The suppression occurred after T cell-dependent or -independent stimulation of monocytes and was selective for IL-12 inasmuch as the production of tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1, IL-6, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor was not inhibited. CD47 ligation did not alter transforming growth factor (TGF)- β and IL-10 production, and the suppressive effect on IL-12 was not due to autocrine secretion of TGF- β or IL-10. The IL-12 inhibition was not mediated by Fc γ receptor ligation, did not require extracellular Ca²⁺ influx, but was reversed by two phosphoinositide 3-kinase inhibitors (wortmannin and Ly294002). Thus, engagement of CD47 on monocytes by TSP, which transiently accumulates at the inflammatory site, is a novel and unexplored pathway to selectively downregulate IL-12 response. The pathway may be relevant in limiting the duration and intensity of the inflammatory response, and in developing novel therapeutic strategies for Th1-mediated diseases.

Key words: CD47 • interleukin 12 • monocytes • thrombospondin

Interleukin (IL)-12 is a potent proinflammatory and immunoregulatory cytokine which plays a crucial role in innate and adaptive immunity (for a review, see reference 1). IL-12 is produced primarily by activated mononuclear and polynuclear phagocytes, as well as dendritic cells. IL-12 is released during the early stage of infections caused by a large variety of bacteria, intracellular pathogens, fungi, and certain viruses. This early production of IL-12 is T cell independent and results from the direct interaction of pathogens or their products with phagocytic cells. IL-12 rapidly triggers NK cells and T cells to release IFN- γ , which increases not only the bactericidal activity of phagocytes but also their release of proinflammatory cytokines, including IL-12 itself. In addition to activating the cells of the innate immune system, IL-12 and IFN- γ direct the differentiation of antigen-specific naive T cells into Th1 effectors, producing high levels of IFN- γ and conferring protection against intracellular pathogens.

The IL-12/IFN- γ proinflammatory loop initiated during the early stage of infection is generally of short duration and is probably downregulated by several mechanisms. For example, the engagement of phagocytic receptors (CR3, Fc γ , and scavenger receptors) on macrophages by opsonized bacteria was shown to inhibit IL-12 production (2, 3). Sim-

ilarly, CD46 ligation by measles virus suppresses IL-12 release (4). Another important physiological inhibitor of IL-12/IFN- γ production is IL-10, which can also be released by pathogen-stimulated phagocytes, but at a later stage than IL-12 (1). Other nonselective inhibitors of IL-12 production include cytokines like TGF- β , IL-4, and IL-13, as well as PGE₂, glucocorticoids, and cholera toxin (5–7).

IL-12 is also produced after cognate interaction of CD4⁺ T cells with dendritic cells or monocytes (8). This T cell-dependent pathway of IL-12 production is mediated through CD40–CD154 (CD40L) interactions and regulates the level of IFN- γ production in primary and secondary response to antigens devoid of intrinsic adjuvant activity, including autoantigens (1). Recent evidence further suggests a third mechanism of IL-12 production which may occur at inflammatory sites, without infectious agents or TCR-mediated signals (9). It was found that the addition of IL-15 or IL-2 to cultures of autologous resting T cells and monocytes induces the production of proinflammatory cytokines including IL-12 and IFN- γ .

The extravasation of T lymphocytes and monocytes from blood vessels to inflammatory lesions requires interactions with the extracellular matrix (ECM), which is composed of various adhesive glycoproteins and glycosamino-

glycans (10). Consequently, molecules that mediate the physical interactions between the immune cells and the extracellular environment may play a critical role by imposing a context in which biological and inflammatory processes take place. For instance, low molecular weight hyaluronan was shown to induce IL-12 production by binding CD44 on inflamed macrophages (11). Also, the $\beta 1$ and $\beta 2$ integrin family of adhesive receptors, expressed by PBMCs, mediates ECM-cell interactions that deliver costimulatory signals to the incoming cells. Engagement of $\beta 1$ integrins by fibronectin increases adhesion of T lymphocytes to immobilized ligands (12) and promotes TCR signaling.

CD47 antigen, also known as integrin-associated protein (IAP), is a widely expressed multispan transmembrane protein which is physically and functionally associated with $\alpha v\beta 3$ integrin, the vitronectin (Vn) receptor (13). Indeed, CD47⁻ cell lines expressed $\alpha v\beta 3$ but failed to bind Vn-coated beads. Moreover, CD47-deficient mice rapidly die of *Escherichia coli* peritonitis, a phenomenon directly associated with a reduction in leukocyte activation in response to $\beta 3$, but not $\beta 2$, integrin ligation (14). More recently, CD47 has been implicated in leukocyte transendothelial migration (15), whereas its potential role in immune regulation has not yet been explored. Its newly described natural ligand, thrombospondin (TSP), is transiently expressed at high concentration in damaged and inflamed tissues (16, 17). TSP is a homotrimeric ECM protein mainly produced by platelets; it may also be synthesized by monocytes and alveolar macrophages. In addition to CD47, TSP binds heparan sulfate proteoglycans, the $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ integrins, and CD36 (16–18).

We here examine the potential role of CD47 and TSP in the regulation of cytokine synthesis by monocytes. We report that ligation of CD47 antigen, by mAb or TSP, specifically and selectively inhibits IL-12 production by purified monocytes in response to T cell-dependent or -independent stimuli.

Materials and Methods

Reagents. Recombinant GM-CSF was provided by Dr. D. Bron (Institut Bordet, Brussels, Belgium). IFN- γ was obtained from Genzyme. sCD40L trimeric protein was provided by Drs. C. Maliszewski and R. Armitage (Immunex Corp., Seattle, WA). *Staphylococcus aureus* Cowan I strain (SAC) was used at 0.01% (wt/vol) (Pansorbin; Calbiochem-Behring) and LPS at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Chemical Co.). Anti-CD47 mAbs B6H12 (mouse IgG1) and BRIC126 (mouse IgG2b) were purchased from Serotec. Isotype-matched negative control mAb (mouse IgG1) was prepared in our laboratory. Anti-CD18 mAb (mouse IgG1; American Type Culture Collection) was used at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Neutralizing anti-IL-10 mAb (clone 19 F1.1; American Type Culture Collection) and neutralizing anti-TGF- β (polyclonal chicken Ig) were used at 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. TSP was purchased from GIBCO BRL, and EDTA and EGTA were from Sigma Chemical Co. The 4N1K peptide (KRFYVVMWKK) was obtained from Genosys and corresponds to the COOH-terminal domain of TSP (16); 4NGG (KRFYGGMWKK) was a gift from W. Frazier (Washington University, St. Louis, MO).

Cell Purification and Culture Conditions: Monocytes. PBMCs were

isolated by density gradient centrifugation of heparinized blood from healthy volunteers (total $n = 30$) using Lymphoprep (Nycomed). Enriched monocytes were prepared by cold aggregation as described (9), followed by one cycle of rosetting with S-(2-aminoethyl) isothiuronium bromide (Aldrich)-treated SRBCs to deplete residual T and NK cells. Monocyte purity was shown to be >95% by flow cytometry (FACScanTM; Becton Dickinson) using PE-conjugated anti-CD14 mAb (Ancell).

Monocytes were cultured at $10^6/\text{ml}$ in 96-well round-bottomed Falcon plates (Becton Dickinson). Cultures were performed in quadruplicate in complete serum-free HB101 medium (Irvine Scientific) containing Ca^{2+} (600 μM) and Mg^{2+} (490 μM) and supplemented with 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 100 IU penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin.

Cytokine Measurement. IL-12p70 release was assessed by a two-site sandwich ELISA using clone 20C2 as the capture mAb and clone 4D6 as the second mAb as described (9). Both mAbs were provided by Dr. M. Gately (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ). The sensitivity of the assay was 6 pg/ml. TNF- α was measured using a sandwich ELISA as described previously (19), and IL-10 was determined by a sandwich solid-phase RIA using anti-IL-10 mAb (clone 9D7) as the capture mAb and ¹²⁵I-labeled anti-IL-10 (clone 12G8) as the detecting probe. IL-1 β , IL-6, GM-CSF, and TGF- β ELISA kits were purchased from R&D Systems. All of the measurements were performed in duplicate with a coefficient variation of <10%.

Statistical Analysis. The paired *t* test was used to determine statistical significance of the data. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.005.

Results

CD47 mAb Selectively Suppresses IL-12 Release by Monocytes. We examined the effect of soluble CD47 mAb on IL-12 release by purified monocytes costimulated by IFN- γ and T cell-dependent (sCD40L and GM-CSF) or -independent (SAC) signals. As depicted in Fig. 1 A, CD47 mAb significantly suppressed IL-12 secretion in response to either stimuli, whereas isotype-matched IgG1 mouse mAb had no effect. In agreement with Marth and Kelsall (3), anti-CD18 mAb, used as a cell-binding irrelevant mAb, did not suppress IL-12 production (data not shown). We noted an inhibition of IL-12 release even when monocytes were cultured with SAC alone, indicating that CD47 mAb did not simply impair the enhancing effect of IFN- γ on IL-12 production. Our unpublished observations revealed a similar suppressive effect by CD47 mAb after LPS and IFN- γ costimulation.

The blockade of IL-12 production in response to SAC and IFN- γ was rather selective, since the release of other monocyte products (TNF- α , IL-1, IL-6, and GM-CSF) remained largely unaffected (Fig. 1 B). Note a threefold increase in IL-6 secretion, which did not reach statistical significance. Cell viability, as determined by trypan blue dye exclusion, was unchanged. Also, the inhibition of IL-12 was probably not mediated via an increase of autocrine antiinflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β), known to efficiently downregulate bacteria-induced monokine release (1). As shown in Fig. 1 C, IL-10 and TGF- β levels remained unaffected by CD47 mAb treatment. Moreover, neutralizing

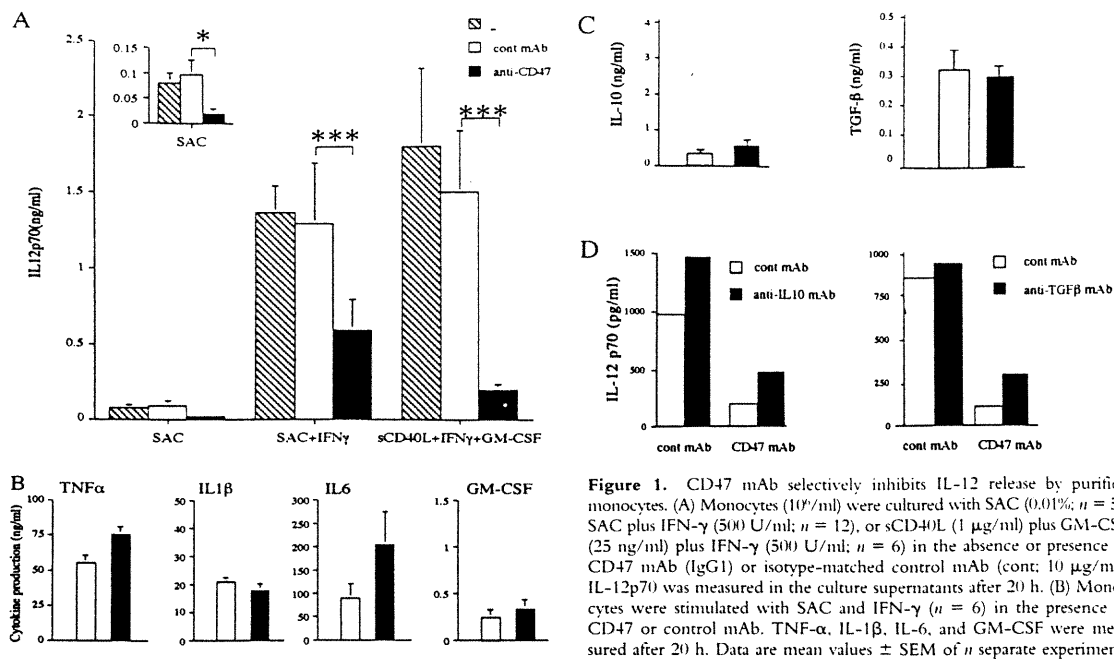


Figure 1. CD47 mAb selectively inhibits IL-12 release by purified monocytes. (A) Monocytes (10^6 /ml) were cultured with SAC (0.01%; $n = 5$), SAC plus IFN- γ (500 U/ml; $n = 12$), or sCD40L (1 μ g/ml) plus GM-CSF (25 ng/ml) plus IFN- γ (500 U/ml; $n = 6$) in the absence or presence of CD47 mAb (IgG1) or isotype-matched control mAb (cont; 10 μ g/ml). IL-12p70 was measured in the culture supernatants after 20 h. (B) Monocytes were stimulated with SAC and IFN- γ ($n = 6$) in the presence of CD47 or control mAb. TNF- α , IL-1 β , IL-6, and GM-CSF were measured after 20 h. Data are mean values \pm SEM of n separate experiments from n different donors. *** $P < 0.005$; * $P < 0.05$. (C) Monocytes were stimulated with SAC and IFN- γ in the presence of CD47 or control mAb; IL-10 and TGF- β were measured after 20 h. Data are mean values \pm SEM from six experiments using six different donors. (D) Monocytes were stimulated with SAC and IFN- γ in the presence of CD47 or control mAb; neutralizing anti-IL-10 (10 μ g/ml), anti-TGF- β (30 μ g), or isotype-matched control mAbs were added to the cultures. Data are mean values of duplicate cultures and represent one of three experiments using three different donors.

anti-IL-10 or anti-TGF- β antibodies added alone or simultaneously did not overcome CD47 mAb-mediated inhibition of IL-12 production by SAC- and IFN- γ -stimulated monocytes (Fig. 1 D, and data not shown).

Thrombospondin Inhibits IL-12 Release. We next evaluated the effect of TSP, the natural ligand of CD47 (16), on monokine release. As shown in Table I, TSP significantly reduced IL-12 production by SAC- and IFN- γ -stimulated monocytes, whereas it slightly enhanced TNF- α release. Note that monocytes coexpressed two other TSP receptors (CD36 and α v β 3 [15]). Since the site of interaction between CD47 and TSP is limited to the cell-binding domain (CBD) of TSP, we examined the role of a synthetic peptide (4N1K) encoding this particular domain (16). We found that 4N1K, but not control mutant peptide 4NNG, dose-dependently inhibited IL-12 release in response to SAC and IFN- γ without affecting TNF- α production (Fig. 2).

CD47 Ligation Suppresses IL-12 Release via an Fc and Ca $^{2+}$ -independent but Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Pathway. This specific inhibition of IL-12 release after CD47 engagement was reminiscent of recent studies reporting that Fc γ R cross-linking selectively downregulated IL-12 secretion in monocytes via an increase in extracellular calcium influx (2). We analyzed whether this mechanism might be involved in the CD47 mAb-mediated IL-12 suppression. First, F(ab') $_2$ fragments of CD47 mAb dose-dependently inhibited IL-12p70 release, demonstrating that the inhibi-

tory effect was not Fc mediated (Fig. 3 A). Furthermore, monovalent Fab fragments still suppressed IL-12 secretion (Fig. 3 B), suggesting that CD47 mAb either prevented monocyte/monocyte interactions and the delivery of a positive signal, or directly delivered to the monocytes a negative signal for IL-12 production. Second, IL-12 downregulation was observed in monocyte cultures supplemented with a fivefold excess of the Ca $^{2+}$ and Mg $^{2+}$ chelating agents EDTA or EGTA, demonstrating that the suppressive effect was independent of extracellular Ca $^{2+}$ influx (Fig. 3 B).

Table I. TSP Selectively Inhibits IL-12 Production by Monocytes

	IL-12 (pg/ml)			TNF- α (ng/ml)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
SAC + IFN- γ	168	1,020	2,120	120	64	87
SAC + IFN- γ + TSP	79	746	1,090	147	83	105
Percent inhibition	53	27	49	-	-	-

Monocytes (10^6 /ml) were cultured for 20 h with SAC (1:10,000) and IFN- γ (500 U/ml) with or without plastic-coated TSP (10 μ g/ml). Culture supernatants were harvested for cytokine determination as described. Exp., experiment.

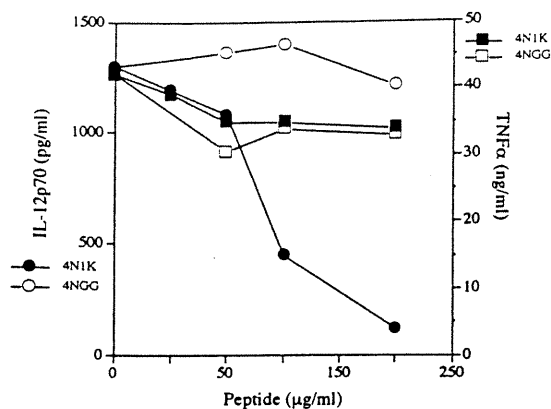


Figure 2. 4N1K selectively suppresses the production of IL-12 by monocytes. Monocytes (10^6 /ml) were stimulated with SAC and IFN- γ in the presence of various concentrations of 4N1K (peptide of COOH-terminal domain of TSP) or 4NGG (mutant peptide). IL-12p70 and TNF- α release were measured after 20 h. Data are mean values of duplicate cultures of one representative of three independent experiments using three different donors.

Moreover, addition of EDTA or EGTA in the absence of mAb did not result in inhibition of TNF- α or IL-12 release.

Since TSP signaling of focal adhesion in endothelial cells requires activation of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K [20]), we explored the involvement of this pathway in CD47 mAb-mediated suppression of IL-12 release by using two PI 3-K inhibitors, wortmannin and Ly294002. We found that both PI 3-K inhibitors restored IL-12 release in a dose-dependent manner (Fig. 4) with no effect on TNF- α secretion (data not shown). However, neither protein kinase C (e.g., H7, HA1004) nor protein tyrosine kinase inhibitors (e.g., herbimycin) prevented CD47 mAb-mediated inhibition of IL-12 release (not shown). Taken collectively, our results suggest that engagement of CD47 on monocytes

by mAb, its natural ligand TSP, and 4N1K peptide specifically suppressed IL-12 secretion through an Fc and Ca^{2+} -independent but PI 3-K-dependent pathway.

Discussion

The critical role of IL-12-mediated protection against mycobacterial infection was recently confirmed in IL-12 receptor-deficient patients (21). Nevertheless, uncontrolled production of IL-12 is pathogenic in some organ-specific autoimmune diseases (1) and endotoxic shock (22), underscoring the requirement of potent negative regulatory feedback mechanisms. The present findings demonstrate that engagement of CD47 by its natural ligand, TSP, or by CD47 mAb, represents a novel pathway to selectively downregulate IL-12 production.

Inhibition of IL-12 release by CD47 ligation occurred in activated monocytes through a PI 3-K-dependent pathway. Indeed, two specific inhibitors of PI 3-K (wortmannin and Ly294002) overcame CD47-mediated IL-12 suppression with no effect on TNF- α production. Although these data are not a definite proof of the involvement of PI 3-K, they are supported by the observations that TSP-mediated functions such as cell spreading or focal adhesion disassembly required activation of PI 3-K (20). Besides inhibitory cytokines, including IL-4, IL-10, and TGF- β , which suppress the production of a large number of proinflammatory products (e.g., TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-12) by activated monocytes, several monocyte surface receptors reportedly downregulate IL-12 production in a somewhat selective manner. *Histoplasma capsulatum* and measles virus have been shown to decrease IL-12 release by signaling through CD11b and CD46, respectively (3, 4). IL-12 downmodulation that resulted from scavenger receptor and Fc γ R ligation is due to extracellular Ca^{2+} influx (2) and increase in IL-10 production in the case of Fc γ R1 (23). In the present study, the CD47 mAb inhibition was Fc and Ca^{2+} independent since intact, divalent, and monovalent fragments of CD47 mAb

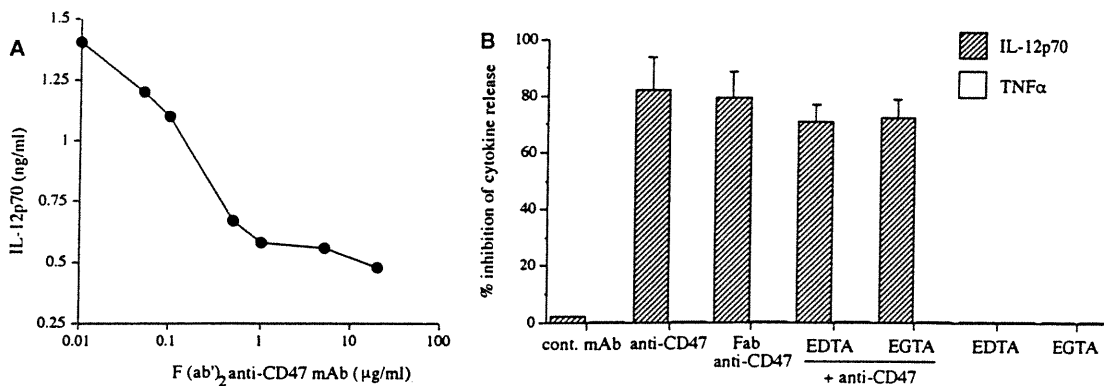


Figure 3. Suppression of IL-12 production by CD47 mAb is Fc and Ca^{2+} independent. Monocytes (10^6 /ml) were stimulated with SAC and IFN- γ and titrated concentrations of F(ab')₂ anti-CD47 mAb (A) or 20 μ g/ml of Fab anti-CD47, EDTA, and EGTA (5 mM) (B). IL-12p70 and TNF- α release were measured after 20 h. Results in A represent mean values of one out of three separate experiments using three different donors. Results in B are expressed as means \pm SD of percent inhibition of control response (SAC- and IFN- γ -treated monocytes) of four separate experiments using four different donors.

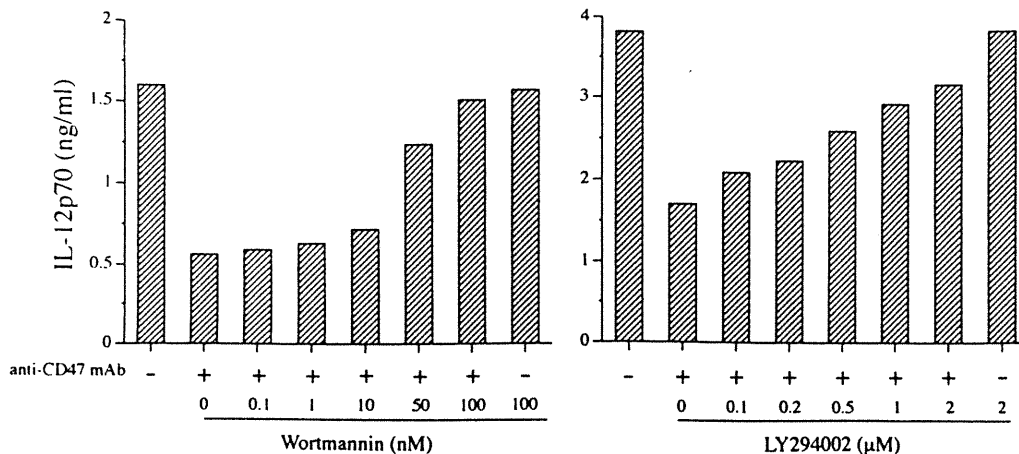


Figure 4. PI 3-K inhibitors restore IL-12 production. Monocytes (10^6 /ml) were stimulated with SAC and IFN- γ in the absence or presence of CD47 mAb (10 μ g/ml) and titrated concentrations of wortmannin or Ly294002. IL-12p70 release was measured after 20 h. Results represent mean values from one of three independent experiments using three different donors.

suppressed IL-12 regardless of the presence of divalent cation chelating agents.

CD47 antigen, also named integrin-associated protein (IAP), regulates the function and the binding of Vn to α v β 3, its associated integrin (13). However, Vn does not bind CD47, and the natural ligand of CD47 is reported to be TSP (16). TSP interacts with CD47 through its CBD, but binds other surface receptors such as CD36 or α v β 3 via distinct domains (17, 24).

Since TSP reportedly activates latent TGF- β in vitro and in vivo (25) and ligation of CD36 by CD36 mAb downregulates IL-12 and TNF- α production and increases IL-10 (26), we used 4N1K peptide encoding the CBD of TSP to demonstrate that TSP-mediated inhibition of IL-12 resulted from its direct effect on CD47 antigen. In addition, CD47 ligation did not decrease TNF- α nor increase IL-10 production. Note that TSP uses its properdin-like domain to activate TGF- β (17) and that TGF- β production was not upregulated after CD47 signaling (Fig. 1 C).

IL-12 downmodulation, in the absence of TNF- α inhibition, was also observed in IFN regulatory factor (IRF-1 [27]) and IFN consensus sequence binding protein (ICSBP)-deficient mice (28). These two transcription factors belong to the IRF family and bind IL-12p40 promoter as well as other IFN-stimulated genes. As a direct consequence of the primary defect in IL-12 production, the deficient mice displayed an impaired Th1 response and IFN- γ -dependent host resistance to intracellular pathogens. Similarly, our unpublished observations indicate that CD47 signaling strongly

impaired IL-12-induced proliferative and IFN- γ responses of activated T cells. The role of CD47 antigen, which is expressed by all leukocytes, has been demonstrated in the transendothelial migration of neutrophils, lymphocytes, and more recently, monocytes (15). Our present findings reveal that CD47 ligation by TSP modulates the function of monocytes. Therefore, we propose that engagement of CD47 is a novel and unexplored pathway to selectively downregulate IL-12 production. Inhibition of the IL-12 response is crucial for the treatment of organ-specific autoimmune diseases (1). For instance, administration of anti-IL-12 mAb completely abrogated established colitis of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-treated mice. IL-12 neutralization was also revealed to be an effective treatment of autoimmune encephalitis and insulin-dependent diabetes.

Finally, in addition to its ability to downregulate IL-12 response through its CBD, TSP is known to display several important antiinflammatory activities via distinct domains. TSP facilitates elimination of apoptotic cells (29), activates TGF- β in vivo and in vitro (25), potently inhibits angiogenesis (17), and suppresses HIV infectivity through its binding to HIVg120 (24). Moreover, absence of TSP causes pneumonia (30). Therefore, since TSP is transiently expressed at high concentration in damaged and inflamed tissue, its selective suppression of the IL-12 response through interaction with the CD47 molecule may be relevant in limiting the duration and the intensity of the inflammatory response. The importance of such a process awaits confirmation in CD47- and TSP-deficient mice.

We are grateful to Dr. M. Gately (Hoffmann-LaRoche) for generously providing the IL-12 reagents. We fully appreciate the excellent secretarial assistance of Norma Del Bosco.

This work is supported by Medical Research Council grants MT13311 and MT14432.

Address correspondence to Marika Sarfati, University of Montreal, Laboratoire Allergie (M4211-K), Centre de Recherche du CHUM, Campus Notre-Dame, 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada. Phone: 514-281-6000 ext. 6632; Fax: 514-896-4753; E-mail: sarfatm@poste.umontreal.ca

M. Armant's present address is Laboratory for Parasitic Diseases, Bldg. 4, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-0425. M. Kuniwa's present address is Immunological and Cardio-Vascular Research Lab., Hanno Research Center, Taiho Pharmaceutical Company Ltd., Saitama 357, Japan.

Submitted: 6 November 1998 Revised: 13 August 1999 Accepted: 20 August 1999

References

- Gately, M.K., L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D.H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 495-521.
- Sutterwala, F.S., G.J. Noel, R. Clynes, and D.M. Mosser. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J. Exp. Med.* 185:1977-1985.
- Marth, T., and B.L. Kelsall. 1997. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J. Exp. Med.* 185: 1987-1995.
- Karp, C.L., M. Wysocka, L.M. Wahl, J.M. Ahearn, P.J. Cuomo, B. Sherry, G. Trinchieri, and D.E. Griffin. 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science*. 273:228-231.
- Van der Pouw Kraan, T.C., L.C. Boeijs, R.J. Smeenk, J. Wijdenes, and L.A. Aarden. 1995. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 181:775-779.
- Blotta, M.H., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 1997. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4⁺ lymphocytes. *J. Immunol.* 158:5589-5595.
- Braun, M.C., J. He, C.-Y. Wu, and B.L. Kelsall. 1999. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor β 1 and β 2 chain expression. *J. Exp. Med.* 189:541-552.
- Shu, U., M. Kuniwa, C.Y. Wu, C. Maliszewski, N. Vezzio, J. Hakimi, M. Gately, and G. Delespesse. 1995. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* 25:1125-1128.
- Avice, M.-N., C.E. Demeure, G. Delespesse, M. Rubio, M. Armant, and M. Sarfati. 1998. IL-15 promotes IL-12 production by human monocytes via T cell-dependent contact and may contribute to IL-12-mediated IFN- γ secretion by CD4⁺ T cells in the absence of TCR ligation. *J. Immunol.* 161:3408-3415.
- Ben-Baruch, A., D.F. Michiel, and J.J. Oppenheim. 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* 270:11703-11706.
- Hodge-Dufour, J., P.W. Noble, M.R. Horton, C. Bao, M. Wysoka, M.D. Burdick, R.M. Strieter, G. Trinchieri, and E. Puré. 1997. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol.* 159:2492-2500.
- Maguire, J.E., K.M. Danahey, L.C. Burkly, and G.A. van Seventer. 1995. T cell receptor- and β 1 integrin-mediated signals synergize to induce tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK) in human T cells. *J. Exp. Med.* 182:2079-2090.
- Lindberg, F.P., H.D. Gresham, E. Schwarz, and E.J. Brown. 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in α v β 3-dependent ligand binding. *J. Cell Biol.* 123:485-496.
- Lindberg, F.P., D.C. Bullard, T.E. Caver, H.D. Gresham, A.L. Beaudet, and E.J. Brown. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science*. 274:795-798.
- Weerasinghe, D., K.P. McHugh, F.P. Ross, E.J. Brown, R.H. Gisler, and B.A. Imhof. 1998. A role for the α v β 3 integrin in the transmigration of monocytes. *J. Cell Biol.* 142: 595-607.
- Gao, A.-G., F.P. Lindberg, M.B. Finn, S.D. Blystone, E.J. Brown, and W.A. Frazier. 1996. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J. Biol. Chem.* 271:21-24.
- Bornstein, P. 1992. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J.* 6:3290-3299.
- Yabkowitz, R., V.M. Dixit, N. Guo, D.D. Roberts, and Y. Shimizu. 1993. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the α 4 β 1 (VLA-4) and α 5 β 1 (VLA-5) integrins. *J. Immunol.* 151:149-158.
- Armant, M., H. Ishihara, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1994. Regulation of cytokine production by soluble CD23: costimulation of interferon γ secretion and triggering of tumor necrosis factor α release. *J. Exp. Med.* 180:1005-1011.
- Greenwood, J.A., M.A. Pallero, A.B. Theibert, and J.E. Murphy-Ullrich. 1998. Thrombospondin signaling of focal adhesion disassembly requires activation of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273:1755-1763.
- Altare, F., A. Durandy, D. Lammas, J.-F. Emile, S. Lamhamedi, F. Le Deist, P. Drysdale, E. Jouanguy, R. Dörfinger, F. Bernaudin, et al. 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. 280:1432-1438.
- Wysocka, M., M. Kubin, L.Q. Vieira, L. Ozmen, G. Garotta, P. Scott, and G. Trinchieri. 1995. Interleukin-12 is required for interferon- γ production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* 25:672-676.
- Sutterwala, F.S., G.J. Noel, P. Salgame, and D.M. Mosser. 1998. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc γ receptor type I. *J. Exp. Med.* 188:217-222.
- Crombie, R., R.L. Silverstein, C. MacLow, S.F.A. Pearce, R.L. Nachman, and J. Laurence. 1998. Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. *J. Exp. Med.* 187:25-35.

25. Crawford, S.E., V. Stellmach, J.E. Murphy-Ullrich, S.M.F. Ribeiro, J. Lawler, R.O. Hynes, G.P. Boivin, and N. Bouck. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell*, 93:1159-1170.
26. Voll, R.E., M. Herrmann, E.A. Roth, C. Stach, and J.R. Kalden. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390:350-351.
27. Lohoff, M., D. Ferrick, H.-W. Mittrücker, G.S. Duncan, S. Bischof, M. Röllinghoff, and T.W. Mak. 1997. Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity*, 6:681-689.
28. Scharton-Kersten, T., C. Contursi, A. Masumi, A. Sher, and K. Ozato. 1997. Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J. Exp. Med.* 186:1523-1534.
29. Ren, Y., and J. Savill. 1995. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Immunol.* 154:2366-2374.
30. Lawler, J., M. Sunday, V. Thibert, M. Duquette, E.L. George, H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1998. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J. Clin. Invest.* 101: 982-992.

Article 4

CD47 Ligation Selectively Inhibits the Development of Human Naive T Cells
Into Th1 Effectors

Marie-Noëlle Avice, Manuel Rubio, Martin Sergerie, Guy Delespesse,
and Marika Sarfati

J. Immunol. 2000. **165**: 4624-4631

Dans l'article précédent, nous avons démontré que l'engagement du CD47 inhibe de façon sélective la production d'IL-12 par les monocytes humains. Sachant que l'IL-12 joue un rôle crucial dans le développement Th1, nous avons donc par la suite proposé que l'engagement du CD47 empêche également la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1. Dans ce travail, nous avons d'une part démontré que l'engagement du CD47 s'oppose de manière sélective au développement d'une réponse Th1 et d'autre part, nous en avons étudié les mécanismes sous-jacents. Ma contribution à cette étude représente 90% du travail expérimental.

CD47 Ligation Selectively Inhibits the Development of Human Naive T Cells into Th1 Effectors¹

Marie-Noëlle Avice,* Manuel Rubio,* Martin Sergerie,[†] Guy Delespesse,* and Marika Sarfati^{2*}

The CD47 Ag, also named integrin-associated protein, was recently reported to regulate the production of IL-12 by human monocytes and dendritic cells. The present study shows that CD47 ligation by CD47 mAb in primary cultures of cord blood mononuclear cells inhibits IL-12-driven Th1 cell development, as revealed by the cytokine secretion profile at restimulation and IFN- γ production at the single-cell level. F(ab')₂ fragments of CD47 mAb or the synthetic peptide 4N1K, corresponding to the CD47 binding site of thrombospondin, display the same activity. CD47 engagement does not change the phenotype of IL-12-primed cells from Th1 to Th2 or affect IL-4-induced Th2 cell development. Moreover, CD47 mAb inhibits IL-12- but not IL-4-induced IL-2 production as well as IFN- γ in primary cultures, which was correlated with a decrease of the IL-12R β 2 chain expression. Inclusion of exogenous IL-2 at priming corrects IL-12R expression as well as the inhibition of Th1 cell development. The data thus underline the role of IL-2 in Th1 cell development and further suggest that targeting IL-2 and IL-12 simultaneously may have some therapeutic advantage in Th1 autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 4624–4631.

Upon activation, naive CD4⁺ T cells can differentiate into distinct Th subsets differing by their lymphokine secretion pattern (1). Th1 cells produce high levels of IFN- γ , lymphotoxin- α (LT- α),³ and TNF- α but no or little IL-4 and IL-5; Th2 cells produce high levels of IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13 but no or little IFN- γ and LT- α . These subsets of T cells have distinct regulatory and effector functions, and the inappropriate selection of Th1 or Th2 phenotype results in ineffective or disease-promoting immune responses (2). As recently reviewed (3–5), several factors are implicated in the regulation of naive T cell differentiation into Th1 or Th2 effectors. These include 1) the intensity and the nature of TCR-mediated activation signal, 2) the strength and the nature of costimulatory signals, 3) the cytokine and hormonal milieu in which T cells are primed, and 4) the genetic background of the naive T cells. Among all of these factors, cytokines appear to exert the most important role, with IL-4 and IL-12 promoting Th2 and Th1 responses, respectively. The other factors may act by influencing the production of these two cytokines at priming.

IL-12 promotes Th1 cell development by signaling maturing T cells through a high affinity receptor consisting of two chains, IL-12R β 1 and IL-12R β 2, that are differentially regulated (review in Ref. 6). IL-12R β 1 is constitutively expressed on several types of cells, including resting T and B cells, which are not responsive to IL-12 (7). The coexpression of these two chains is required for IL-12 responsiveness and Th1 cell development. Expression of IL-12R β 2 on naive T cell activation is enhanced by Th1-inducing factors (IFN- γ , IFN- α ,

and IL-12 itself) and down-regulated by Th2-promoting factors (IL-4, PGE₂, and glucocorticosteroids) (8, 9). Thus, IL-12 responsiveness increases during Th1 cell differentiation, whereas it disappears during Th2 cell development (10–12). The latter phenomenon is associated with, but perhaps not entirely dependent on, IL-12R β 2 down-regulation. Indeed, forced expression of IL-12R β 2 during Th cell differentiation does not prevent the development of Th2 cells or confer IL-12 responsiveness (13, 14).

CD47 Ag, also known as integrin-associated protein, is a widely expressed multispan transmembrane protein, which is physically and functionally associated with $\alpha_v\beta_3$ integrin, the vitronectin receptor (15, 16). Indeed, CD47⁻ cell lines expressing $\alpha_v\beta_3$ do not bind vitronectin-coated beads, and CD47-deficient mice rapidly die of *Escherichia coli* peritonitis, a phenomenon directly associated with a reduction in leukocyte activation in response to β_3 , but not β_2 , integrin ligation (17). CD47 has also been implicated in leukocyte transendothelial migration (18, 19). Its natural ligand, thrombospondin (TSP), is a homotrimeric extracellular matrix protein that is produced not only by platelets but also by monocytes and alveolar macrophages. TSP is transiently expressed at high concentration in damaged and inflamed tissue (20). A potential role for TSP and CD47 in immune regulation was recently suggested by the finding that they regulate the in vitro production of IL-12 (21, 22). Engagement of CD47 by mAb, TSP, or 4N1K (a peptide of the C-terminal domain of TSP selectively binding CD47) inhibited IL-12 release by human monocytes. The suppression was selective for IL-12 and occurred after T cell-dependent or -independent stimulation of monocytes (21). More recently, ligation of CD47 on human monocyte-derived dendritic cells was shown to inhibit their activation, cytokine production, and maturation (22). Here we show that in addition to blocking IL-12 production, CD47 ligation also inhibits the responsiveness to exogenous IL-12 and the maturation of naive neonatal human T cells into Th1 effectors.

Materials and Methods

Reagents

Anti-CD3 mAb (UCHT-1) was kindly provided by Dr. P. Beverley (University College Middlesex School of Medicine, London, U.K.). Neutralizing mouse anti-human IL-4 mAb (clone 8F12), rIL-2, neutralizing anti-IL-12 Ab, and rIL-12 were kindly provided by C. Heusser (Novartis,

*Allergy Research Laboratory, Research Center of CHUM, Notre-Dame Hospital, University of Montreal, and [†]Department of Obstetrics and Gynecology, University of Montreal, Quebec, Canada

Received for publication May 12, 2000. Accepted for publication July 27, 2000.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹This work is supported by Medical Research Canada Grants MT13311 and MT14432.

²Address correspondence and reprints requests to Dr. Marika Sarfati at his current address: Institut Pasteur, 25-28 Dr Roux, Paris 75015, France. E-mail address: msarfati@pasteur.fr

³Abbreviations used in this paper: LT- α , lymphotoxin- α ; TSP, thrombospondin; CBMC, umbilical cord blood mononuclear cell; MFI, mean fluorescence intensity; PI, propidium iodide; rh, recombinant human.

Basel, Switzerland), D. Bron (Bordet Institute, Brussels, Belgium), and F. K. Kahn and M. Gately (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), respectively. rhIL-4 was received from Immunex (Seattle, WA). The CD32 and B7.1 double-transfected mouse L fibroblasts have been described (23). The 4N1K peptide (KRFYVVMWKK) corresponding to the C-terminal domain of TSP and the mutant 4NGG peptide (KRFYGGMWKK) were obtained from Genosys (The Woodlands, TX). Three anti-CD47 mAbs were used in soluble form: clones B6H12 (mouse IgG1; Biosource, Montreal, Quebec, Canada), 10G2 (described in Ref. 21) and 2D3, (received from E. Brown, Washington University, St. Louis, MO). Mouse IgG1 control mAb anti-Rye and anti-CD2 (OKT11) were produced in our laboratory and purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA), respectively. F(ab')₂ anti-CD47 mAb fragments were prepared using a commercial kit from Pierce (Brockville, Ontario, Canada).

Cell preparation and culture conditions

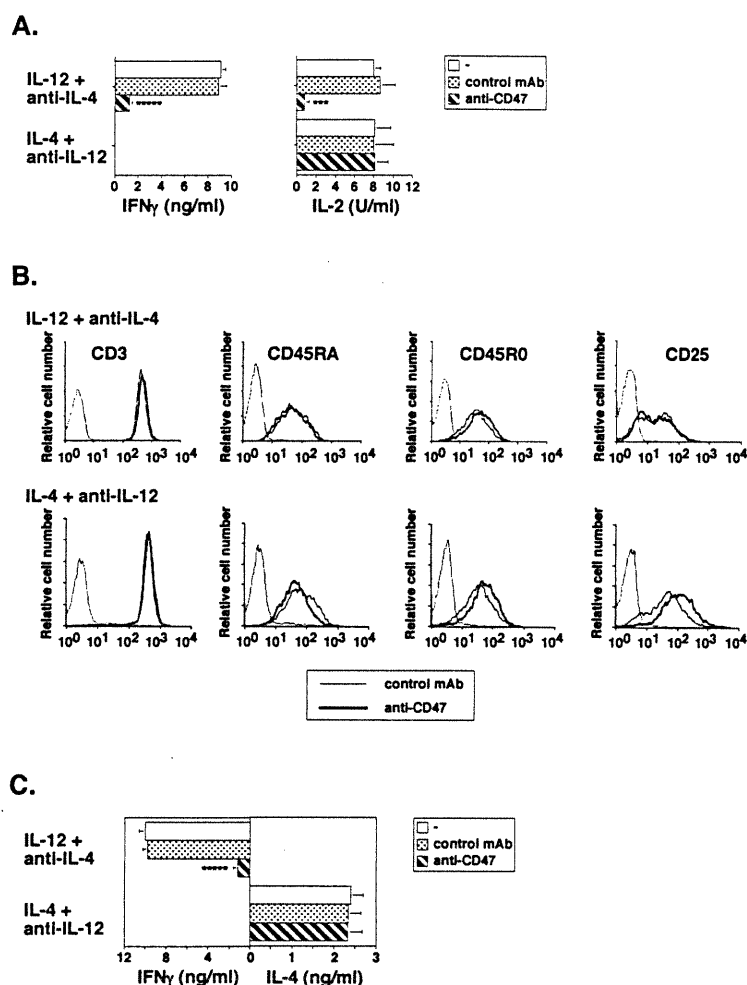
Umbilical cord blood mononuclear cells (CBMCs) were isolated by density gradient centrifugation of heparinized umbilical cord blood from normal healthy volunteers using Lymphoprep (Nycoprep, Oslo, Norway). CBMCs (1×10^6 cells/ml) were cultured in triplicate in 24-well culture plates in 1 ml of RPMI 1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) containing 5% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 IU penicillin and 100 μ g streptomycin, and PHA (2 μ g). For the induction of Th1 and Th2 polarization, cells were cultured in the presence of rIL-12 (60 pM) and anti-IL-4 mAb (1 μ g/ml) or a combination of rIL-4 (20 ng/ml) and anti-IL-12 Ab (5 μ g/ml), respectively.

After 3 days, cells were washed and cultured at a starting concentration of 0.5×10^6 cells/ml in culture medium supplemented with 50 U/ml rhIL-2, in 24-well plates. After 9–12 days of IL-2 culture, cellular expansion in control cultures was ~35-fold; cells were then washed and 1×10^6 viable T cells/ml were restimulated for cytokine production with plastic-bound anti-CD3 mAb (10 μ g/ml) alone, plastic-bound anti-CD3 mAb (1 μ g/ml) together with soluble anti-CD28 mAb (clone CD28.2; PharMingen, Ontario, Canada; 2 μ g/ml), or anti-CD3 (200 ng/ml) immobilized on irradiated CD32/B7.1 L cells (2.5×10^5 cells/ml).

Flow cytometric analysis

Cells were stained with FITC- or PE-conjugated mAbs to CD3, CD25, CD45RA, CD45RO, or isotype-matched controls (Ansell, London, Ontario, Canada) and analyzed using a FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). To detect intracytoplasmic IFN- γ , T cells were stimulated with anti-CD3 mAb immobilized on irradiated CD32/B7.1 L cells for 6 h in the presence of Monensin (3 mM final concentration; Hornby, Ontario, Canada). Cells were stained with the ICScreen Intracellular Staining Kit from Mediatech (Montreal, Quebec, Canada). IL-12R β 1 and IL-12R β 2 surface expression was assessed using a three-step procedure. Briefly, cells were first incubated with anti-IL-12R β 1 mAb (2B10), anti-IL-12R β 2 mAb (2B6), or class-matched negative control mAb at 2.5 μ g/ml in the presence of normal human IgG (150 μ g/ml) for 1 h at 4°C. Cells were then incubated with biotinylated goat anti-rat IgG (Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada) for 1 h at 4°C followed by PE-labeled streptavidin (Ansell)

FIGURE 1. CD47 mAb inhibits Th1 development with no immune deviation toward Th2. CBMCs were primed at 1×10^6 cells/ml for 3 days in Th1 (IL-12 + anti-IL-4 mAb) or in Th2 (IL-4 + anti-IL-12 Ab) polarizing conditions in the absence (-) or in the presence of anti-CD47 mAb (10 μ g/ml) or control mAb (10 μ g/ml). **A**, IFN- γ was measured at the end of primary cultures. IL-2 was measured at 24 h. Shown is the mean \pm SEM of five experiments. ***, $p < 0.005$; ****, $p < 0.0001$. **B**, Cells were then washed; counted with trypan blue; expanded at a starting concentration of 0.5×10^6 cells/ml in IL-2 (50 U/ml) for 9 to 12 days; and assessed for CD3, CD45RA, CD45RO, and CD25 surface expression by a direct staining procedure. Background staining is in dotted line. Shown is one representative experiment of three. **C**, After the expansion phase in IL-2, cells were washed, counted with trypan blue, adjusted to 1×10^6 viable cells/ml, and restimulated with anti-CD3 mAb immobilized on 2.5×10^5 irradiated CD32-B7.1-transfected L cells. Cytokines were measured at 24 h (IL-4) or 48 h (IFN- γ) of secondary cultures. Shown is the mean \pm SEM of five experiments. ****, $p < 0.0001$.



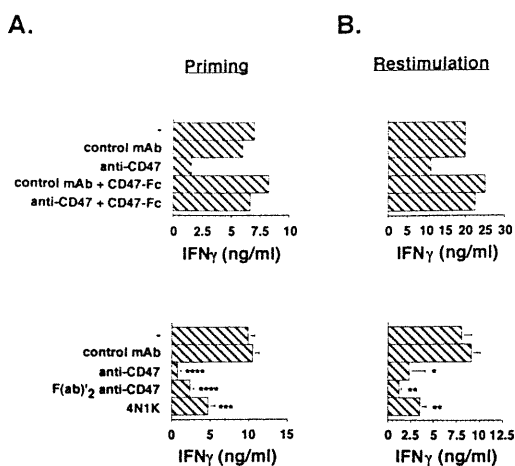


FIGURE 2. CD47 mAb-mediated inhibition of Th1 development is CD47 specific and not Fc mediated. CBMCs were primed at 1×10^6 cells/ml for 3 days in Th1-polarizing conditions (IL-12 + anti-IL-4 mAb) in the absence (–) or in the presence of anti-CD47 mAb (10 μ g/ml); CD47-Fc (10 μ g/ml); F(ab')₂ anti-CD47 mAb (20 μ g/ml); peptide 4N1K (50 μ g/ml), which corresponds to the CD47 binding site of TSP; or control mAb (10 μ g/ml). **A**, IFN- γ was measured at the end of primary cultures. *Upper panel*, One representative experiment of three. *Lower panel*, Mean \pm SEM of five experiments. *** p < 0.005; ****, p < 0.001. **B**, After the expansion phase in IL-2, cells were washed, counted with trypan blue, adjusted to 1×10^6 viable cells/ml, and restimulated with plastic-coated anti-CD3 mAb for 48 h. IFN- γ was measured at the end of secondary cultures. *Top*, One representative experiment of three; *bottom*, Mean \pm SEM of five experiments. *, p < 0.05; **, p < 0.01.

for 30 min at 4°C. Fas (CD95) and FasL (CD95L) surface expression was assessed using a two-step procedure. Cells were first incubated with biotinylated anti-Fas (M3), biotinylated anti-FasL (NOK-1), or biotinylated class-matched negative control at 5 to 10 μ g/ml in the presence of normal human IgG (150 μ g/ml) for 1 h at 4°C. Cells were then incubated with PE-labeled streptavidin for 30 min at 4°C. Mean fluorescence intensity (MFI) was calculated as follows: MFI of sample – MFI of negative control.

Assay for apoptosis

Phosphatidylserine exposure was done by flow cytometry analysis using a FACScan. Cells were double-stained with 2 μ g/ml of FITC-labeled annexin-V (Biosdesign International, Kennebunkport, ME) and propidium iodide (PI; Sigma).

Cytokine measurements

IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, LT- α , TNF- α , and IFN- γ were measured by two-site sandwich ELISA or RIA exactly as described (24, 25). At priming, secretion of IL-2 and IFN- γ was assessed at 24 h and 72 h, respectively.

Table I. Cytokine profiles of CD47-primed cells in Th1 or Th2 conditions^a

	IFN- γ	TNF- α	LT- α	IL-4	IL-5	IL-10
IL-12 + anti-IL-4						
Control mAb	9.8 \pm 0.5	2.3 \pm 0.9	5.6 \pm 2.9	ND	ND	ND
Anti-CD47	1.2 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.2	ND	ND	ND
IL-4 + anti-IL-12						
Control mAb	ND	ND	ND	2.4 \pm 0.3	18.0 \pm 1.4	3.0 \pm 0.8
Anti-CD47	ND	ND	ND	2.3 \pm 0.4	17.1 \pm 2.8	3.4 \pm 0.6

^a CBMCs were primed at 1×10^6 cells/ml for 3 days in Th1 (IL-12 + anti-IL-4 mAb) or in Th2 (IL-4 + anti-IL-12 Ab) polarizing conditions in the presence of anti-CD47 mAb (10 μ g/ml) or control mAb (10 μ g/ml). Cells were then washed, counted with trypan blue, and expanded in IL-2 for 9–12 days. Viable cells (1×10^6 /ml) were restimulated with anti-CD3 mAb immobilized on 2.5×10^3 irradiated CD32-B7.1-transfected L cells. Cytokines were measured at 24 h (IL-4) or 48 h (IFN- γ , TNF- α , LT- α , IL-5, and IL-10). Shown is the mean \pm SEM of five experiments. All values are in nanograms per ml except for IL-2 which is in units/ml. ND, Not detectable.

Unless otherwise indicated, cytokines were measured after 24 h (IL-2 and IL-4) or 48 h (IFN- γ , TNF- α , LT- α , IL-5, and IL-10) of restimulation.

IL-2 mRNA analysis

CBMCs were collected after 6 h of stimulation in Th1-polarizing conditions in the presence of anti-CD47 mAb or isotype-matched control mAb. Total RNA was prepared with RNeasy Total RNA kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Exactly as described (24), 1 μ g of RNA from each sample was reversed transcribed by GeneAmp RNA PCR kit from Perkin-Elmer/Cetus (Emeryville, CA) with oligo(dT)₁₆ as the first-strand cDNA primer. Reverse-transcription product (1/20 vol) was mixed with known quantities of serially diluted competitive internal standards (PCR MIMICS; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) and was subjected to quantitative RT-PCR according to the manufacturer's protocol. Target-specific primer pairs of IL-2 and G3PDH were also purchased from Clontech. After 36 cycles of amplification, the PCR products were resolved on a 1.8% agarose gel containing ethidium bromide. The intensities of competitor-generated bands and the cDNA sample-generated bands determined the quantity of target gene product. The amount of target cDNA was ascertained by determining the amount of competitor required to produce equal molar quantities of target and competitor products. The photographs of agarose gels were further analyzed by computer imaging (NIH Image, version 1.61; National Institutes of Health, Bethesda, MD), and the ratio of the mean histogram of target-generated to competitor-generated bands was calculated. The specificity of the amplified bands was validated by their predicted size.

Statistical analysis

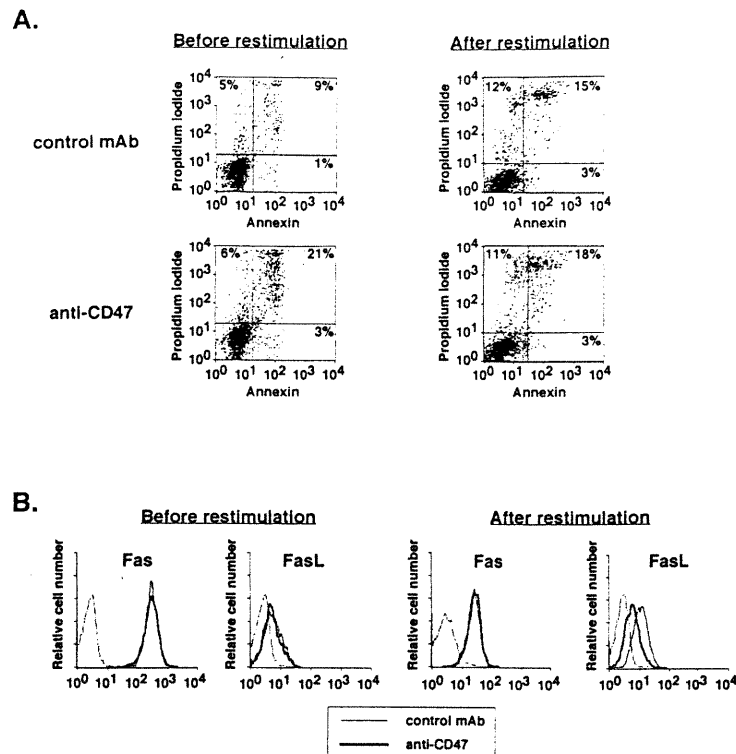
Student's paired *t* test was used to determine statistical significance of the data. Values of p < 0.05 were chosen for rejection of the null hypothesis.

Results

CD47 ligation selectively inhibits the development of naive T cells into Th1 effectors with no immune deviation toward Th2

Several positive or negative regulators of IL-12 production reportedly control IL-12 responsiveness (26–30). Our previous report that CD47 down-regulates IL-12 release by APCs (21, 22) prompted us to evaluate the effect of CD47 ligation on the response of CBMCs to IL-12. CBMCs were activated with PHA in Th1 (IL-12 + anti-IL-4 mAb) or Th2 (IL-4 + anti-IL-12 Ab) conditions, in the absence or presence of CD47 mAb. Inclusion of CD47 mAb markedly reduced both IFN- γ and IL-2 production in Th1 primary cultures without affecting IL-2 production in Th2 primary cultures (Fig. 1A). Control cultures were supplemented with either normal mouse IgG1 or an irrelevant cell-binding mAb (anti-CD2 mAb). After 3 days of priming, cells were washed, expanded in IL-2-supplemented medium for 9 to 12 days, washed again, and examined for surface molecule expression and cytokine production. As depicted in Fig. 1B, regardless of the priming conditions, virtually all of the cells recovered at the end of IL-2 expansion were T lymphocytes (CD3⁺) displaying the phenotype of newly generated effector cells in that they were CD45RA⁺/RO⁺ and CD25^{low}. The proportion of CD4/CD8 T cells (1.6 \pm 0.3, n = 4) in this homogenous T cell population was unaffected by treatment

FIGURE 3. CD47 ligation impairs Th1 development without inducing cell death. CBMCs were primed at 1×10^6 cells/ml for 3 days in Th1-polarizing conditions (IL-12 + anti-IL-4 mAb) with anti-CD47 mAb (10 μ g/ml) or control mAb (10 μ g/ml). Cells were then washed, counted with trypan blue, and expanded in IL-2 for 9 to 12 days before restimulation. **A.** Percentage of dead cells was assessed by annexin/PI double staining at the end of the expansion in IL-2 (before restimulation) and 24 h after restimulation of 1×10^6 viable cells/ml with coated anti-CD3 mAb. Shown is one representative experiment of three. **B.** Fas and FasL surface expression was assessed, as in A, before and after restimulation by a double-staining procedure as described in *Materials and Methods*. Background staining is in dotted line. Shown is one representative experiment of three.



with CD47 mAb. The cellular viability was uniformly higher than 70% as determined by trypan blue dye exclusion.

To examine cytokine production, 1×10^6 viable T cells were restimulated for 24 or 48 h with anti-CD3 mAb immobilized on CD32/B7.1 L transfectants. Cells that had been primed in Th1 conditions in the presence of CD47 mAb secreted much less IFN- γ and no IL-4 at restimulation (Fig. 1C). Of note, similar levels of inhibition of IFN- γ production were observed after restimulation with plastic-coated anti-CD3 mAb (not shown). Most interestingly, CD47 ligation in Th2 priming conditions had no effect on Th2 cell development.

The decrease of IFN- γ production at priming and restimulation was CD47 specific and not Fc mediated. As shown in Fig. 2, a CD47-Fc fusion protein containing the extracellular domain of CD47 completely abrogated the CD47 mAb-mediated inhibition of IFN- γ production. Furthermore, F(ab')₂ fragments of CD47 mAb as well as the synthetic peptide 4N1K, corresponding to the CD47 binding site of TSP, decreased IFN- γ production almost as efficiently as intact mAb. Control mutant peptide of TSP had no inhibitory effect (not shown).

We next evaluated the complete cytokine profile of effector cells generated after priming in the presence of CD47 mAb. As seen in Table I, CD47 mAb added at priming in Th1 conditions suppressed not only IFN- γ but also TNF- α and LT- α production at restimulation. Treatment with CD47 mAb did not affect the production of IL-4, IL-5, or IL-10, which remained undetectable in these Th1-promoting culture conditions. The suppressive effect on Th1 development contrasted with the lack of an effect on Th2 cell development after priming in the presence of exogenous IL-4. Similar results were obtained by examining cytokine production by CD4⁺

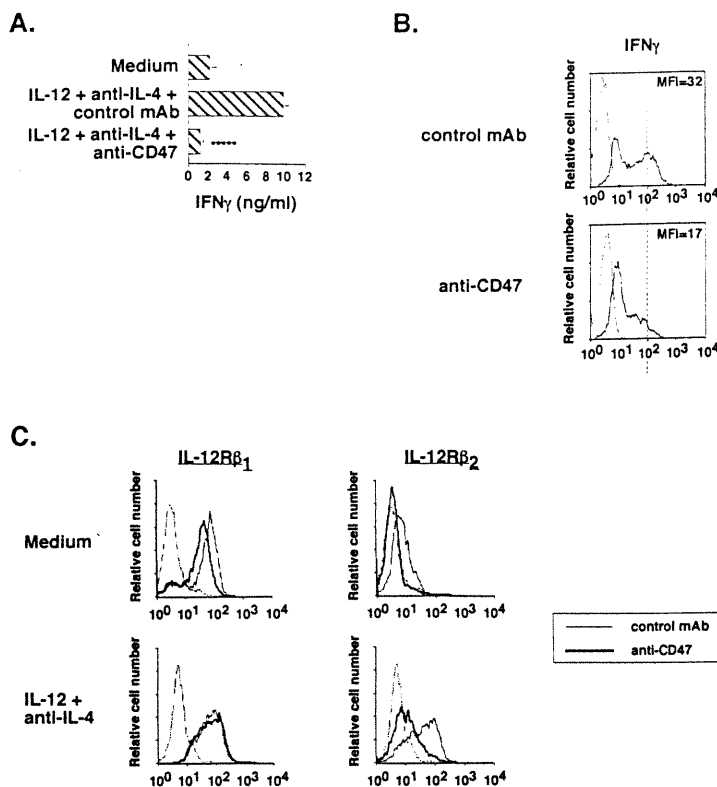
T or CD8⁺ T cells purified at the end of the IL-2 expansion culture (not shown).

Collectively, the above data suggested that engagement of CD47 by mAb or its natural ligand TSP on CBMCs inhibited the generation of IL-12-induced Th1 but not IL-4-induced Th2 effectors.

CD47-mediated inhibition of Th1 effector generation results from impaired IL-12 responsiveness

We next analyzed the possible mechanisms whereby CD47-treated cells secreted decreased levels of Th1 cytokines. First, we showed that it did not result from an increase of activation-induced cell death as measured by FACS analysis of FITC-annexin and PI-stained cells before and after anti-CD3 stimulation (Fig. 3A). Note that the 2-fold increase in annexin⁺/PI⁺ CD47-treated cells was not considered to be significant, because it was not consistently observed in three independent experiments in the course of a daily kinetic study performed during 9 days of cellular expansion in IL-2 (not shown). Also, the expression of Fas and FasL (albeit a low level of expression) was not significantly affected by CD47 mAb treatment (Fig. 3B). Second, we examined whether CD47 ligation impaired IL-12 responsiveness at priming. The data in Fig. 4A revealed that inclusion of CD47 mAb completely prevented the enhanced production of IFN- γ stimulated by IL-12 + anti-IL-4 mAb. Most importantly, the inhibition of Th1 cell development was confirmed by showing reduced IFN- γ production at the single-cell level (Fig. 4B). Third, we examined whether the CD47-mediated inhibition of IL-12 responsiveness was correlated with down-regulation of IL-12R expression at the end of the primary cultures.

FIGURE 4. CD47 ligation inhibits the response of naive T cells to IL-12 and their development into IFN- γ -producing cells. CBMCs were primed for 3 days in nonpolarizing (Medium) and in Th1-polarizing (IL-12 + anti-IL-4 mAb) conditions with anti-CD47 mAb (10 μ g/ml) or control mAb (10 μ g/ml). **A.** After the expansion phase in IL-2, cells were restimulated at 1×10^6 viable cells/ml with anti-CD3 mAb immobilized on 2.5×10^5 irradiated CD32-B7.1-transfected L cells for 48 h. IFN- γ was measured at the end of secondary cultures. Shown is the mean \pm SEM of five experiments. *****, $p < 0.0001$. **B.** After the expansion phase in IL-2, cells in Th1-polarizing conditions were restimulated at 1×10^6 viable cells/ml with anti-CD3 mAb immobilized on 2.5×10^5 CD32-B7.1-transfected L cells. Intracytoplasmic staining of IFN- γ was done 6 h after restimulation. Background staining is in dotted line. MFI was calculated as described in *Materials and Methods*. Shown is one representative experiment of three. **C.** IL-12R β 1 and IL-12R β 2 surface expression was assessed in nonpolarizing (Medium) and in Th1-polarizing conditions at the end of primary cultures by a triple-staining procedure as described in *Materials and Methods*. Background staining is in dotted line. Shown is one representative experiment of three.



In agreement with previous reports (9, 10), the expression of IL-12R β 2 was increased in the presence of IL-12, whereas the constitutive expression of IL-12R β 1 was not enhanced (Fig. 4C). As depicted in the same figure, CD47 mAb markedly suppressed IL-12R β 2 expression on CBMCs activated with PHA as well as the enhancing effect of IL-12.

These data indicated that CD47 ligation impaired IL-12 responsiveness of naive T cells as well as their development into Th1 effectors.

Exogenous IL-2, added at priming, restores IL-12R β 2 expression and Th1 development of CD47-treated cells

IL-2 reportedly up-regulated IL-12R expression on activated T cells (6) and, as indicated in Fig. 1A, CD47 mAb suppressed IL-12- but not IL-4-induced IL-2 production in primary Th1 cultures of CBMCs. The reduced IL-2 secretion was confirmed at the mRNA level by RT-PCR (Fig. 5A). We therefore examined whether addition of exogenous IL-2 at priming counteracted CD47 mAb-mediated inhibition of Th1 development. As depicted in Fig. 5, exogenous IL-2 strongly up-regulated IL-12R β 2 expression and completely prevented CD47 mAb-mediated down-regulation of IL-12R β 2 expression at the end of primary cultures (Fig. 5B) and IFN- γ production at priming and restimulation. This effect was dose dependent (Fig. 5C).

Taking these findings together, we suggest that CD47 ligation induced a decrease of IL-12-induced IL-2 production at priming, which led to reduced IL-12R β 2 expression, IL-12 responsiveness of naive T cells, and impaired Th1 development.

Discussion

It has been established that IL-12 plays an important role not only in protective innate and adaptive immunity but also in chronic inflammatory diseases associated with a strong Th1 response (31–33). We recently reported that CD47 has potential anti-inflammatory activity in that its ligation by soluble mAbs or TSP, its natural ligand, inhibits IL-12 production by human monocytes and dendritic cells and prevented the maturation of the latter into potent T cell immunostimulators (21, 22). In the present study, we show that the same CD47 ligands also block the response of naive T cells to exogenous IL-12 and prevent their differentiation into Th1 effectors. The integrin-associated protein CD47 recently emerged from the literature as a potential immunoregulatory molecule, in addition to being involved in integrin signaling and cell migration. CD47 mAbs were reported to up- or down-regulate T cell activation as well as T cell and B cell death, depending on their epitope specificity, their physical form (immobilized or soluble), and the experimental conditions (34–40). Our unpublished results indicated that two additional soluble CD47 mAbs (clones 2D3 and 10G2), directed against different epitopes, similarly impaired Th1 development of naive T cells.

Interestingly, most of the molecules inhibiting IL-12 production also suppress IL-12 responsiveness, including IL-4, IL-10, TGF- β , glucocorticosteroids, PGE $_2$, cholera toxin, adenosine, the compound lisofylline, and 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ (8, 26–30, 41–43). Ligation of CD47, like 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ (44), inhibits Th1 development without inducing a deviation toward Th2. There was

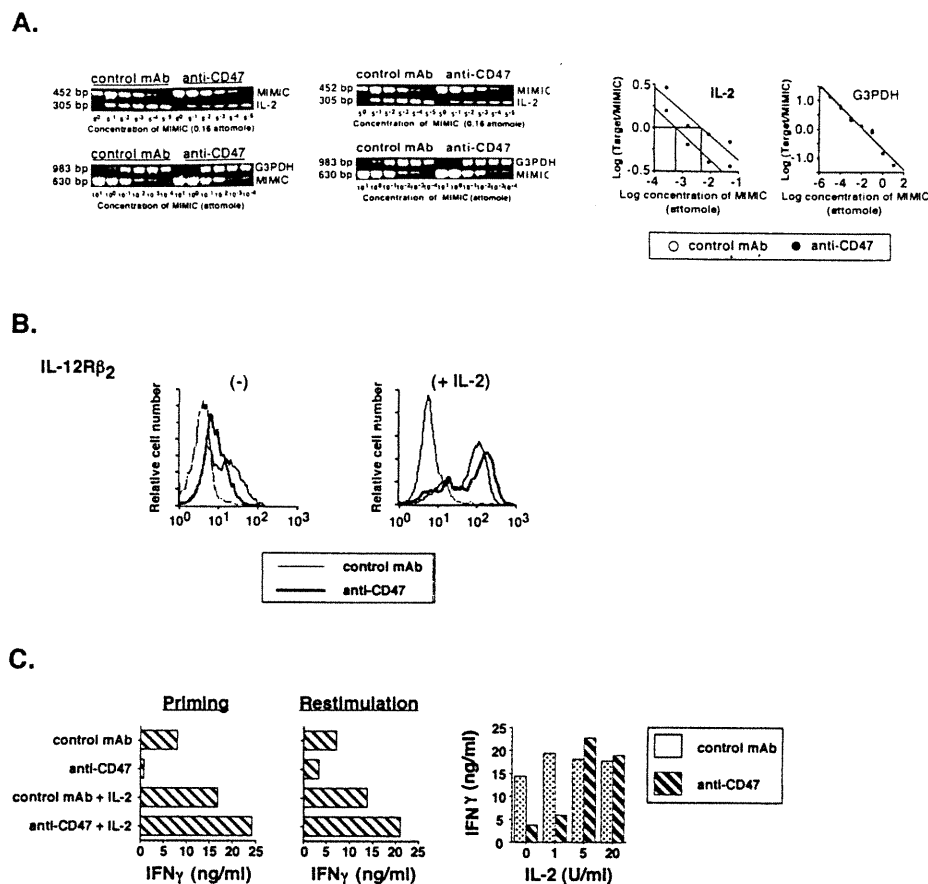


FIGURE 5. Exogenous IL-2, added at priming, restores IL-12R β 2 expression and Th1 development. CBMCs were primed for 3 days in Th1-polarizing conditions (IL-12 + anti-IL-4 mAb) with anti-CD47 mAb (10 μ g/ml) or control mAb (10 μ g/ml) in the absence or in the presence of exogenous IL-2 (20 U/ml). **A.** IL-2 mRNA and G3PDH mRNA were extracted and measured by competitive quantitative RT-PCR after 6 h of primary stimulation as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in one additional experiment. **B.** IL-12R β 2 surface expression was assessed with or without exogenous IL-2 at the end of primary cultures. Background staining is in dotted line. Shown is one representative experiment of three. **C.** *Left*, IFN- γ production at the end of primary cultures of cells stimulated with or without exogenous IL-2. Shown is one representative experiment of three. Cells were then washed, counted with trypan blue, and expanded in IL-2 for 9 to 12 days. *Middle*, IFN- γ production of cells restimulated at 1×10^6 viable cells/ml with coated anti-CD3 mAb for 48 h. Shown is one representative experiment of three. *Right*, IFN- γ production of cells primed without or with increasing concentrations of exogenous IL-2 and restimulated at 1×10^6 viable cells/ml with coated anti-CD3 mAb and soluble anti-CD28 mAb for 48 h. Shown is one representative experiment of three.

no increase of endogenous IL-4 production in that 1) the experiments were conducted in the presence of anti-IL-4 neutralizing mAb and 2) IL-4 remained undetectable. Inhibition of Th1 development is often but not necessarily associated with an induction of Th2 phenotype. For instance, coactivation of naive T cells by anti-CD4 mAb inhibited Th1 differentiation and induced Th2 development (45). Also, IL-12-deficient BALB/c mice, when primed with Ag in CFA, mounted a Th2 instead of a Th1 response. By contrast, IL-12-deficient C57BL/6 mice failed to develop Th1 and Th2 responses, a phenomenon not mediated by endogenous IL-4 or IL-10 (46). A role for endogenous IL-10 in CD47 mAb-mediated inhibition of Th1 response is not supported by the observations that IL-10 was undetectable in primary and secondary cultures and that an anti-IL-10 mAb did not affect CD47 mAb-mediated suppression (data not shown). Our previous reports indicated that the suppression of IL-12 production by CD47 ligation was IL-10 independent

(21, 22). Finally, the inhibition of Th1 development by CD47 mAb is selective, given that it has no effect at all on the Th2 response induced by exogenous IL-4.

Most importantly, the inhibition of Th1 development by CD47 mAb is evidenced by the suppressed production of IFN- γ at the single-cell level and a markedly reduced secretion of Th1 cytokines (IFN- γ , LT- α , and TNF- α) at restimulation of primed T cells that have been expanded for 9 to 12 days in IL-2. In agreement with Rogers et al. (47), IL-2 promoted the development of effectors as well as their expansion. Note that almost complete inhibition of Th1 cytokine production was also observed in the absence of intermediate culture in IL-2 (M.-N. Avicé, unpublished data).

The inhibition of IL-12 responsiveness is often associated with down-regulation of IL-12R β 2 and/or STAT-4 phosphorylation (26, 27). As mentioned, factors regulating the expression of the IL-12R β 2 subunit play a crucial role in Th1 cell development (6).

After TCR-mediated activation, primary T cells transiently express low levels of IL-12R β 2 that are sufficient to confer T cell responsiveness to IL-12. The latter up-regulates IL-12R β 2 by itself and induces IFN- γ production, which in its turn induces long-term expression of this receptor at high levels (9, 10). It was recently demonstrated that the initial up-regulation of IL-12R β 2 after TCR stimulation is strictly dependent on IL-2 production by the activated T cells (48). Thus, in the absence of this early IL-2 production, activated T cells fail to respond to IL-12 and subsequently IFN- γ and cannot acquire a Th1 phenotype, even when primed in the presence of exogenous IL-12 or IFN- γ (48).

We here show that ligation of CD47 in primary cultures of mitogen- and IL-12-activated CBMCs not only inhibits the expression of IL-12R β 2 but also the production of IL-2 and IFN- γ . We therefore propose that the selective inhibition of Th1 response results from CD47-mediated suppression of IL-2 production by activated naive T cells costimulated with IL-12 but not IL-4 (Fig. 1). Indeed, IL-2 synthesis is suppressed in primary cultures as determined at the protein and mRNA levels, and exogenous IL-2 completely reverses all the effects of CD47 mAb, i.e., IL-12R β 2 expression, IFN- γ production, and Th1 cell differentiation. Note that anti-IL-2 and anti-IL-2R mAbs suppress IL-12-induced IFN- γ production to the same extent as anti-CD47 mAb (M-N. Avicé, unpublished observations). These results are in complete agreement with recent findings in the mouse demonstrating that early IL-2 production is required for *in vitro* and *in vivo* induction of Th1 response (48) and provide an explanation to the earlier observations on the critical role of IL-2 in Th1 cell development (49). Our unpublished data further indicate that IL-2 could be replaced by IL-15 that was shown to synergize with IL-12 in inducing IFN- γ production by T cells (25, 50). As mentioned, IL-4 completely overrides the CD47 mAb-mediated inhibitory effect. This is not surprising, given that IL-4 and IL-15 utilize the β and γ chains of the IL-2R. However, we cannot rule out the possibility that IL-2 recruits additional regulatory mechanisms that circumvent the CD47-dependent pathway of inhibition.

Taken collectively, the present findings underline the immunoregulatory role of CD47 and its natural ligand TSP. Together with their ability to inhibit IL-12 production and dendritic cell maturation, our data support the notion that this pair of receptor-ligand molecules may function as natural anti-inflammatory and immunosuppressive agents. TSP is a multifunctional molecule with distinct binding sites for $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins; immature TGF- β ; CD36; and CD47 (20, 51–53). It reportedly enhances the phagocytosis of apoptotic cells, a process that not only fails to induce inflammation but may even suppress it (54, 55). In addition, TSP transforms latent TGF- β into a very potent anti-inflammatory cytokine, and TSP-deficient animals display diffuse inflammatory lesions that are corrected by the administration of TGF- β (56, 57). Note that signal-regulatory protein (SIRP), selectively expressed on neuronal and myeloid cells, was recently described to serve as a novel ligand for CD47 (58), and we are currently investigating its role in the regulation of IL-12 response.

Agents capable of blocking IL-12 production and/or responsiveness are therefore potential candidates for the treatment or prevention of Th1 autoimmune diseases (31–33, 44). For instance, administration of anti-IL-12 mAb but not anti-CD40L mAb (which only decreased IL-12 secretion but not IL-12 responsiveness) completely abrogated established colitis of 4,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-treated mice. Also, 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$, a potent inhibitor of Th1 response, is an effective treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Thus, if applicable *in vivo*, the present findings suggest that inhibiting IL-12-induced IL-2 production and IL-12 responsiveness by targeting

CD47 represents a novel and unexplored pathway for the management and prevention of disease-promoting or undesired Th1 responses.

Acknowledgments

We thank Norma Del Bosco for secretarial assistance.

References

- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffmann. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348.
- Romagnani, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 12:227.
- O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275.
- Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4 $^+$ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12:635.
- Constant, S. L., and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4 $^+$ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15:297.
- Gately, M. K., L. M. Renzetti, J. Magram, A. S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D. H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:495.
- Wu, C.-Y., R. R. Warrier, D. M. Carvajal, A. O. Chua, L. J. Minetti, R. Chizzonite, P. K. A. Mongini, A. S. Stern, U. Gubler, D. H. Presky, and M. K. Gately. 1996. Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor β chain. *Eur. J. Immunol.* 26:345.
- Wu, C.-Y., K. Wang, J. F. McDyer, and R. A. Seder. 1998. Prostaglandin E $_2$ and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J. Immunol.* 161:2723.
- Chang, J. T., E. M. Shevach, and B. M. Segal. 1999. Regulation of interleukin (IL)-12 receptor β_2 subunit expression by endogenous IL-12: a critical step in the differentiation of pathogenic autoreactive T cells. *J. Exp. Med.* 189:969.
- Rogge, L., L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D. H. Presky, U. Gubler, and F. Sinigaglia. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* 185:825.
- Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R- β_2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 185:817.
- Rogge, L., A. Papi, D. H. Presky, M. Biffi, L. J. Minetti, D. Miotto, C. Agostini, G. Semenzato, L. M. Fabbri, and F. Sinigaglia. 1999. Antibodies to the IL-12 receptor β chain mark human Th1 but not Th2 cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 162:3926.
- Heath, V. L., L. Showe, C. Crain, F. J. Barrat, G. Trinchieri, and A. O'Garra. 2000. Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor- β_2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN- γ . *J. Immunol.* 164:2861.
- Nishikomori, R., R. O. Ehrhardt, and W. Strober. 2000. T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of interleukin 12 receptor β_2 chain expression and signaling. *J. Exp. Med.* 191:847.
- Lindberg, F. P., H. D. Gresham, M. I. Reinhold, and E. J. Brown. 1996. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *J. Cell Biol.* 134:1313.
- Lindberg, F. P., H. D. Gresham, E. Schwarz, and E. J. Brown. 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in $\alpha_v\beta_3$ -dependent ligand binding. *J. Cell Biol.* 123:485.
- Lindberg, F. P., D. C. Bullard, T. E. Caver, H. D. Gresham, A. L. Beaudet, and E. J. Brown. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science* 274:795.
- Imhof, B. A., D. Weerasinghe, E. J. Brown, F. P. Lindberg, P. Hammel, L. Piali, M. Dessing, and R. Gisler. 1997. Cross talk between $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_x\beta_1$ integrins regulates lymphocyte migration on vascular cell adhesion molecule 1. *Eur. J. Immunol.* 27:3242.
- Weerasinghe, D., K. P. McHugh, F. P. Ross, E. J. Brown, R. H. Gisler, and B. A. Imhof. 1998. A role for the $\alpha_v\beta_3$ integrin in the transmigration of monocytes. *J. Cell Biol.* 142:595.
- Lahav, J. 1993. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1182:1.
- Armant, M., M-N. Avicé, P. Hermann, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 selectively downregulates human IL-12 production and responsiveness. *J. Exp. Med.* 190:1175.
- Demeure, C. E., H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 164:2193.
- Demeure, C. E., L.-P. Yang, D. G. Byun, H. Ishihara, N. Vezzio, and G. Delespesse. 1995. Human naive CD4 T cells produce interleukin-4 at priming and acquire a Th2 phenotype upon repetitive stimulations in neutral conditions. *Eur. J. Immunol.* 25:2722.
- Ohshima, Y., L. P. Yang, T. Uchiyama, Y. Tanaka, P. Baum, M. Sergerie, P. Hermann, and G. Delespesse. 1998. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4 $^+$ T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 92:3338.
- Avicé, M-N., C. E. Demeure, G. Delespesse, M. Rubio, M. Armant, and M. Sarfati. 1998. IL-15 promotes IL-12 production by human monocytes via T

- cell-dependent contact and may contribute to IL-12-mediated IFN- γ secretion by CD4⁺ T cells in the absence of TCR ligation. *J. Immunol.* 161:3408.
26. Pardoux, C., X. Ma, S. Gobert, S. Pellegrini, P. Mayeux, F. Gay, G. Trinchieri, and S. Chouaib. 1999. Downregulation of interleukin-12 (IL-12) responsiveness in human T cells by transforming growth factor- β : relationship with IL-12 signaling. *Blood* 93:1448.
 27. Franchimont, D., J. Galon, M. Gadina, R. Visconti, Y.-J. Zhou, M. Aringer, D. M. Frucht, G. P. Chrousos, and J. J. O'Shea. 2000. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J. Immunol.* 164:1768.
 28. Blotta, M. H., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 1997. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4⁺ lymphocytes. *J. Immunol.* 158:5589.
 29. Braun, M. C., J. He, C.-Y. Wu, and B. L. Kelsall. 1999. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor β_1 and β_2 chain expression. *J. Exp. Med.* 189:541.
 30. Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heuffer, E. Kampgen, N. Romani, and G. Schuler. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation by MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184:741.
 31. Neurath, M. F., I. Fuss, B. L. Kelsall, E. Stüber, and W. Strober. 1995. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* 182:1281.
 32. Leonard, J. P., K. E. Waldburger, and S. J. Goldman. 1995. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J. Exp. Med.* 181:381.
 33. Stüber, E., W. Strober, and M. Neurath. 1996. Blocking of CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J. Exp. Med.* 183:693.
 34. Reinhold, M. I., F. P. Lindberg, G. J. Kersh, P. M. Allen, and E. J. Brown. 1997. Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein (CD47) is an adhesion-dependent, CD28-independent signaling pathway. *J. Exp. Med.* 185:1.
 35. Vallejo, A. N., L. O. Mugge, P. A. Klimiuk, C. M. Weynand, and J. J. Goronzy. 2000. Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *J. Immunol.* 164:2947.
 36. Ticchioni, M., M. Deckert, F. Mary, G. Bernard, and A. Bernard. 1997. Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *J. Immunol.* 158:677.
 37. Reinhold, M., J. M. Green, F. P. Lindberg, M. Ticchioni, and E. Brown. 1999. Cell spreading distinguishes the mechanism of augmentation of T cell activation by integrin-associated protein/CD47 and CD28. *Int. Immunol.* 11:707.
 38. Waclavicek, M., O. Majdic, T. Stulnig, M. Berger, T. Baumrucker, W. Knapp, and W. Pickl. 1997. T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4. *J. Immunol.* 159:5345.
 39. Pettersen, R. D., K. Hestdal, M. K. Olafsen, S. O. Lie, and F. P. Lindberg. 1999. CD47 signals T cell death. *J. Immunol.* 162:7031.
 40. Mateo, V., L. Lagneaux, D. Bron, G. Biron, M. Armant, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* 5:1277.
 41. Link, A. A., T. Kino, J. A. Worth, J. L. McGuire, M. L. Crane, G. P. Chrousos, R. L. Wilder, and I. J. Elenkov. 2000. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J. Immunol.* 164:436.
 42. Coon, M. E., M. Diegel, N. Leshinsky, and S. J. Klaus. 1999. Selective pharmacologic inhibition of murine and human IL-12-dependent Th1 differentiation and IL-12 signaling. *J. Immunol.* 163:6567.
 43. Penna, G., and L. Adorini. 2000. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* 164:2405.
 44. Mattner, F., S. Smiroldo, F. Galbiati, M. Muller, P. Di Lucia, P. L. Poliani, G. Martino, P. Panina-Bordignon, and L. Adorini. 2000. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25(OH)₂ vitamin D₃. *Eur. J. Immunol.* 30:498.
 45. Goedert, S., T. German, P. Hoehn, S. Koelsch, N. Palm, E. Rude, and E. Schmitt. 1996. Th1 development of naive CD4⁺ T cells is inhibited by co-activation with anti-CD4 monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 157:566.
 46. Galbiati, F., L. Rogge, and L. Adorini. 2000. IL-12 receptor regulation in IL-12-deficient BALB/c and C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* 30:29.
 47. Rogers, P. R., G. Huston, and S. L. Swain. 1998. High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *J. Immunol.* 161:3844.
 48. Chang, J. T., B. M. Segal, and E. M. Shevach. 2000. Role of costimulation in the induction of the IL-12/IL-12 receptor pathway and the development of autoimmunity. *J. Immunol.* 164:100.
 49. Seder, R. A., R. N. Germain, P. S. Linsley, and W. E. Paul. 1994. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and IFN- γ production. *J. Exp. Med.* 179:299.
 50. Seder, R. A. 1996. High dose of IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4⁺ T cells for IFN- γ but have differential effects on priming for IL-4. *J. Immunol.* 156:2413.
 51. Yabkowitz, R., V. M. Dixit, N. Guo, D. D. Roberts, and Y. Shimizu. 1993. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the $\alpha_5\beta_1$ (VLA-4) and $\alpha_5\beta_3$ (VLA-5) integrins. *J. Immunol.* 151:149.
 52. Gao, A.-G., F. P. Lindberg, J. M. Dimitry, E. J. Brown, and W. A. Frazier. 1996. Thrombospondin modulates $\alpha_5\beta_3$ function through integrin-associated protein. *J. Cell Biol.* 135:533.
 53. Schultz-Cherry, S., J. Lawler, and J. E. Murphy-Ullrich. 1994. The type I repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 269:26783.
 54. Ren, Y., and J. Savill. 1995. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Immunol.* 154:2366.
 55. Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, and J. R. Kalden. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350.
 56. Crawford, S. E., V. Stellmach, J. E. Murphy-Ullrich, S. M. F. Ribeiro, J. Lawler, R. O. Hynes, G. P. Boivin, and N. Bouck. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β in vivo. *Cell* 93:1159.
 57. Lawler, J., M. Sunday, V. Thibert, M. Duquette, E. L. George, H. Rayburn, and R. O. Hynes. 1998. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J. Clin. Invest.* 101:982.
 58. Seiffert, M., C. Cant, Z. Chen, I. Rappold, W. Brugger, L. Kanz, E. J. Brown, A. Ullrich, and H.-J. Bühring. 1999. Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. *Blood* 94:3633.

DISCUSSION

De nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* ont confirmé le rôle important de l'IL-12 non seulement dans la protection de l'organisme contre des pathogènes intracellulaires (Heinzel *et al.*, 1993; Hsieh *et al.*, 1993; Sypek *et al.*, 1993; Gazzinelli *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1997) ou contre le cancer (Brunda *et al.*, 1993; Golab and Zagozdzon, 1999; Grufman and Kärre, 2000), mais également dans l'induction et, dans certains cas, le maintien de la pathologie associée à plusieurs maladies auto-immunes de type Th1 spécifiques d'organes telles que l'encéphalomyélite allergique expérimentale/sclérose en plaques (Leonard *et al.*, 1995; Segal *et al.*, 1998), l'arthrite rhumatoïde (Germann *et al.*, 1995d; McIntyre *et al.*, 1996), la glomérulonéphrite (Kitching *et al.*, 1999), l'uvéorétinite (Tarrant *et al.*, 1998), la thyroïdite (Zaccone *et al.*, 1999) et la myasthénie (Moiola *et al.*, 1998). Il est généralement accepté que l'administration d'IL-12 au moment d'une immunisation avec un auto-antigène exacerbe les maladies auto-immunitaires de type Th1. L'injection d'IL-12 ou d'un antagoniste du récepteur de l'IL-12 soit l'homodimère (p40)₂ dans des souris NOD, lesquelles sont génétiquement susceptibles de développer le diabète sucré insulino-dépendant, accélère ou prévient l'établissement de cette maladie auto-immune, respectivement (Trembleau *et al.*, 1995b; Trembleau *et al.*, 1997). Une constatation inattendue a eu lieu récemment chez des souris NOD déficientes pour l'IL-12. En réponse à l'auto-antigène IA-2, ces dernières conservent leur capacité de développer le diabète due à la présence de lymphocytes Th1 pathogéniques infiltrant le pancréas (Trembleau *et al.*, 1999). Dernièrement, le groupe de Tarrant *et al.* (1999) innovait en démontrant que l'injection d'IL-12 supprime le développement de l'uvéorétinite. De manière générale, une surproduction d'IL-12 est aussi observée dans des désordres inflammatoires tels que le choc septique (Wysocka *et al.*, 1995) et la réaction de Shwartzman (Ozmen *et al.*, 1994) ou encore dans des maladies inflammatoires chroniques comme la maladie de Crohn (Neurath *et al.*, 1995). Récemment, il a été

suggéré que l'IL-12 est impliquée dans l'induction et le maintien de l'état inflammatoire dans les lésions athérosclérotiques et psoriatiques (Uyemura *et al.*, 1996; Yawalkar *et al.*, 1998). À la lumière de ces constats, des interventions visant à augmenter la production d'IL-12 sont donc potentiellement dotées d'un intérêt thérapeutique dans le cadre des maladies infectieuses, de cancer ou de la vaccination. À l'opposé, des manipulations permettant de réduire la sécrétion ou la réponse à l'IL-12 peuvent être envisagées pour le traitement de la plupart des maladies auto-immunitaires et/ou inflammatoires chroniques.

Lors d'une réponse immunitaire, la production d'IL-12 est rigoureusement contrôlée. Certains facteurs solubles endogènes ont un effet inhibiteur comme l'IL-4 (Snijders *et al.*, 1996), l'IL-10 (D'Andrea *et al.*, 1993; Aste-Amezaga *et al.*, 1998), l'IL-11 (Trepicchio *et al.*, 1996; Leng and Elias, 1997), l'IL-13 (D'Andrea *et al.*, 1995; Muchamuel *et al.*, 1997), le TGF- β (D'Andrea *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1998), les IFN de type I - α et - β (Cousens *et al.*, 1997; McRae *et al.*, 1998) et les agents chimioattractants MCP-1 à 4 et C5a (Braun *et al.*, 2000). Van der Pouw Kraan *et al.* (1995) ont été les premiers à démontrer que le PGE₂, un agent capable d'augmenter les niveaux intracellulaires d'AMPc, est aussi un puissant inhibiteur de la synthèse d'IL-12. Plusieurs autres composés endogènes élèvent les concentrations d'AMPc et imitent l'effet du PGE₂. Parmi ceux-ci, on retrouve les agonistes des adrénorécepteurs β_2 comme les hormones du stress adrénaline et noradrénaline (Elenkov *et al.*, 1996; Panina-Bordignon *et al.*, 1997; Haskó *et al.*, 1998a), les agonistes des récepteurs A2a tels que l'adénosine (Link *et al.*, 2000), l'histamine (Elenkov *et al.*, 1998; Van der Pouw Kraan *et al.*, 1998) et les neuropeptides VIP, PACAP et CGRP (Delgado *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000a). D'ailleurs, l'utilisation thérapeutique de pentoxifylline, un agent pharmacologique connu pour sa capacité d'augmenter l'AMPc, a permis de

réduire la production d'IL-12 par les PBMC de patients atteints de sclérose en plaques (Rieckmann *et al.*, 1996). Les glucocorticostéroïdes représentent une autre gamme de molécules endogènes qui suppriment la sécrétion d'IL-12 par les CPA et sont fortement appréciés cliniquement pour leur rôle anti-inflammatoire (Blotta *et al.*, 1997; DeKruyff *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 1998; Franchimont *et al.*, 2000). L'inhibition de la production d'IL-12 est également observée avec des molécules solubles capables de moduler l'action du facteur de transcription NF- κ B lequel possède un site de reconnaissance dans les régions promotrices du gène codant pour la sous-unité p40 de l'IL-12 (Murphy *et al.*, 1995; Plevy *et al.*, 1997). La 1, 25-dihydroxyvitamine D3 et l'acide acétyl salicylique sont deux composés qui justement empêchent la sécrétion d'IL-12 en diminuant l'activation du NF- κ B et en bloquant la liaison de ce dernier à sa séquence consensus sur l'ADN génomique (D'Ambrosio *et al.*, 1998; Mazzeo *et al.*, 1998). L'altération des mouvements ioniques au travers des canaux ou des pompes des membranes cellulaires est aussi un mécanisme connu pour affecter à la baisse la synthèse d'IL-12. Les ions impliqués sont entr'autres le calcium (Nemeth *et al.*, 1998; Poggi *et al.*, 1998).

Plusieurs molécules endogènes solubles ont jusqu'à maintenant été décrites comme ayant un effet anti-inflammatoire de par leur habileté à inhiber la production d'IL-12. D'autres ont cependant un effet facilitant et parmi celles-ci se trouvent l'IFN- γ (Hayes *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996), le TNF- α (Flesch *et al.*, 1995) et le GM-CSF (Kubin *et al.*, 1994). Il est à noter que dans certaines conditions expérimentales, l'IL-4, l'IL-13 et le PGE₂ peuvent faciliter plutôt qu'inhiber la synthèse d'IL-12 (D'Andrea *et al.*, 1995; Rieser *et al.*, 1997). Par exemple, le pré-traitement de PBMC avec de l'IL-4 ou de l'IL-13 pour une période de plus de 20 heures permet d'augmenter l'IL-12 en réponse au LPS ou au SAC. À l'inverse, il a été récemment rapporté que le TNF- α a

aussi la capacité de bloquer la production d'IL-12 (Ma *et al.*, 2000b). Notre étude sur l'IL-15 découle d'un travail précédent, effectué dans notre laboratoire, où il a été décrit qu'en présence d'IL-2, le faible niveau de CD154 exprimé à la surface des lymphocytes T non activés par le TCR est suffisant pour induire la sécrétion d'IL-12 par les monocytes CD40⁺ autologues (Armant *et al.*, 1996). L'IL-12 opérait alors en synergie avec l'IL-2 afin de promouvoir la production d'IFN- γ par les lymphocytes T totaux, contribuant ainsi au processus inflammatoire. Le rôle initial de l'IL-2 est essentiellement d'accroître l'expression de certaines molécules adhésives comme le CD2, le CD54 et le LFA-3 et donc de permettre un contact plus étroit entre les deux types cellulaires (Vyth-Dreese *et al.*, 1993; Boussiotis *et al.*, 1994b). Certains travaux ont effectivement montré l'implication des interactions adhésives CD11b/CD18 (LFA-1) - CD54 (ICAM-1) et CD2 - CD58 (LFA-3) dans l'aggrégation cellulaire (Vyth-Dreese *et al.*, 1993). Compte tenu que l'IL-2 est exclusivement produite par des lymphocytes T activés via l'engagement du TCR (Jain *et al.*, 1995), ce modèle suggère que, *in fine*, la réaction inflammatoire est initiée par un petit nombre de ces lymphocytes T, lesquels libèrent des quantités suffisantes d'IL-2 pour initier l'interaction entre les lymphocytes T non activés par le TCR et les macrophages. Puisque l'IL-15 possède plusieurs activités biologiques similaires à celles de l'IL-2, nous avons postulé puis confirmé que cette cytokine pouvait se substituer à l'IL-2 dans l'initiation d'une réponse inflammatoire.

Rôle de l'IL-15 dans la régulation de la production d'IL-12.

Au cours de ce travail, nous avons donc démontré que l'IL-15 joue un rôle important dans la régulation de la production d'IL-12 par les monocytes humains et ce, grâce à un système expérimental de cocultures de lymphocytes T (non activés par le TCR) et de monocytes autologues, pouvant reproduire un état inflammatoire. En

présence d'IL-15, les lymphocytes T CD4⁺CD154⁺ prolifèrent et lient le CD40 exprimé à la surface des monocytes, permettant de déclencher la sécrétion d'IL-12 par ces derniers. L'IL-12 agit à son tour sur les lymphocytes T CD4⁺ en induisant la production d'IFN- γ . Cette sécrétion endogène d'IL-12, en réponse à l'IL-15 exogène, dépend principalement de l'interaction CD40-CD154, tel que démontré par l'utilisation d'un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre le CD154. De plus, une absence de sécrétion d'IL-12 est constatée lorsque les monocytes sont cocultivés avec des lymphocytes T CD8⁺CD154⁺.

L'IL-15 est non seulement impliquée dans la régulation de la production d'IL-12 par les monocytes, mais aussi dans la réponse des lymphocytes T à cette cytokine. Dans notre système de cocultures, la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺, en réponse à l'IL-12 exogène, dépend en partie de la présence d'IL-15 endogène. Ce phénomène se reflète également dans un second modèle expérimental où les lymphocytes T CD4⁺ sont cultivés uniquement en présence de cytokines (absence de monocytes). Nous avons montré que l'IL-12 et l'IL-15 doivent obligatoirement être ajoutées ensemble pour promouvoir la production d'IFN- γ . Par contre, l'addition d'IL-15 seule, contrairement à l'IL-12, suffit à entraîner la prolifération des lymphocytes T CD4⁺. Bien que les lymphocytes T CD8⁺ ne soient pas impliqués dans l'induction de la sécrétion d'IL-12 par les monocytes, nos résultats montrent que ces cellules ont cependant la capacité de répondre à l'IL-12 et à l'IL-15 (Annexe 1; Fig.1) et ce, exactement de la même façon que les lymphocytes T CD4⁺. Dans la littérature, il a été rapporté que l'IL-15 induit directement le marqueur d'activation précoce CD69 suivi de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ mémoires et T CD8⁺ naïfs et mémoires humains *in vitro* (Kanegane and Tosato, 1996). Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ne prolifèrent pas en réponse à l'IL-15 puisque ces cellules n'expriment pas la chaîne β du

récepteur à l'IL-2, laquelle est un élément essentiel pour la signalisation par l'IL-15. Il est à noter que chez la souris, seuls les lymphocytes T CD8⁺ mémoires (CD44^{hi}) expriment des niveaux élevés de la chaîne β du récepteur à l'IL-2 et prolifèrent en réponse à l'IL-15 (Zhang *et al.*, 1998; Gasser *et al.*, 2000).

En résumé, l'IL-15 a un rôle indirect dans l'induction de la production d'IL-12 par les monocytes en favorisant une augmentation de l'expression de la molécule CD40 sur ces cellules. En ce qui a trait à la réponse des lymphocytes T à l'IL-12, l'IL-15 possède une activité directe puisqu'elle soutient une hausse de l'expression constitutive de la chaîne $\beta 1$ du récepteur à l'IL-12 sur les lymphocytes T CD4⁺. Nous n'avons pas vérifié la régulation de l'expression de cette chaîne à la surface des lymphocytes T CD8⁺, mais à la vue des résultats mentionnés précédemment (Annexe 1; Fig.1), nous postulons que l'IL-15 joue un rôle similaire sur ces lymphocytes. Le récepteur de l'IL-12 est composé des chaînes $\beta 1$ et $\beta 2$ (Stahl and Yancopoulos, 1993; Chua *et al.*, 1994; Presky *et al.*, 1995; Presky *et al.*, 1996), lesquelles permettent une liaison de haute affinité avec le ligand bien que seule la chaîne $\beta 2$, contenant trois résidus tyrosines dans sa queue cytoplasmique, soit responsable de la signalisation intracellulaire via l'activation de STAT 4 (Szabo *et al.*, 1997). Au moment d'effectuer nos expériences en cytométrie de flux, un anticorps dirigé contre la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 n'était pas disponible commercialement. Cette codépendance de l'IL-15 et de l'IL-12 nous permet d'envisager un mécanisme potentiel d'activation des lymphocytes T inflammatoires dans des désordres chroniques dominés par une réponse de type Th1 tels que la maladie de Crohn, la sarcoïdose pulmonaire ou encore l'arthrite rhumatoïde (Agostini *et al.*, 1996; Moller *et al.*, 1996; McInnes *et al.*, 1997).

L'IL-15 est présente de façon significative dans la membrane synoviale et le liquide synovial (concentration moyenne de 307 pg/ml) chez environ 50% des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, contrairement à l'absence relative d'IL-2 (Firestein *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1994; Ulfgren *et al.*, 1995; McInnes *et al.*, 1996; McInnes *et al.*, 1997; McInnes and Liew, 1998). Différents groupes ont démontré que l'IL-15 seule, ou en combinaison avec l'IL-6 et le TNF- α , contribue grandement à l'excès de TNF- α observé dans les articulations (McInnes *et al.*, 1997; Sebbag *et al.*, 1997). Ceci s'effectue par un mécanisme qui est indépendant de l'antigène causant initialement le désordre et qui exige principalement un contact entre les lymphocytes T non activés par le TCR et les monocytes synoviaux sécréteurs de TNF- α bien que l'IL-15 peut également induire directement la production de TNF- α par ces lymphocytes T. Par contre, la sécrétion de TNF- α en réponse à l'IL-2 exogène est beaucoup plus faible ou pratiquement nulle dans ces conditions (McInnes *et al.*, 1997). Néanmoins, elle est amplifiée dans la mesure où l'IL-6 et le TNF- α sont associés à l'IL-2 (Sebbag *et al.*, 1997). Les résultats obtenus dans mon modèle expérimental montrent que l'IL-15, tout comme l'IL-2, sont des cytokines ayant une activité pro-inflammatoire. Il n'est pas surprenant d'observer des fonctions redondantes entre ces deux interleukines étant donné que l'IL-15 utilise comme voie de signalisation une partie du récepteur à l'IL-2, soit les composantes β et γ , impliquées dans la transduction du signal, et sa propre chaîne α de haute affinité, c'est-à-dire l'IL-15R α (Bamford *et al.*, 1994; Burton *et al.*, 1994; Carson *et al.*, 1994; Giri *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1995b; Giri *et al.*, 1995). Cependant, il est intéressant de noter que dans le modèle de l'arthrite rhumatoïde, une divergence nette existe entre ces deux cytokines. En plus de l'absence endogène d'IL-2, nous pouvons imaginer qu'une expression différentielle de la chaîne α des récepteurs de ces deux interleukines serait une cause de ces réponses distinctes dans la pathophysiologie de cette maladie. Seulement 10% des lymphocytes T synoviaux

expriment la chaîne α du récepteur à l'IL-2 soit le CD25 (Iannone *et al.*, 1994). Malgré le fait que l'IL-15 ait été découverte de par ses rôles similaires à ceux de l'IL-2, des activités uniques *in vivo* ont été récemment démontrées dans des souris déficientes au niveau de la chaîne α du récepteur à l'IL-15 (IL-15R α^{-}) ou encore dans des souris déficientes pour l'IL-15 (IL-15 $^{-}$) (Lodolce *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000; Ma, 2000a). En effet, l'IL-15 supporte préférentiellement la réponse innée du système immunitaire, c'est-à-dire qu'elle régule le développement et/ou la survie des cellules NK, des lymphocytes T CD56 $^{+}$ et de populations distinctes de lymphocytes T intra-épithéliaux représentées par les marqueurs TCR- α/β^{+} CD8 $\alpha\alpha$ et TCR- γ/δ^{+} CD8 $\alpha\alpha$. Cette cytokine est aussi impliquée dans l'immunité acquise en maintenant la survie des lymphocytes T CD8 $^{+}$ de phénotype mémoire (Lodolce *et al.*, 1998; Zhang *et al.* 1998; Kennedy *et al.*, 2000; Ma, 2000a). Une étude publiée depuis peu montre même un effet antagoniste de l'IL-15 et de l'IL-2. Li *et al.* (2001a) rapportent que l'IL-15 est un facteur de croissance critique pour initier la division des lymphocytes T *in vivo* alors que l'IL-2 limite l'expansion continue de ces lymphocytes T en diminuant l'expression de la chaîne γ de son récepteur.

Dans notre modèle de cocultures, l'interaction CD40-CD154 est nécessaire pour promouvoir la sécrétion d'IL-12 par les monocytes en réponse à l'IL-15. Plusieurs autres études ont démontré l'importance de cette interaction dans l'induction de la production de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-12 et de chimiokines incluant l'IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β et MCP-1 (Caux *et al.*, 1994; Cella *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 1996; McDyer *et al.*, 1999; Thienel *et al.*, 1999). Une façon de moduler la réponse immunitaire est de réguler l'expression de l'une et/ou l'autre de ces molécules de surface. Par exemple, l'IFN- γ , le GM-CSF,

l'IL-3 et le CD23 soluble ont tous la capacité d'augmenter l'expression du CD40 sur les monocytes humains (Alderson *et al.*, 1993; Armant *et al.*, 1995). Tel que mentionné précédemment, nous avons montré que l'IL-15 (ainsi que l'IL-2) exploite ce mécanisme en augmentant l'expression du CD40 sur les monocytes. Par contre, l'expression du CD154 sur les lymphocytes T CD4⁺ au repos (détectée en cytométrie de flux par une coloration en trois étapes; voir la section *Materials and Methods* de l'article 1), isolés du sang périphérique d'individus normaux, n'est pas touchée par ces deux cytokines. Récemment, Möttönen *et al.* (2000) rapportaient que les lymphocytes T CD4⁺ fraîchement isolés des fluides synovial et sanguin de patients atteints d'arthrite rhumatoïde et du sang périphérique d'individus contrôles n'expriment pas de CD154 mais ce, en employant une méthode de coloration directe des cellules. De plus, ils ont remarqué que l'IL-15, mais pas l'IL-2, induit l'expression du CD154 sur ces lymphocytes T, à l'exception de ceux isolés d'individus contrôles. En utilisant une méthode de coloration indirecte, en deux étapes, de la molécule CD154, un autre groupe infirme une partie des résultats de Möttönen *et al.* (2000). Il montre que le CD154 est détecté sur les lymphocytes T CD4⁺ fraîchement isolés du sang périphérique et du liquide synovial de personnes arthritiques, mais pas sur ceux du sang périphérique d'individus contrôles (MacDonald *et al.*, 1997). Dans notre modèle expérimental, les lymphocytes T CD8⁺ n'ont pas de rôle à jouer dans l'induction de la sécrétion d'IL-12 par les monocytes de par l'absence du CD154, mais ils répondent aussi bien que les lymphocytes T CD4⁺ à l'IL-12 et à l'IL-15. Une étude publiée peu après la nôtre démontre que le CD154 est exprimé à un faible niveau, mais significatif, sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ des follicules lymphoïdes synoviaux et que ces derniers sont aussi impliqués dans la formation de centres germinatifs chez les patients atteints d'arthrite (Wagner *et al.*, 1998). Hermann *et al.* (1995) avaient d'ailleurs observé la

présence du CD154 sur des clones de lymphocytes T CD8⁺, lesquels permettaient la croissance et la différenciation des lymphocytes B.

La liaison du CD40, dans la fraction de cellules adhérentes du tissu synovial arthritique, induit la production de TNF- α (Harigai *et al.*, 1999). Préalablement à cette étude, McInnes *et al.* (1997) démontrait, avec des anticorps monoclonaux bloquants, que les molécules CD69, ICAM-1 et LFA-1 sont responsables de l'induction de la sécrétion de TNF- α par les monocytes/macrophages synoviaux suite à leur interaction avec les lymphocytes T synoviaux stimulés par l'IL-15. Il aurait été intéressant de vérifier si l'interaction CD40-CD154 est aussi impliquée dans cette production de TNF- α en réponse à l'IL-15. La sécrétion d'IL-12 est également observée chez des patients arthritiques (Butch *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 1998). Au lieu d'isoler des monocytes et des lymphocytes T du sang périphérique d'individus normaux, nous aurions pu continuer notre étude sur les activités pro-inflammatoires de l'IL-15 en utilisant des cellules provenant de la membrane synoviale d'individus atteints d'arthrite rhumatoïde afin de vérifier les points suivants: 1) l'IL-15 induit-elle la production d'IL-12 et de TNF- α via l'interaction CD40-CD154 dans ce modèle ? et 2) contrairement à notre modèle de départ, est-ce que les lymphocytes T CD8⁺ synoviaux induisent la sécrétion d'IL-12 par les monocytes ? puisqu'il a été démontré que le CD154 est aussi exprimé sur ces cellules (Wagner *et al.*, 1998).

De façon similaire, des cellules mononucléées isolées de la lamina propria de patients atteints de la maladie de Crohn sécrètent fortement l'IL-15 et de manière encore plus prononcée lorsqu'elles sont stimulées par l'IFN- γ ou le LPS, c'est-à-dire jusqu'à des concentrations de 600 ng/ml (Liu *et al.*, 2000b). Dans ce modèle, les lymphocytes T CD154⁺, lorsque pré-traités à l'IL-15, augmentent la production de cytokines pro-

inflammatoires soit l'IL-12 et le TNF- α par les monocytes du tissu intestinal via l'interaction CD40-CD154. Aussi, l'IL-15 peut induire directement la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par ces lymphocytes T, contrairement à notre modèle où l'IL-15 seule ne permet que la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ hautement purifiées. Dans leur système de cocultures, les monocytes n'ont pas été en présence d'IL-15. Ainsi, la facilité des lymphocytes T à hausser la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes est due à une augmentation de l'expression constitutive du CD154 à leur surface en réponse à leur pré-traitement à l'IL-15.

En plus des facteurs solubles endogènes, décrits plus haut, pouvant soit stimuler soit inhiber la synthèse d'IL-12, l'interaction des CPA avec des composants de la matrice extracellulaire ou avec des molécules de surface sur les lymphocytes T contribuent aussi à moduler la sécrétion de cette cytokine pro-inflammatoire et ce, en présence ou même en absence de tout agent infectieux. Par exemple, les macrophages CD44⁺ produisent de l'IL-12 suite à une interaction avec les fragments de faibles poids moléculaires de l'acide hyaluronique de la matrice extracellulaire (Hodge-Dufour *et al.*, 1997). Lorsque les lymphocytes T CD154⁺ se lient au CD40 ou encore lorsque le CMH de classe II est engagé par un anticorps monoclonal sur les CPA, il y a déclenchement de la sécrétion d'IL-12 par ces dernières (Shu *et al.*, 1995; Cella *et al.*, 1996; Koch *et al.*, 1996). Il existe également des régulateurs négatifs de surface et ceux-ci comprennent: (1) le CD46 qui est un récepteur utilisé entr'autres par le virus de la rougeole pour infecter les monocytes (Karp *et al.*, 1996), (2) les récepteurs impliqués dans la phagocytose tels que l'intégrine CR3 (CD11b/CD18) (Marth and Kelsall, 1996) et le Fc γ -R (Berger *et al.*, 1997; Sutterwala *et al.*, 1997) et (3) les récepteurs aux LDL acétylées (Uyemura *et al.*, 1996). Au cours de mon travail de doctorat, j'ai analysé le

rôle de deux autres molécules de surface soit LAG-3 et CD47 dans la régulation de la production d'IL-12 chez l'homme.

Rôle de LAG-3 dans la régulation de la production d'IL-12.

Tel que mentionné précédemment, il a été rapporté dans la littérature que la liaison du CMH de classe II par un anticorps monoclonal induit la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques (Koch *et al.*, 1996). LAG-3 est une molécule structurellement reliée à la molécule CD4 (Triebel *et al.*, 1990) et tout comme cette dernière, elle possède la capacité de s'associer au complexe CD3-TCR (Hannier *et al.*, 1998). Son ligand naturel est le CMH de classe II (Baixeras *et al.*, 1992). Nous avons alors proposé que l'interaction de LAG-3 avec le CMH de classe II pourrait représenter une seconde approche utilisée par les lymphocytes T, en plus de l'interaction du CD154 avec la molécule CD40 exprimée à la surface des CPA, pour promouvoir la synthèse d'IL-12. Nous avons donc approfondi notre analyse sur les mécanismes régissant l'activité pro-inflammatoire des lymphocytes T non activés par l'engagement du TCR sur la production d'IL-12 par les monocytes et les cellules dendritiques humains.

Brièvement, les principaux résultats de notre étude se résument comme suit. Tout d'abord, LAG-3 est exprimé à des taux élevés sur les lymphocytes T non activés par le TCR qui sont cocultivés avec des monocytes autologues et de l'IL-2. Cette induction de l'expression de LAG-3 est dépendante de l'IL-2 exogène et de l'IL-12 endogène sécrétée par les monocytes. Dans un deuxième temps, une inhibition de la production d'IL-12 et d'IFN- γ est observée suite à l'addition d'un anticorps neutralisant anti-LAG-3 dans ce même système expérimental. Nous avons également remarqué une diminution de la réponse à l'IL-12 par les lymphocytes T lorsque cette dernière a été co-

ajoutée avec l'anticorps anti-LAG-3 et ce, non seulement dans notre modèle de cocultures et d'IL-2, mais aussi avec des lymphocytes T hautement purifiés. Aucune vérification n'a été effectuée en ce qui a trait à l'expression des deux sous-unités du récepteur à l'IL-12 soit les chaînes $\beta 1$ et $\beta 2$ sur les lymphocytes T purifiés et cultivés avec l'anticorps anti-LAG-3. Cependant, il aurait été intéressant de le faire, car d'après les résultats mentionnés précédemment, il est facile de postuler une inhibition d'une ou des deux chaînes. Afin de s'assurer que l'anticorps bloquant anti-LAG-3 diminue la synthèse d'IL-12 en inhibant un signal positif donné par l'interaction de LAG-3 avec le CMH de classe II et non pas par l'engagement de la portion Fc de l'anticorps anti-LAG-3 avec le récepteur Fc exprimé à la surface des monocytes, nous avons utilisé une protéine de fusion LAG-3Ig soluble pour vérifier la validité de notre hypothèse. Dans la suite de cette étude sur LAG-3, comme régulateur positif potentiel de la production d'IL-12, nous avons observé que LAG-3Ig costimule la sécrétion d'IL-12, en réponse à des doses suboptimales de CD154 soluble, par les monocytes alors que cette même protéine de fusion induit directement la production d'IL-12 par les cellules dendritiques. Au moment de débiter notre travail sur la régulation de la production d'IL-12 chez l'homme, une des principales sources de cette cytokine était les monocytes/macrophages (D'Andrea *et al.*, 1992; Hsieh *et al.*, 1993). Ceci explique pourquoi notre choix s'arrêta sur l'utilisation des monocytes, isolés du sang périphérique humain, lors de nos premières expériences qui concernaient l'IL-15 et ses effets sur la synthèse d'IL-12. Par la suite, il fût démontré que les cellules dendritiques sont en fait les cellules les plus importantes en ce qui a trait à la sécrétion d'IL-12 en réponse à divers stimuli (Macatonia *et al.*, 1995; Sousa *et al.*, 1997). Ainsi, lors de l'analyse de l'implication de la molécule de surface LAG-3 sur la régulation de la production d'IL-12, des monocytes et des cellules dendritiques furent employés lors des manipulations *in vitro*.

Ces constatations suggèrent que LAG-3 sert des fonctions à la fois effectrices et réceptrices. En effet, LAG-3 donne un signal positif aux CPA en liant le CMH de classe II ce qui permet d'induire la production d'IL-12 par ces cellules. Ainsi, de façon similaire au CD154, LAG-3 pourrait être impliqué dans l'activité pro-inflammatoire des lymphocytes T non activés par le TCR. De plus, l'engagement de LAG-3 à la surface des lymphocytes T inhibe la réponse de ces cellules à l'IL-12 tel que démontré par une diminution de la sécrétion d'IFN- γ .

Lorsque nous avons débuté ce travail sur LAG-3, très peu d'informations étaient disponibles sur cette molécule et la majorité des études publiées concernaient l'activité inhibitrice de LAG-3 sur la réponse immunitaire. Lors de l'interaction entre des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'un antigène, des CPA et l'antigène (un peptide de l'hémagglutinine ou encore un toxoïde de la diphtérie), la présence d'un anticorps monoclonal neutralisant anti-LAG-3 résulte en une augmentation de la prolifération, du marqueur d'activation CD25 et de la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ par les lymphocytes T (Huard *et al.*, 1994b). D'après cette étude, LAG-3 agit non pas au moment d'initier une réponse immune, mais bien une fois celle-ci installée puisque l'ajout de l'anticorps anti-LAG-3 jusqu'au jour 3 n'affecte en rien le développement de l'immunité. En utilisant la protéine de fusion LAG-3Ig soluble, il a été démontré par la suite une même inactivation de la réponse immunitaire, c'est-à-dire une diminution de la prolifération et de la production de cytokines par les lymphocytes T CD4⁺ activés suite à l'engagement du TCR (Huard *et al.*, 1996; Subramanyam *et al.*, 1998). Il semble que l'activité inhibitrice de LAG-3 soit spécifique aux lymphocytes T CD4⁺. En effet, LAG-3 n'interfère à aucun moment avec le développement et les fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ (Huard *et al.*, 1994b; Subramanyam *et al.*, 1998). Récemment, il a été décrit que l'engagement de LAG-3 sur les lymphocytes T induit une diminution

de l'expression du complexe CD3-TCR suggérant ainsi un mécanisme utilisé par LAG-3 pour inactiver la réponse immunitaire (Hannier *et al.*, 1998).

D'après ce qui a été décrit dans la littérature et d'après nos propres observations, nous aurions pu poursuivre notre étude sur LAG-3 en approfondissant les quelques points suivants. Tout d'abord, toutes nos manipulations expérimentales concernant le rôle de LAG-3 dans la régulation de la production d'IL-12 ont été effectuées avec un modèle de lymphocytes T, non activés par le TCR et non fractionnés, et de monocytes autologues en présence d'IL-2. Il aurait été intéressant d'isoler les lymphocytes T CD4⁺ des lymphocytes T CD8⁺ et de regarder *in vitro* le rôle de chacune de ces deux sous-populations cellulaires dans la régulation de la sécrétion d'IL-12 par LAG-3. Lors de nos études comparatives sur les fonctions biologiques de l'IL-15 et de l'IL-2 en ce qui a trait à la production d'IL-12 par les monocytes humains, nous avons démontré que seuls les lymphocytes T CD4⁺ sont capables d'induire la synthèse d'IL-12 par ces types de CPA puisque, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺, ils expriment la molécule CD154 (voir Article 1; figure 2). Il a été rapporté que les lymphocytes T CD8⁺ possèdent, en terme d'intensité moyenne de fluorescence, jusqu'à sept fois plus de LAG-3 de surface que les lymphocytes T CD4⁺ (Huard *et al.*, 1994a). Tel que décrit dans notre publication, le LAG-3Ig soluble costimule avec le CD154 la sécrétion d'IL-12 par les monocytes alors qu'il a la capacité d'induire directement, donc en absence de CD154, la production de cette cytokine pro-inflammatoire par les cellules dendritiques. D'après toutes ces observations, il aurait été intéressant d'examiner le rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans l'initiation de la sécrétion d'IL-12 non pas par les monocytes, mais par les cellules dendritiques. Le modèle expérimental aurait alors pu être le suivant: lymphocytes T CD8⁺CD154⁻LAG-3⁺ non activés par le TCR + cellules dendritiques autologues + IL-2. En même temps, il aurait été opportun d'examiner si

l'IL-15, comme pour l'IL-2, est capable d'induire l'expression de LAG-3 sur les lymphocytes dans ce modèle de cocultures.

Dans un autre ordre d'idée, nous aurions pu étudier la contribution de LAG-3 dans la régulation de la synthèse d'IL-12 en utilisant les leucocytes périphériques de patients ayant une déficience pour la molécule CD154. Ce déficit entraîne le développement du syndrome hyper IgM et une susceptibilité à des pathogènes intracellulaires comme *Pneumocystis carinii* et *Cryptosporidium parvum* due à une déficience dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Allen *et al.*, 1993; Aruffo *et al.*, 1993; DiSanto *et al.*, 1993; Fuleihan *et al.*, 1993; Korthäuer *et al.*, 1994; Wiley and Harmsen, 1995; Cosyns *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 1999). Récemment, il a été démontré, à partir de cellules isolées de patients ayant le syndrome hyper IgM, que l'absence de CD154 n'empêche pas le développement et la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs Th1 ou Th2 et que la réponse des monocytes au LPS ou à une stimulation via le CD40 n'est pas affectée (Uronen and Callard, 2000). Ainsi, la susceptibilité des patients CD154⁻ aux pathogènes mentionnés ci-haut est principalement la conséquence d'une absence de stimulation du CD40 (Uronen and Callard, 2000). D'après nos résultats, LAG-3 semble jouer un rôle non pas dans les interactions où il y a engagement du TCR par des peptides pathogéniques puisque la molécule CD154 y est exprimée à de très hauts niveaux, mais plutôt dans les interactions où le TCR n'est pas engagé telles qu'observées dans les réactions inflammatoires. En effet, dans ces dernières, un grand nombre de lymphocytes T, dont le TCR n'est pas spécifique de l'antigène ayant causé initialement le désordre, infiltrent les lésions inflammatoires et ont une fonction pro-inflammatoire (Bell *et al.*, 1993; Nahill and Welsh, 1993; Brocke *et al.*, 1996; McInnes *et al.*, 1997; Modlin *et al.*,

1998; Morita *et al.*, 1998). Il serait donc très intéressant d'analyser l'activité de LAG-3 dans ces interactions à partir de cellules isolées de patients CD154.

In vivo, LAG-3 a été détecté dans les organes lymphoïdes secondaires inflammés, plus particulièrement au niveau des ganglions lymphatiques et des amygdales (Huard *et al.*, 1994a), et dans certaines sous-populations de TIL infiltrant le carcinome du rein (Angevin *et al.*, 1997). Dans cette dernière étude, un des patients démontrait des TIL composés de façon prédominante de TCR α/β ⁺CD8⁺DR⁺LAG-3⁺. D'ailleurs, un article récent montre que LAG-3 est co-distribué avec les molécules CD8 et CD3-TCR lorsque ces dernières sont engagées avec des anticorps monoclonaux ou avec un complexe CMH de classe I-peptide (Hannier and Triebel, 2000). Aussi, ces mêmes auteurs démontrent que LAG-3 s'associe à la surface du lymphocyte T activé avec le CMH de classe II. Dans nos expériences, LAG-3 peut induire directement la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques (voir Article 2; figure 7). Ces cellules ont fait l'objet d'intenses études dans l'immunité anti-tumorale. Une des approches utilisées est d'isoler les cellules dendritiques de patients cancéreux, de les expandre *in vitro* et de les charger avec l'antigène tumoral avant de les réinfuser aux malades (Schuler and Steinman, 1997). De cette manière, les cellules dendritiques servent d'adjuvants pour stimuler une réponse immunitaire, de type cytotoxique entre autres, contre la tumeur. Dernièrement, il a été démontré que la co-injection de LAG-3 soluble avec des cellules tumorales ou encore l'immunisation avec des cellules tumorales transfectées avec LAG-3 réduit la croissance de la tumeur chez la souris (Prigent *et al.*, 1999). Ce rejet implique le recrutement de lymphocytes T CD8⁺. Il est donc suggéré que LAG-3 pourrait être utilisé comme adjuvant de par son habileté à activer les CPA résidentes, telles que les macrophages et les cellules dendritiques, via le CMH de classe II,

lesquelles par la suite initieraient le développement d'une réponse immunitaire cytotoxique anti-tumorale.

Rôle du CD47 dans la régulation de la production d'IL-12.

Les résultats de cette étude peuvent être divisés en deux parties. Dans un premier volet, nous avons démontré que l'engagement du CD47 par un anticorps monoclonal, par son ligand naturel, la thrombospondine (TSP), ou encore par le peptide 4N1K (peptide correspondant à la partie carboxy-terminale de la TSP qui lie sélectivement le CD47) inhibe de façon spécifique et sélective la production d'IL-12 par les monocytes humains (voir l'article 3 dans la section *Résultats*). Cette suppression est observée après une stimulation indépendante ou dépendante des lymphocytes T. Ma principale contribution à ce travail a été de montrer que l'inhibition de la synthèse d'IL-12 par les monocytes ne dépend absolument pas d'une augmentation de la sécrétion d'IL-10 ou de TGF- β endogènes, deux molécules physiologiques bien connues pour leur rôle suppresseur de la production d'IL-12, donc anti-inflammatoire.

Suite aux observations de cette première étude, nous avons entamé le deuxième volet de notre travail. Sachant que l'IL-12 joue un rôle non seulement dans l'activation des cellules du système immunitaire innée, mais aussi dans le développement de la réponse Th1, nous avons alors émis l'hypothèse que l'engagement du CD47 inhiberait la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1. Nous avons développé un modèle expérimental de différenciation des lymphocytes T naïfs à partir de cellules mononucléées isolées du sang de cordon ombilical (CBMC) selon le modèle de Rogge *et al.* (1997). Plus précisément, les CBMC ont été stimulés avec de la PHA dans des conditions dites neutres (milieu de culture seulement), Th1 (IL-12 + un Acm

anti-IL-4) ou Th2 (IL-4 + un Ac anti-IL-12) pour une durée de 3 jours. À la fin de cette culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées puis ajustées à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avant de les expandre dans un milieu de culture additionné d'IL-2 pour une période de 9 à 12 jours (phase d'expansion). Finalement, les cellules ont été restimulées à une concentration de 1.0×10^6 cellules/ml en culture secondaire à l'aide de différents stimuli pour 1 à 3 jours dépendant des cytokines devant être dosées. L'ajout de l'anticorps anti-CD47, de l'anticorps contrôle ou du peptide 4N1K a toujours eu lieu en culture primaire. Les observations majeures de mon travail se résument comme suit. L'engagement du CD47 inhibe la production d'IFN- γ et d'IL-2 par les CBMC en culture primaire dans les conditions Th1 alors que dans les conditions Th2, seule l'IL-2 est détectée et celle-ci n'est aucunement affectée par l'anticorps anti-CD47. Le profil des cytokines à la restimulation montre que la pré-activation des CBMC en présence d'IL-12 exogène et de l'anti-CD47 empêche le développement des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1 et ceci, sans aucune déviation immunitaire vers le phénotype Th2. Par contre, la différenciation des lymphocytes T naïfs en présence d'IL-4 exogène n'est pas touchée par la présence de l'anti-CD47 puisqu'il y a eu génération d'effecteurs de type Th2. Ainsi, le CD47 est une molécule immunorégulatrice capable non seulement d'inhiber la sécrétion d'IL-12 par les monocytes et tout récemment par les cellules dendritiques (Demeure *et al.*, 2000), mais aussi d'empêcher de façon sélective la réponse des lymphocytes T naïfs à l'IL-12 exogène et leur différenciation subséquente en effecteurs de type Th1. En plus d'observer que le traitement des CBMC avec un anticorps anti-CD47 dans les conditions dites Th1 résulte en une diminution de la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2 en culture primaire, nous avons constaté que l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 est supprimée au jour 3. Étant donné qu'il a été rapporté dans la littérature que l'IL-2 induit l'expression de la chaîne $\beta 2$ du récepteur à l'IL-12 sur les lymphocytes T activés

(Gately *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2000), nous avons vérifié puis confirmé que l'ajout d'IL-2 en culture primaire contrecarre l'effet inhibiteur de l'anti-CD47 sur le récepteur à l'IL-12, la production d'IFN- γ et le développement Th1. Si applicable *in vivo*, les résultats obtenus dans les deux premiers volets de notre étude sur la régulation de la production d'IL-12 par la molécule CD47 permettent de penser que supprimer la sécrétion d'IL-12 et d'IL-2 ainsi que la réponse des lymphocytes T naïfs à l'IL-12 en ciblant le CD47 représente une nouvelle approche pour prévenir les maladies inflammatoires chroniques et/ou auto-immunitaires de type Th1.

Nous avons poursuivi notre étude sur la molécule CD47 à partir de certaines constatations faites lors des expériences se rapportant au rôle du CD47 dans la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1 (travail présentement soumis pour publication). Tel que mentionné précédemment, nous avons montré que l'engagement du CD47 inhibe la sécrétion d'IL-2 par les CBMC activés en présence d'IL-12, mais pas d'IL-4 en culture primaire. Lors de ce travail, nous avons également remarqué que les effecteurs de type Th1, pré-traités avec l'anticorps anti-CD47, sécrétaient non seulement des quantités réduites d'IFN- γ , mais démontraient aussi une diminution de leur réponse proliférative à la restimulation (résultats non-présentés). De plus, nous avons noté que les cellules pré-traitées avec l'anti-CD47 étaient affectées dans leur capacité à proliférer lors de la phase d'expansion en IL-2 (résultats non-présentés). Toutes ces observations nous ont amenés à penser qu'en plus d'empêcher la différenciation Th1, l'engagement du CD47 pourrait être impliqué dans l'induction d'un état d'anergie. Les résultats obtenus lors de la vérification expérimentale de cette hypothèse ont démontré qu'en absence de cytokines exogènes en culture primaire, la liaison du CD47 sur les CBMC promeut le développement de lymphocytes T anergiques. Les cellules naïves ont été traitées dans les conditions dites neutres, c'est-à-

dire qu'elles ont été activées avec de la PHA en présence ou en absence de l'anti-CD47 pour 3 jours. Cette culture primaire a été suivie d'une période d'expansion en IL-2 pour 9 à 12 jours et les lymphocytes T ont été ensuite restimulés avec des Acm dirigés contre les molécules CD3 et CD28. Les lymphocytes T effecteurs générés sous ces conditions sont considérés anergiques puisqu'ils sécrètent des niveaux diminués d'IL-2 (Annexe 2; Fig.1) et qu'ils sont affectés dans leur capacité 1) à proliférer (Annexe 2; Fig.2), 2) à sécréter des cytokines de type Th1 et Th2 (Annexe 2; Table I) et 3) à répondre à l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-12 exogène (Annexe 2; Fig.3). De plus, l'engagement du CD47 supprime fortement la production d'IL-2 et l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 soit le CD25 en culture primaire (Annexe 2; Fig.4 et 5) et la réponse des lymphocytes T à l'IL-2 lors de la phase d'expansion (Annexe 2; Table II). Cette induction d'anergie par la molécule CD47 est indépendante de l'IL-10 endogène (Annexe 2; Fig.6) et l'inclusion d'IL-2 ou d'IL-4, mais pas d'IL-7, exogène en culture primaire permet de complètement restorer l'activation des lymphocytes T (Annexe 2; Fig.7). Une co-stimulation par le CD28 via un Acm agoniste en culture primaire prévient l'établissement de cet état anergique par l'anti-CD47 (Annexe 2; Fig.8).

L'addition d'IL-2 exogène dans la culture primaire restaure le développement Th1 induit par l'IL-12 et prévient l'établissement d'un état anergique autant dans les conditions Th1 (observations personnelles) que neutres. Ainsi, l'aptitude du CD47 à inhiber la différenciation Th1 et en même temps, à induire l'anergie des cellules T naïves et ce, sans aucune déviation immunitaire vers le phénotype Th2 semble être unique. Les procédures *in vivo* et *in vitro* qui suppriment le développement Th1 ne sont pas connues pour induire l'anergie. À l'inverse, l'induction d'un état anergique ne prévient habituellement pas la polarisation du phénotype Th1 ou Th2 des lymphocytes T naïfs (Malvey *et al.*, 1998a). Le traitement de souris avec un antigène soluble en absence

d'adjuvant génère des lymphocytes T spécifiques de l'antigène qui sont incapables de proliférer en réponse à une immunisation optimale subséquente en présence d'adjuvant (Van Parijs *et al.*, 1997). Dans ce cas, l'induction de la tolérance est associée avec une inhibition sélective du développement Th1. Par contre, l'administration d'IL-12 durant l'induction de la tolérance (Van Parijs *et al.*, 1997) ou l'immunisation de souris tolérantes avec un antigène et l'adjuvant complet de Freund (Malvey *et al.*, 1998a) ne corrige pas l'anergie, mais permet l'acquisition du phénotype Th1.

Dans d'autres types d'expériences similaires, l'anergie a été associée à une déviation de la réponse immunitaire, c'est-à-dire que la suppression du développement Th1 est concomitante à l'augmentation de la production de cytokines de type Th2 (Burstein *et al.*, 1992; DeWit *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que les lymphocytes T anergiques générés dans ces expériences *in vivo* restent capables de servir des fonctions effectrices de type Th1 ou Th2 (Malvey *et al.*, 1998a; Malvey *et al.*, 1998b). Nous suggérons que les cellules traitées à l'anti-CD47 ne possèdent pas d'activité effectrice de par 1) une suppression diffuse de la production de cytokines de type Th1 ou Th2 et 2) l'altération dans l'expression de la molécule CD154 (résultats non-présentés).

Les cellules traitées à l'anti-CD47 partagent plusieurs caractéristiques avec les lymphocytes T anergiques décrits récemment et qui ont été obtenus suite à une stimulation *in vitro* chronique via le TCR en présence d'IL-10. (Groux *et al.*, 1996; Groux *et al.*, 1997). Les deux types de cellules sont anergiques tel que défini par une diminution de la prolifération et de la production d'IL-2 suivant une stimulation anti-CD3 seulement ou anti-CD3 plus anti-CD28. De plus, de façon similaire aux cellules traitées à l'anti-CD47, les cellules T rendues anergiques par l'IL-10 ne répondent pas à

l'IL-2 exogène et ne sont pas capables d'augmenter l'expression du CD25 à la restimulation. Plusieurs observations nous permettent d'argumenter contre l'implication de l'IL-10 dans l'induction de l'anergie chez les lymphocytes T naïfs traités à l'anti-CD47. Tout d'abord, l'engagement du CD47 n'augmente pas la sécrétion d'IL-10 dans les cultures primaires (Annexe 2; Fig.6A). Ensuite, la production d'IL-10 par les lymphocytes T pré-traités à l'anti-CD47 est supprimée à la restimulation (Annexe 2; Table I). Aussi, l'inclusion d'un anticorps anti-IL-10 dans les cultures primaires n'a aucun effet sur le développement et la maturation des cellules traitées à l'anti-CD47 (Annexe 2; Fig.6B). Récemment, les cellules traitées à l'IL-10 ont été montrées comme ayant *in vivo* et *in vitro* une activité immunorégulatrice qui est largement due à la production élevée d'IL-10 et normale de TGF- β (Groux *et al.*, 1997). Tel qu'indiqué dans la Table I (Annexe 2), la sécrétion de ces deux cytokines immunosuppressives est réduite chez les cellules T traitées à l'anti-CD47.

L'induction d'anergie dans des clones de lymphocytes T humains alloréactifs, par l'engagement du TCR en absence de co-stimulation, est inhibée lorsqu'il y a liaison de la chaîne γ du récepteur à l'IL-2 avec un anticorps agoniste ou avec d'autres cytokines utilisant cette chaîne pour médier leurs effets telles que l'IL-4 et l'IL-7 (Boussiotis *et al.*, 1994a). Nos résultats suggèrent fortement que l'engagement du CD47 dans les cultures primaires diminue les signaux donnés au récepteur à l'IL-2 puisqu'il y a inhibition de 1) la production d'IL-2 telle qu'observée aux niveaux protéiques et de l'ARN messager, 2) la réponse des cellules T naïves à l'IL-2 et 3) l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 soit le CD25. L'ajout d'IL-2 ou d'IL-4 exogène dans les cultures primaires restaure la production d'IL-2 et l'expression du CD25 et prévient l'induction d'anergie. Par contre, l'addition d'IL-7 exogène n'empêche pas l'induction d'un état anergique. Ces résultats ne supportent pas un rôle

critique de la chaîne γ dans l'établissement de l'anergie par la molécule CD47. La disponibilité d'un anticorps agoniste dirigé contre cette chaîne au moment d'effectuer nos expériences aurait permis de confirmer cette hypothèse.

L'état de tolérance induit dans les souris déficientes pour la molécule CD28 s'est établi en favorisant les interactions B7/CTLA-4. Plusieurs études ont indiqué que l'homologue du CD28, le CTLA-4, est un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T. Les souris déficientes pour le CTLA-4 développent des maladies lymphoprolifératives (Perez *et al.*, 1997; Blair *et al.*, 1998; Brunner *et al.*, 1999). En bloquant l'engagement du CTLA-4 *in vivo*, il a été démontré que la réponse immunitaire est augmentée avec pour conséquence une exacerbation des maladies auto-immunes et une élévation des rejets d'allogreffes (Brunner *et al.*, 1999). Des publications récentes ont démontré que l'effet inhibiteur du CTLA-4 est médié par sa queue cytoplasmique ou par l'habileté de son domaine extracellulaire à compétitionner pour les ligands (Masteller *et al.*, 2000). Nos observations personnelles indiquent que l'anti-CD47 n'augmente pas, mais plutôt diminue l'expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Ainsi, les différentes voies de signalisation médiées par les molécules TCR, CD28 et CTLA-4 sont complexes et l'intégration de ces signaux vont dicter le devenir du lymphocyte T (Bluestone, 1997; Anderson *et al.*, 2000). Le CD47 et son nouveau ligand récemment découvert soit SIRP, sélectivement exprimé sur les CPA, pourrait interférer avec ce complexe en modulant les interactions B7/ligands du B7 (Seiffert *et al.*, 1999). Une autre possibilité serait que l'association CD47/SIRP α induit l'anergie en délivrant directement un signal aux lymphocytes T et aux CPA. Une étude récente démontre que la thrombospondine inhibe l'activation des lymphocytes T, en supprimant la sécrétion d'IL-2 et l'expression du marqueur d'activation CD69, lorsqu'elle interagit avec le CD47 exprimé à la surface de ces lymphocytes T (Li *et al.*, 2001b).

En conclusion de notre étude sur la molécule CD47, nous avons montré que l'engagement du CD47 inhibe le développement des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1 et induit un état d'anergie et ce, même en présence d'IL-12. Ces deux résultantes, combinées avec l'effet inhibiteur du CD47 sur la production d'IL-12, nous permet d'envisager la molécule CD47 comme une cible potentielle dans des approches thérapeutiques pour les maladies auto-immunes, les réactions du greffon contre l'hôte et les transplantations d'organes.

À partir de nos résultats expérimentaux, nous avons élaboré un schéma de synthèse simplifié représentant la régulation de la production d'IL-12 par les molécules IL-15, LAG-3 et CD47 (Fig.1, p.93).

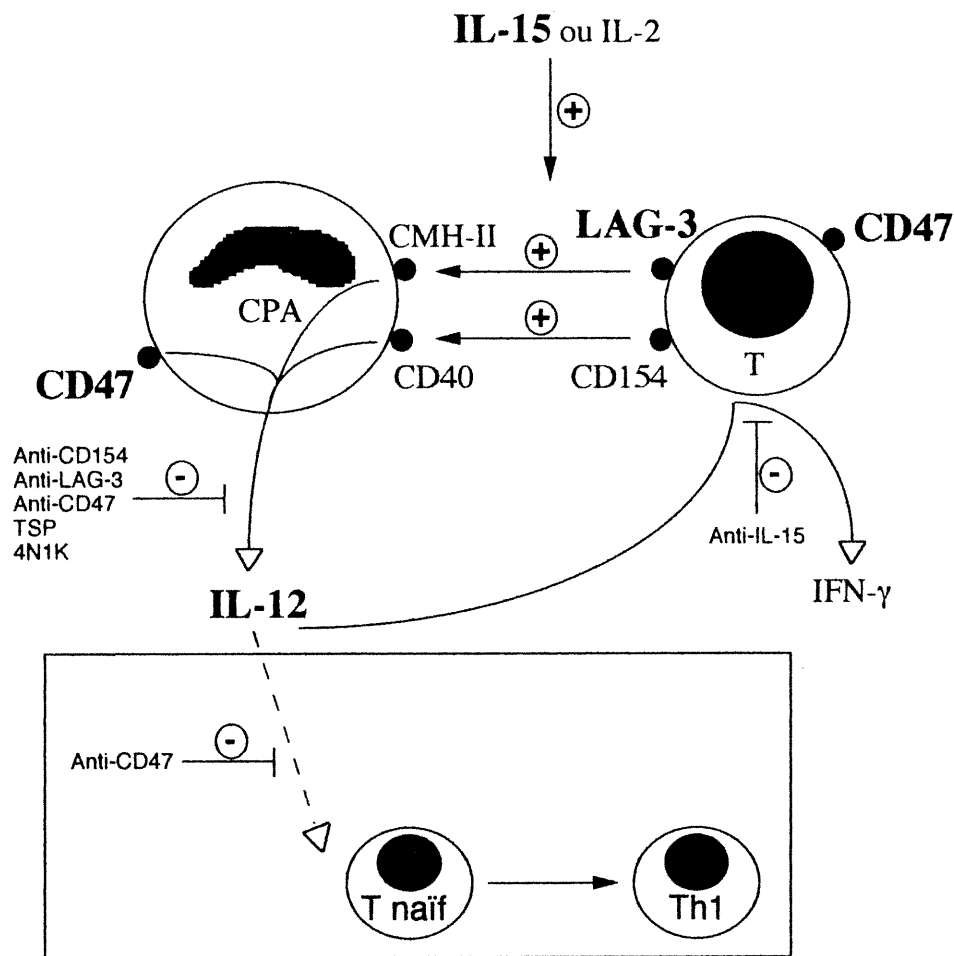


Figure 1

Régulation de la production d'IL-12 par l'IL-15, le LAG-3 et le CD47

Ce schéma montre un modèle d'inflammation impliquant des interactions lymphocytes T - CPA, en absence d'engagement du TCR, qui surviennent dans les tissus périphériques. L'IL-15, une cytokine qui possède plusieurs activités biologiques similaires à celles de l'IL-2, induit la sécrétion d'IL-12 par les CPA en utilisant les mêmes mécanismes que l'IL-2, c'est-à-dire de façon dépendante de l'interaction CD154-CD40. Le LAG-3 est aussi un régulateur positif de la synthèse d'IL-12 par les CPA lorsqu'il interagit avec son ligand, le CMH de classe II. Enfin, l'engagement de la molécule CD47 inhibe la production d'IL-12 par les CPA. L'encadré indique qu'en présence d'IL-12, la liaison du CD47 s'oppose à la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs de type Th1 dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'IL-12 est une cytokine qui possède plusieurs activités biologiques très importantes, lesquelles jouent un rôle crucial dans l'immunité innée et acquise. En effet, l'IL-12 est essentielle dans la résistance de l'organisme à diverses infections microbiennes de par ses fonctions pro-inflammatoires et de par son habileté à promouvoir le développement d'une réponse Th1. Par contre, la régulation de la production d'IL-12 doit être étroitement contrôlée, car un excès ou une déficience en cette interleukine est néfaste pour l'organisme.

Ma contribution scientifique a été tout d'abord de compléter des connaissances sur les mécanismes qui régulent positivement la synthèse d'IL-12 par les cellules présentatrices de l'antigène chez l'homme. Nous avons montré que les molécules IL-15 et LAG-3 induisent la sécrétion d'IL-12 par les monocytes et/ou les cellules dendritiques. Connaître les différents facteurs qui participent de façon positive à la production d'IL-12 est primordial, car il a été démontré autant chez l'homme que chez la souris, qu'un déficit en IL-12 entraîne des infections aux mycobactéries et à la salmonelle. L'efficacité thérapeutique de l'IL-12 a d'ailleurs été prouvée non seulement dans plusieurs modèles expérimentaux d'infections avec des pathogènes intracellulaires, mais aussi contre un certain nombre de tumeurs murines et humaines.

À l'heure actuelle, de plus en plus d'études visent à comprendre les mécanismes qui suppriment la synthèse d'IL-12. Une surproduction d'IL-12 en réponse à une infection aigüe peut avoir, par exemple, des effets significatifs sur la pathologie associée au syndrome du choc septique. Une libération continuelle d'IL-12 peut

aussi initier et/ou aggraver l'immunopathologie liée aux infections chroniques, à la transplantation et aux maladies auto-immunitaires/inflammatoires de type Th1 spécifiques d'organes telles que la sclérose en plaques et la maladie de Crohn. Ainsi, le complexe IL-12/IL-12R est une cible idéale dans les interventions thérapeutiques visant à contrer un excès d'IL-12. Mon travail de doctorat a donc également permis d'innover en démontrant que le CD47 représente une nouvelle molécule, non explorée à ce jour, pour inhiber non seulement la production d'IL-12, mais aussi la réponse des cellules à cette cytokine chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

Agostini, C., Trentin, L., Facco, M., Sancetta, R., Cerutti, A., Tassinari, L., Cimarosto, L., Adami, F., Cipriani, A., Zambello, R., and Semenzato, G. 1996. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* **157**: 910-918.

Ahn, H-J., Tomura, M., Yu, W-G., Iwasaki, M., Park, W-R., Hamaoka, T., and Fujiwara, H. 1998. Requirement for distinct Janus kinases and STAT proteins in T cell proliferation versus IFN- γ production following IL-12 stimulation. *J. Immunol.* **161**: 5893-5900.

Alderson, M.R., Armitage, R.J., Tough, T.W., Strockbine, L., Fanslow, W.C., and Spriggs, M.K. 1993. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* **178**: 669-674.

Allen, R., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkis, N.A., Copeland, N.G., Bedel, M.A., Edelhoff, S., Disteché, C.M., Simoneaux, D.K., Danslow, W.C., Belmont, J., and Spriggs, M.K. 1993. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper IgM syndrome. *Science* **259**: 990-993.

Altare, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J.F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Bernaudin, F., Jeppsson, O., Gollob, J.A., Meinel, E., Segal, A.W., Fisher, A.W., Kumararatne, D., and Casanova, J.L. 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280**: 1432-1435.

Altare, F., Lammas, D., Revy, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Lamhamedi, S., Drysdale, P., Scheel-Toellner, D., Girdlestone, J., Darbyshire, P., Wadhwa, M., Dockrell, H., Salmon, M., Fischer, A., Durandy, A., Casanova, J.L., and Kumararatne, D.S. 1998. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guérin and *Salmonella enteridis* disseminated infection. *J. Clin. Invest.* **102**: 2035-2040.

Anderson, D.E., Bieganowska, K.D., Bar-Or, A., Oliveira, E.M.L., Carreno, B., Collins, M., and Hafler, D.A. 2000. Paradoxical inhibition of T-cell function in response to CTLA-4 blockade; heterogeneity within the human T-cell population. *Nat. Med.* **6**: 211-214.

Anderson, D.M., Johnson, L., Glaccum, M.B., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Valentine, V., Kirstein, M.N., Shapiro, D.N., Morris, S.W., Grabstein, K., and Cosman, D. 1995a. Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. *Genomics* **25**: 701-706.

Anderson, D.M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Valentine, V., Shapiro, D.N., Morris, S.W., Park, L.S., and Cosman, D. 1995b. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor α chain and close linkage of *IL15RA* and *IL2RA* genes. *J. Biol. Chem.* **270**: 29862-29869.

Angevin, E., Kremer, F., Gaudin, C., Hercend, T., and Triebel, F. 1997. Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *Int. J. Cancer* **72**: 431-440.

Annunziato, F., Manetti, R., Cosmi, L., Galli, G., Heusser, C.H., Romagnani, S., and Maggi, E. 1997. Opposite role for interleukin-4 and interferon-gamma on CD30 and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) expression by activated naive T cells. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2239-2244.

Annunziato, F., Manetti, R., Tomasevic, L., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Gianno, V., Germano, P., Mavilia, C., Maggi, E., and Romagnani, S. 1996. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4(+) T cells are associated with IFN-gamma production. *Faseb J.* **10**: 769-776.

Arase, H., Arase, N., Nakagawa, K., Good, R.A., and Onoé, K. 1993. NK1.1⁺CD4⁺CD8⁻ thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J. Immunol.* **23**: 307-310.

Arase, H., Arase, N., and Saito, T. 1996. Interferon γ production by natural killer (NK) cells and NK1.1⁺ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J. Exp. Med.* **183**: 2391-2396.

Armant, M., Armitage, R., Boiani, N., Delespesse, G., and Sarfati, M. 1996. Functional CD40 ligand expression on T lymphocytes in the absence of T cell receptor engagement: involvement in interleukin-2-induced interleukin-12 and interferon- γ production. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1430-1434.

Armant, M., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. 1995. Soluble CD23 directly activates monocytes to contribute to the antigen-independent stimulation of resting T cells. *J. Immunol.* **155**: 4868-4875.

Armitage, R.J., MacDuff, B.M., Eisenman, J., Paxton, R., and Grabstein, K.H. 1995. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. Immunol.* **154**: 483-490.

Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, B., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L.S., Stenkamp, R., Neubauer, M., Roberts, R.L., Noelle, E.J., Ledbetter, J.A., Francke, U., and Ochs, H.D. 1993. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated hyper IgM syndrome. *Cell* **72**: 291-300.

Aste-Amezaga, M., D'Andrea, A., Kubin, M., and Trinchieri, G. 1994. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell. Immunol.* **156**: 480-492.

Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A., and Trinchieri, G. 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J. Immunol.* **160**: 5936-5944.

Atedzoe, B.N., Ahmad, A., and Menezes, J. 1997. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J. Immunol.* **159**: 4966-4972.

Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Lohning, M., Brauer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., and Hamann, A. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* **385**: 81-83.

Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O'Shea, J.J., and Johnston, J.A. 1995a. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J. Exp. Med.* **181**: 399-404.

Bacon, C.M., Petricoin III, E.F., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., Lerner, A.C., Johnston, J.A., and O'Shea, J.J. 1995b. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 7307-7311.

Baixeras, E., Huard, B., Miossec, C., Jitsukawa, S., Martin, M., Hercend, T., Auffrey, C., Triebel, F., and Piatier, T.D. 1992. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein: a new ligand for human leucocyte antigen class II antigens. *J. Exp. Med.* **176**: 327-337.

Bamford, R.N., Battiata, A.P., Burton, J.D., Sharma, H., and Waldmann, T.A. 1996. IL-15/IL-T production by the adult T-cell leukemia HuT-102 is associated with an HTLV-1-R/IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuate IL-15 mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 2897-2902.

Bamford, R.N., Grant, A.J., Burton, J.D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T.A. 1994. The interleukin (IL-2) receptor β -chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 4940-4944.

Baron, P., Constantin, G., D'Andrea, A., Ponzin, D., Scarpini, E., Scarlato, G., Trinchieri, G., Rossi, F., and Cassatella, M.A. 1993. Production of tumor necrosis factor and other proinflammatory cytokines by human mononuclear phagocytes stimulated with myelin P2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 4414-4418.

Bell, R.B., Lindsey, J.W., Sobel, R.A., Hodgkinson, S., and Steinman, L. 1993. Diverse T cell receptor V β gene usage in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **150**: 4085-4092.

Bellone, G., and Trinchieri, G. 1994. Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/IL-12 on human hematopoiesis. *J. Immunol.* **153**: 930-937.

Ben-Baruch, A., Michiel, D.F., and Oppenheim, J.J. 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 11703-11706.

Berger, S., Chandra, R., Balló, H., Hildenbrand, R., and Stutte, H.J. 1997. Immune complexes are potent inhibitors of interleukin-12 secretion by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2994-3000.

Blair, P.J., Riley, J.L., Levine, B.L., Lee, K.P., Craighead, N., Francomano, T., Perfetto, S.J., Gray, G.S., Carreno, B.M., and June, C.H. 1998. Cutting edge: CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X₁ induction. *J. Immunol.* **160**: 12-15.

Blauvelt, A., Asada, H., Klaus-Kovtun, V., Altman, D.J., Lucey, D.R., and Katz, S.I. 1996. Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes, Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J. Invest. Dermatol.* **106**: 1047-1052.

Bliss, J., Van Cleave, V., Murray, K., Wiencis, A., Ketchum, M., Maylor, R., Haire, T., Resmini, C., Abbas, A.K., and Wolf, S.F. 1996. IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response. *J. Immunol.* **156**: 887-894.

Blotta, M.H., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 1997. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4⁺ lymphocytes. *J. Immunol.* **158**: 5589-5595.

Bluestone, J.A. 1997. Is CTLA-4 a master switch for peripheral tolerance? *J. Immunol.* **158**: 1989-1993.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of Th1 and Th2 cells. *J. Exp. Med.* **187**: 129-134.

Bornstein, P. 1992. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J.* **6**: 3290-3299.

Boussiotis, V.A., Barber, D.L., Nakarai, T., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Bernstein, G.M., D'Andrea, A.D., Ritz, J., and Nadler, L.M. 1994a. Prevention of T cell anergy by signaling through the γ_c of the IL-2 receptor. *Science* **266**: 1039-1042.

Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Griffin, J.D., Gray, G.S., Gribben, J.G., and Nadler, L.M. 1994b. CD2 is involved in maintenance and reversal of human alloantigen-specific clonal anergy. *J. Exp. Med.* **180**: 1665-1673.

Braun, M.C., Lahey, E., and Kelsall, B.L. 2000. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J. Immunol.* **164**: 3009-3017.

Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J., and Modlin, R.L. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**: 732-736.

Brocke, S., Gijbels, K., Allegretta, M., Ferber, I., Piercy, C., Blankenstein, T., Martin, R., Utz, U., Karin, N., Mitchell, D., Veromaa, T., Waisman, A., Gaur, A., Conlon, P., Ling, N., Fairchild, P.J., Wraith, D.C., O'Garra, A., Garrison Fathman, C., and Steinman, L. 1996. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* **379**: 343-346.

Brown, E., Hooper, L., Ho, T., and Gresham, H. 1990. Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J. Cell Biol.* **111**: 2785-2794.

Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F., and Gately, M.K. 1993. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J. Exp. Med.* **178**: 1223-1230.

Bruniquel, D., Borie, N., Hannier, S., and Triebel, F. 1998. Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics* **48**: 116-124.

Brunner, M.C., Chambers, C.A., Chan, F.K.M., Hanke, J., Winoto, A., and Allison, J.P. 1999. CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* **162**: 5813-5820.

Buchanan, J.M., Vogel, L.A., Van Cleave, V.H., Metzger, D.W. 1995. Interleukin 12 alters the isotype-restricted antibody response of mice to hen eggwhite lysozyme. *Int. Immunol.* **7**: 1519-1528.

Bucht, A., Larsson, P., Weisbrot, L., Thorne, C., Pisa, P., Smedegard, G., Keystone, E.C., and Gronberg, A. 1996. Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* **103**: 357-367.

Burstein, H.J., Shea, C.M., and Abbas, A.K. 1992. Aqueous antigens induce *in vivo* tolerance selectively in IL-2- and IFN- γ -producing (Th1) cells. *J. Immunol.* **148**: 3687-3691.

Burton, J.D., Bamford, R.N., Peters, C., Grant, A.J., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T.A. 1994. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 4935-4939.

Bussolati, B., Mariano, F., Biancone, L., Foa, R., David, S., Cambi, V., and Camussi, G. 1999. Interleukin-12 is synthesized by mesangial cells and stimulates platelet-activating factor synthesis, cytoskeletal reorganization, and cell shape change. *Am. J. Pathol.* **154**: 623-632.

Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H., and Caligiuri, M.A. 1997. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.* **99**: 937-943.

Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenman, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. 1994. Interleukin (IL)-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* **180**: 1395-1403.

Carson, W.E., Ross, M.E., Baiocchi, R.A., Marien, M.J., Boiani, N., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. 1995. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- γ by natural killer cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **96**: 2578-2582.

Cassatella, M.A., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X., and Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1-5.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., vanKooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* **180**: 1263-1272.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**: 747-752.

Chae, D.W., Nosaka, Y., Strom, T.B., and Malinski, W. 1996. Distribution of IL-15 receptor alpha-chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *J. Immunol.* **157**: 2813-2819.

Chambers, C.A., and Allison, J.P. 1999. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 203-210.

Chan, S.H., Kobayashi, M., Santoli, D., Perussia, B., and Trinchieri, G. 1992. Mechanisms of IFN- γ induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12): role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.* **148**: 92-98.

Chan, S.H., Perussia, B., Gupta, J.W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H.A., Wolf, S.F., Young, D., Clark, S.C., and Trinchieri, G. 1991. Induction of interferon γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* **173**: 869-879.

Chang, J.T., Segal, B.M., and Shevach, E.M. 2000. Role of costimulation in the induction of the IL-12/IL-12 receptor pathway and the development of autoimmunity. *J. Immunol.* **164**: 100-106.

Chizzonite, R., Truitt, T., Desai, B.B., Nunes, P., Podlaski, F.J., Stern, A.S., and Gately, M.K. 1992. IL-12 receptor: I. Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts. *J. Immunol.* **148**: 3117-3124.

Chouaib, S., Chehimi, J., Bani, L., Genetet, N., Tursz, T., Gay, F., Trinchieri, G., and Mami-Chouaib, F. 1994. Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific cytotoxic effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 12659-12663.

Chua, A.O., Chizzonite, R., Desai, B.B., Truitt, T.P., Nunes, P., Minetti, L.J., Warriar, R.R., Presky, D.H., Levine, J.F., Gately, M.K., and Gubler, U. 1994. Expression cloning of a human IL-12 receptor component: a new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J. Immunol.* **153**: 128-136.

Chung, J., Gao, A.G., and Frazier, W.A. 1997. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin α IIb β 3. *J. Biol. Chem.* **272**: 14740-14746.

Chung, J., Wang, X.Q., Lindberg, F.P., and Frazier, W.A. 1999. Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in α 2 β 1-mediated platelet activation. *Blood* **94**: 642-648.

Cleveland, M.G., Gorham, J.D., Murphy, T.L., Tuomanen, E., and Murphy, K.M. 1996. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect. Immun.* **64**: 1906-1912.

Colantonio, L., Iellem, A., Clissi, B., Pardi, R., Rogge, L., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. 1999. Upregulation of integrin α 6 β 1 and chemokine receptor CCR1 by interleukin-12 promotes the migration of human type 1 helper T cells. *Blood* **94**: 2981-2989.

Collison, K., Saleh, S., Parhar, R., Meyer, B., Kwaasi, A., Al-Hussein, K., Al-Sedairy, S., and Al-Mohanna, F. 1998. Evidence for IL-12-activated Ca^{2+} and tyrosine signaling pathways in human neutrophils. *J. Immunol.* **161**: 3737-3745.

Cooper, A.M., Magram, J., Ferrante, J., and Orme, I.M. 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* **186**: 39-45.

Cooper, A.M., Roberts, A.D., Rhoades, E.R., Callahan, J.E., Getzy, D.M., and Orme, I.M. 1995. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* **84**: 423-432.

Cosyns, M., Tsirkin, S., Jones, M., Flavell, R., Kikutani, H., and Hayward, A.R. 1998. Requirement of CD40-CD40 ligand interaction for elimination of *Cryptosporidium parvum* from mice. *Infect. Immun.* **66**: 603-607.

Cousens, L.P., Orange, J.S., Su, H.C., and Biron, C.A. 1997. Interferon- α/β inhibition of interleukin 12 and interferon- γ production in vitro and endogenously during viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 634-639.

Cunningham, C.K., Bonville, C.A., Ochs, H.D., Seyama, K., John, P.A., Rotbart, H.A., and Weiner, L.B. 1999. Enteroviral meningoencephalitis as a complication of X-linked hyper IgM syndrome. *J. Pediatrics* **134**: 584-588.

Daftarian, P.M., Kumar, A., Kryworuchko, M., and Diaz-Mitoma, F. 1996. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **157**: 12-20.

D'Ambrosio, D., Cipitelli, M., Cocciolo, M.G., Mazzeo, D., DiLucia, P., Lang, R., Sinigaglia, F., and Panina-Bordignon, P. 1998. Inhibition of IL-12 production by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃: involvement of NF- κ B downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J. Clin. Invest.* **101**: 252-262.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G., 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* **178**: 1041-1048.

D'Andrea, A., Ma, X., Aste-Amezaga, M., Paganin, C., and Trinchieri, G. 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor α production. *J. Exp. Med.* **181**: 537-546.

D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., Chizzonite, R., Wolf, S.F., and Trinchieri, G. 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* **176**: 1387-1398.

de Jong, R., Altare, F., Haagen, I.A., Elferink, D.G., Boer, T., van Breda Vriesman, P.J., Kabel, P.J., Draaisna, J.M., van Dissel, J.T., Kroon, F.P., Casanova, J.L., and Ottenhoff, T.H. 1998. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* **280**: 1435-1438.

DeKruyff, R.H., Fang, Y., and Umetsu, D.T. 1998. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4⁺ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J. Immunol.* **160**: 2231-2237.

DeKruyff, R.H., Gieni, R.S., and Umetsu, D.T. 1997. Antigen-driven but not lipopolysaccharide-driven IL-12 production in macrophages requires triggering of CD40. *J. Immunol.* **158**: 359-366.

Delgado, M., Munoz-Elias, E.J., Gomariz, R.P., and Ganea, D. 1999. VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFN γ synthesis by T cells. *J. Neuroimmunol.* **96**: 167-181.

Demeure, C.E., Tanaka, H., Mateo, V., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. 2000. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* **164**: 2193-2199.

Desai, B.B., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Mongini, P.K.A., Chizzonite, R., and Gately, M.K. 1992. IL-12 receptor: II. Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.* **148**: 3125-3132.

DeWit, D., Van Mechelen, M., Ryelandt, M., Figueiredo, A.C., Abramowicz, D., Goldman, H., Bazin, H., Urbain, J., and Oberdan, L. 1992. The injection of deaggregated gamma globulins in adult mice induces antigen-specific unresponsiveness of T helper type 1 but not type 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* **175**: 9-14.

DiPietro, L.A., and Polverini, P.J. 1993. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *Am. J. Pathol.* **143**: 678-684.

DiSanto, J.P., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., Fisher, A., and de Saint Basile, G. 1993. CD40 ligand mutations in the X-linked form of hyper IgM syndrome. *Nature* **361**: 541-543.

Doyle, C., and Strominger, J.L. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330**: 256-259.

Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raher, S., Bernard, J., Boisteau, O., Leroy, S., Minvielle, S., Godard, A., and Jacques, Y. 1999. Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J. Biol. Chem.* **274**: 26978-26984.

Elenkov, I.J., Papanicolau, D.A., Wilder, R.L., and Chrousos, G.P. 1996. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **108**: 1-8.

Elenkov, I.J., Webster, E., Papanicolaou, D.A., Fleisher, T.A., Chrousos, G.P., and Wilder, R.L. 1998. Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J. Immunol.* **161**: 2586-2593.

Emoto, M., Emoto, Y., Buchwalow, I.B., and Kaufmann, S.H. 1999. Induction of IFN- γ -producing CD4⁺ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin. *Eur. J. Immunol.* **29**: 650-659.

Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F. Jr., Beckman, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R., and Paul, W.E. 1990. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.* **8**: 303-333.

Finkelman, F.D., Madden, K.B., Cheever, A.W., Katona, I.M., Morris, S.C., Gately, M.K., Hubbard, B.R., Gause, W.C., and Urban, J.F. Jr. 1994. Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J. Exp. Med.* **179**: 1563-1572.

Firestein, G.S., Xu, W.D., Townsend, K., Broide, D., Alvaro-Gracia, J., Glasebrook, A., and Zvaifler, N.J. 1988. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. Failure to detect T cell lymphokines (IL-2 and IL-3) and presence of macrophage colony stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J. Exp. Med.* **168**: 1573-1586.

Flamand, L., Stefanescu, I., and Menezes, J. 1996. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J. Clin. Invest.* **97**: 1373-1381.

Flesch, I.E.A., Hess, J.H., Huang, S., Aguet, M., Rothe, J., Bluethmann, H., and Kaufmann, S.H.E. 1995. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon γ and tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* **181**: 1615-1621.

Franchimont, D., Galon, J., Gadina, M., Visconti, R., Zhou, Y., Aringer, M., Frucht, D.M., Chrousos, G.P., and O'Shea, J.J. 2000. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J. Immunol.* **164**: 1768-1774.

Frauwirth, K.A., Alegre, M.L., and Thompson, C.B. 2000. Induction of T cell anergy in the absence of CTLA-4/B7 interaction. *J. Immunol.* **164**: 2987-2993.

Frazier, W.A., Gao, A.G., Dimitry, J., Chung, J., Brown, E.J., Lindberg, F.P., and Linder, M.E. 1999. The thrombospondin receptor integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric G_i . *J. Biol. Chem.* **274**: 8554-8560.

Fuleihan, R., Ramesu, N., Loh, R., Jabara, H., Rosen, F.S., Chatila, T., Fu, S.M., Stamenkovic, I., and Geha, R. 1993. Defective expression of the CD40-ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 2170-2173.

Gaggero, A., Azzarone, B., Andrei, C., Mishal, Z., Meazza, R., Zappia, E., Rubartelli, A., and Ferrini, S. 1999. Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. *Eur. J. Immunol.* **29**: 1265-1274.

Gao, A.G., Lindberg, F.P., Dimitry, J.M., Brown, E.J., and Frazier, W.A. 1996a. Thrombospondin modulates $\alpha_v\beta_3$ function through integrin-associated protein. *J. Cell Biol.* **135**: 533-544.

Gao, A.G., Lindberg, F.P., Finn, M.B., Blystone, S.D., Brown, E.J., and Frazier, W.A. 1996b. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **271**: 21-24.

Gasser, S., Corthésy, P., Beerman, F., MacDonald, H.R., and Nabholz, M. 2000. Constitutive expression of a chimeric receptor that delivers IL-2/IL-15 signals allows antigen-independent proliferation of CD8⁺CD44^{high} but not other T cells. *J. Immunol.* **164**: 5659-5667.

Gately, M.K., Carvajal, D.M., Connaughton, S.E., Gillessen, S., Warriar, R.R., Kolinsky, K.D., Wilkinson, V.L., Dwier, C.M., Higgins Jr, G.F., Podlaski, F.J., Faherty, D.A., Familletti, P.C., Stern, A.S., and Presky, D.H. 1996. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer *in vitro* and *in vivo*. *Ann. New York Acad. Sci.* **795**: 1-12.

Gately, M.K., Desai, B.B., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., Podlaski, F.J., Familletti, P.C., Sinigaglia, F., Chizzonite, R., Gubler, U., and Stern, A.S. 1991. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* **147**: 874-882.

Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., and Presky, D.H. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic responses. *Ann. Rev. Immunol.* **16**: 495-521.

Gately, M.K., Warriar, R.R., Honasoge, S., Carvajal, D.M., Faherty, D.A., Connaughton, S.E., Anderson, T.D., Sarmiento, U., Hubbard, B.R., and Murphy, M. 1994. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma *in vivo*. *Int. Immunol.* **6**: 157-167.

Gately, M.K., Wilson, D.E., and Wong, H.L. 1986. Synergy between recombinant interleukin 2 (rIL 2) and IL 2-depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses *in vitro*. *J. Immunol.* **136**: 1274-1282.

Gately, M.K., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., and Chizzonite, R., 1992. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell. Immunol.* **143**: 127-142.

Gavett, S.H., O'Hearn, D.J., Li, X., Huang, S.K., Finkelman, S.D., and Wills-Karp, M. 1995. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med.* **182**: 1527-1536.

Gay, D., Maddon, P., Sekaly, R., Talle, M.A., Godfrey, M., Long, E., Goldstein, G., Chess, C., Axel, R., Kappler, J., and Marrack, P. 1987. Functional interaction between human T-cell protein CD4 and major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* **328**: 626-629.

Gazzinelli, R.T. 1996. Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases. *Mol. Med. Tod.* **June**: 258-267.

Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., and Sher, A. 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 6115-6119.

Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayasi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., and Sher, A. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **153**: 2533-2543.

Germann, T., Bongartz, M., Dlugonska, H., Hess, H., Schmitt, E., Kolbe, L., Kölsch, E., Podlaski, F.J., Gately, M.K., and Rüde, E. 1995a. IL-12 profoundly upregulates the synthesis of antigen-specific, complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **25**: 823-829.

Germann, T., Guckes, S., Bongartz, M., Duglonska, H., Schmitt, E., Kolbe, L., Kölsch, E., Podlaski, F.J., Gately, M.K., and Rüde, E. 1995b. Administration of interleukin-12 during ongoing immune responses fails to permanently suppress and can even enhance the synthesis of antigen-specific IgE. *Int. Immunol.* **7**: 1649-1657.

Germann, T., Rüde, E., and Schmitt, E. 1995c. The influence of IL-12 on the development of Th1 and Th2 cells and its adjuvant effect for humoral immune responses. *Res. Immunol.* **146**: 481-485.

Germann, T., Szeliga, J., Hess, H., Störkel, J., Podlaski, F.J., Gately, M.K., Schmitt, E., and Rüde, E. 1995d. Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 4823-4827.

Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F.J., Stremlo, D.L., Familletti, P.C., Gubler, U., Presky, D.H., Stern, A.S., and Gately, M.K. 1995. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur. J. Immunol.* **25**: 200-206.

Giri, J.G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L.S., Cosman, D., and Anderson, D. 1994. Utilization of the β - and γ -chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13**: 2822-2830.

Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis, A., Shanebeck, K., Dubose, R., Cosman, D., Park, L.S., and Anderson, D.M. 1995. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α -chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* **14**: 3654-3663.

Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D.R., and Turner, J.M. 1991. Requirement for association of p56^{lck} with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. *Cell* **64**: 511-520.

Golab, J., and Zagazdzon, R. 1999. Antitumor effects of interleukin-12 in pre-clinical and early clinical studies. *Int. J. Mol. Med.* **3**: 537-544.

Gorham, J.D., Guler, M.L., Fenoglio, D., Gubler, U., and Murphy, K.M. 1998. Low dose TGF- β attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells. *J. Immunol.* **161**: 1664-1670.

Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M.R., Watson, J.D., Anderson, D.M., and Giri, J.G. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β -chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264**: 965-968.

Green, J.M., Zhelesnyak, A., Chung, J., Lindberg, F.P., Sarfati, M., Frazier, W.A., and Brown, E.J. 1999. Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving α v β 3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J. Cell Biol.* **146**: 673-682.

Grewall, I.S., Xu, J., and Flavell, R.A. 1995. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* **378**: 617-620.

Grohmann, U., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. 1998. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF- κ B and primes DC for IL-12 production. *Immunity* **9**: 315-323.

Groux, H., Bigler, M., deVries, J.E., and Roncarolo, M.G. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **184**: 19-29.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., deVries, J.E., and Roncarolo, M.G. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**: 737-742.

Grufman, P., and Kärre, K. 2000. Innate and adaptive immunity to tumors: IL-12 is required for optimal responses. *Eur. J. Immunol.* **30**: 1088-1093.

Gubler, U., Chua, A.O., Schoenhaut, D.S., Dwier, C.M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Familletti, P.C., and Gately, M.K. 1991. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 4143-4147.

Hannier, S., Tournier, M., Bismuth, G., and Triebel, F. 1998. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J. Immunol.* **161**: 4058-4065.

Hannier, S., and Triebel, F. 2000. The MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 is co-distributed with CD8 and CD3-TCR molecules after their engagement by mAb or peptide-MHC class I complexes. *Int. Immunol.* **11**: 1745-1752.

Harigai, M., Hara, M., Nakazawa, S., Fukasawa, C., Ohta, S., Sugiura, T., Inoue, K., and Kashiwazaki, S. 1999. Ligation of CD40 induced tumor necrosis factor- α in rheumatoid arthritis: a novel mechanism of activation of synoviocytes. *J. Rheumatol.* **26**: 1035-1043.

Haskó, G., Szabó, C., Németh, Z.H., Salzman, A.L., and Vizi, E.S. 1998a. Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits endotoxin-induced IL-12 production in normal and IL-10 deficient mice. *J. Neuroimmunol.* **88**: 57-61.

Haskó, G., Vírag, L., Egnaczyk, G., Salman, A.L., and Szabó, C. 1998b. The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Eur. J. Immunol.* **28**: 1417-1425.

Hayakawa, K., Lin, B., and Hardy, R.R. 1992. Murine thymic CD4⁺ T cell subsets: A subset (Thy0) that secretes diverse cytokines and overexpresses the V β 8 T cell receptor gene family. *J. Exp. Med.* **176**: 269-274.

Hayes, M.P., Wang, J., and Norcross, M.A. 1995. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon- γ of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* **86**: 646-650.

Heinzel, F.P., Hujer, A.M., Ahmed, F.N., and Rerko, R.M. 1997. *In vivo* production and function of IL-12 p40 homodimers. *J. Immunol.* **158**: 4381-4388.

Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E., and Gately, M.K. 1993. Recombinant interleukin-12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **177**: 1505-1512.

Hermann, P., Van-Kooten, C., Gaillard, C., Banchereau, J., and Blanchard, D. 1995. CD40 ligand positive CD8⁺ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2972-2977.

Hiyarama, F., Katayama, N., Neben, S., Donaldson, D., Nickbarg, E.B., Clark, S.C., and Ogawa, M. 1994. Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture. *Blood* **83**: 92-98.

Hodge-Dufour, J., Noble, P.W., Horton, M.R., Bao, C., Wysocka, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Trinchieri, G., and Puré, E. 1997. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J. Immunol.* **159**: 2492-2500.

Hsieh, C.-S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. 1993. Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**: 547-549.

Huard, B., Gaulard, P., Faure, F., Hercend, T., and Triebel, F. 1994a. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. *Immunogenetics* **39**: 213-217.

Huard, B., Mastrangeli, R., Prigent, P., Bruniquel, D., Donini, S., El-Tayar, N., Maignret, B., Dreano, M., and Triebel, F. 1997. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 5744-5749.

Huard, B., Prigent, P., Pages, F., Bruniquel, D., and Triebel, F. 1996. T cell major histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4⁺ T cell clone responses following LAG-3 binding. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1180-1186.

Huard, B., Prigent, P., Tournier, M., Bruniquel, D., and Triebel, F. 1995. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2718-2721.

Huard, B., Tournier, M., Hercend, T., Triebel, F., and Faure, F. 1994b. Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4⁺ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**: 3216-3221.

Hunter, C.A., Bermudez, L., Beernink, H., Waegell, W., and Remington, J.S. 1995. Transforming growth factor- β inhibits interleukin-12-induced production of interferon- γ by natural killer cells: a role for transforming growth factor- β in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Immunol.* **25**: 994-1000.

Iannone, F., Corrigan, V.M., Kingsley, G.H., and Panayi, G.S. 1994. Evidence for the continuous recruitment and activation of T cells into the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **24**: 2706-2713.

Ishibashi, Y., Claus, S., and Relman, D.A. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leucocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **180**: 1225-1233.

Jacobsen, S.E.W., Veiby, O.P., and Smeland, E.B., 1993. Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **178**: 413-418.

Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell Jr., J.E., and Murphy, K.M. 1995. Interleukin-12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J. Exp. Med.* **181**: 1755- 1762.

Jain, J., Loh, C., and Rao, A. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 333-342.

Jeannin, P., Delneste, Y., Life, P., Gauchat, J.F., Kaiserlian, D., and Bonnefoy, J.Y. 1995. Interleukin-12 increases interleukin-4 production by established human Th0 and Th2-like T cell clones. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2247-2252.

Jeannin, P., Delneste, Y., Seveso, M., Life, P., and Bonnefoy, J.Y. 1996. IL-12 synergises with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. *J. Immunol.* **156**: 3159-3165.

Jiang, P., Lanegaur, C.F., and Narayanan, V. 1999. Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* **274**: 559-562.

Jonuleit, H., Wiedemann, K., Müller, G., Degwert, J., Hoppe, V., Knope, J., and Enk, A.H. 1997. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J. Immunol.* **158**: 2610-2615.

Jouanguy, E., Döffinger, R., Dupuis, S., Pallier, A., Altare, F., and Casanova, J.L. 1999. IL-12 and IFN- γ in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 345-351.

Kanegane, H., and Tosato, G. 1996. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* **88**: 230-235.

Kang, K., Kubin, M., Cooper, K.D., Lessin, S.R., Trinchieri, G., and Rook, A.H. 1996. IL-12 synthesis by human Langerhans cells. *J. Immunol.* **156**: 1402-1407.

Kaplan, M.H., Sun, Y-L., Hoey, T., and Grusby, M.J. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**: 174-177.

Karp, C.L., Wysocka, M., Wahl, L.M., Ahearn, J.M., Cuomo, P.J., Sherry, B., Trinchieri, G., and Griffin, D.E. 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* **273**: 228-231.

Kaufmann, S.H., Ladel, C.H., and Flesch, I.E. 1995. T cells and cytokines in intracellular bacterial infections: experiences with *Mycobacterium bovis* BCG. *Ciba Found. Symp.* **195**: 123-136.

Kawamura, T., Takeda, K., Mendiratta, S.K., Kawamura, H., Van Kaer, L., Yagita, H., Abo, T., and Okumura, K. 1998. Critical role of NK1⁺ T cells in IL-12-induced immune responses *in vivo*. *J. Immunol.* **160**: 16-19.

Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., Brasel, K., Morrissey, P.J., Stocking, K., Schuh, J.C.L., Joyce, S., and Peschon, J.J. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* **191**: 771-780.

King, C.L., Hakimi, J., Shata, M.T., and Medhat, A. 1995. IL-12 regulation of parasite antigen-driven IgE production in human helminth infections. *J. Immunol.* **155**: 454-461.

Kiniwa, M., Gately, M., Gubler, U., Chizzonite, R., Fargeas, C., and Delespesse, G. 1992. Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of IgE by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **90**: 262-266.

Kitching, A.R., Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. 1999. IL-12 directs severe renal injury, crescent formation and Th1 responses in murine glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* **29**: 1-10.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., and Montagnier, L. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **313**: 767-768.

Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J., and Krieg, A.M. 1996. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 2879-2883.

Kobayashi, M., Fitz, Z., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 827-845.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heuffer, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* **184**: 741-747.

Korthäuer, U., Graf, D., Mages, H.W., Brière, F., Padayachee, M., Malcom, S., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D., and Kroccek, R.A. 1993. Defective expression of T cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper IgM. *Nature* **361**: 539-541.

Kubin, M., Chow, J.M., and Trinchieri, G. 1994. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor α , and IL-1 β production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood* **83**: 1847-1855.

Kurys, G., Tagaya, Y., Bamford, R., Hanover, J.A., and Waldmann, T. 2000. The long signal peptide isoform and its alternative processing direct intracellular trafficking of IL-15. *J. Biol. Chem.* **275**: 30653-30659.

Lahav, J. 1993. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1182**: 1-14.

Lawler, J.W., Slayter, H.S., and Coligan, J.E. 1978. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **247**: 2723-2731.

Lebel-Binay, S., Berger, A., Zinzindohoué, F., Cugnenc, P.H., Thiounn, N., Fridman, W.H., and Pagès, F. 2000. Interleukin-18: biological properties and clinical implications. *Eur. Cyt. Netw.* **11**: 15-25.

Leclercq, G., Debacker, V., de Smedt, M., and Plum, J. 1996. Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *J. Exp. Med.* **184**: 325-336.

Leng, S.X., and Elias, J.A. 1997. Interleukin-11 inhibits macrophage interleukin-12 production. *J. Immunol.* **159**: 2161-2168.

Leonard, J.P., Waldburger, K.E., and Goldman, S.J. 1995. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J. Exp. Med.* **181**: 381-386.

Lester, M.R., Hofer, M.F., Gately, M., Trumble, A., and Leung, D.Y. 1995. Down-regulating effects of IL-4 and IL-10 on the IFN-gamma response in atopic dermatitis. *J. Immunol.* **154**: 6174-6181.

Li, X.C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T.R., and Strom, T.B. 2001a. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells *in vivo*. *Nat. Med.* **7**: 114-118.

Li, Z., He, L., Wilson, K.E., and Roberts, D.D. 2001b. Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation. *J. Immunol.* **166**: 2427-2436.

Lim, Y.C., Henault, L., Wagers, L., Kansas, G.S., Luscinskas, F.W., and Lichtman, A.H. 1999. Expression of functional selectin ligands on Th cells is differentially regulated by IL-12 and IL-4. *J. Immunol.* **162**: 3193-3201.

Lindberg, F.P., Gresham, H.D., Reinhold, M.I., and Brown, E.J. 1996. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *J. Cell Biol.* **134**: 1313-1322.

Lindberg, F.P., Gresham, H.D., Schwarz, E., and Brown, E.J. 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in $\alpha_v\beta_3$ -dependent ligand binding. *J. Cell Biol.* **123**: 485-496.

Ling, P., Gately, M.K., Gubler, U., Stern, A.S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y-C. E., and Hakimi, J. 1995. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J. Immunol.* **154**: 116-127.

Link, A.A., Kino, T., Worth, J.A., McGuire, J.L., Crane, M.L., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., and Elenkov, I.J. 2000. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J. Immunol.* **164**: 436-442.

Liu, J., Chen, M., and Wang, X. 2000a. Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway. *Immunology* **101**: 61-67.

Liu, Z., Geboes, K., Colpaert, S., D'Daens, G.R., Rutgeerts, P., and Ceuppens, J.L. 2000b. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J. Immunol.* **164**: 3608-3615.

Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**: 669-676.

Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., and Moser, B. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**: 344-345.

Ma, A. 2000a. Pleiotropic functions of IL-15 in innate and adaptive immunity. *Mod. Asp. Immunobiol.* **1**: 102-104.

Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R., and Trinchieri, G. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med.* **183**: 147-157.

Ma, X., Neurath, M., Gri, G., and Trinchieri, G. 1997. Identification and characterization of a novel Ets-2-related nuclear complex implicated in the activation of the human interleukin-12 p40 gene promoter. *J. Biol. Chem.* **272**: 10389-10395.

Ma, X., Sun, J., Papasavvas, E., Riemann, H., Robertson, S., Marshall, J., Bailer, R.T., Moore, A., Donnelly, R.P., Trinchieri, G., and Montaner, L.J. 2000b. Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. *J. Immunol.* **164**: 1722-1729.

Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **154**: 5071-5079.

MacDonald, K.P.A., Nishioka, Y., Lipsky, P.E., and Thomas, R. 1997. Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **100**: 2404-2414.

Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Axel, R. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**: 333-348.

Magram, J., Connaughton, S.E., Warriar, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C.Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A., and Gately, M.K. 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN γ production and type 1 cytokine responses. *Immunity* **4**: 471-481.

Malvey, E.N., Jenkins, M.K., and Mueller, D.L. 1998a. Peripheral immune tolerance blocks clonal expansion but fails to prevent the differentiation of Th1 cells. *J. Immunol.* **161**: 2168-2177.

Malvey, E.N., Telander, D.G., Vanasek, T.L., and Mueller, D.L. 1998b. The role of clonal anergy in the avoidance of autoimmunity: inactivation of autocrine growth without loss of effector function. *Immunol. Rev.* **165**: 301-318.

Manetti, R., Gerosa, F., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Parronchi, P., Piccinni, M.P., Sampognaro, S., Maggi, E., Romagnani, S., and Trinchieri, G. 1994. Interleukin-12 induces stable priming for interferon- γ (IFN- γ) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN- γ production in established Th2 cell clones. *J. Exp. Med.* **179**: 1273-1283.

Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* **177**: 1199-1204.

Marshall, J.D., Secrist, H., DeKruyff, R.H., Wolf, S.F., and Umetsu, D.T. 1995. IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* **155**: 111-117.

Marth, T., and Kelsall, B.L. 1997. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J. Exp. Med.* **185**: 1987-1995.

Masteller, E.L., Chuang, E., Mullen, A.C., Reiner, S.L., and Thompson, C.B. 2000. Structural analysis of CTLA-4 function *in vivo*. *J. Immunol.* **164**: 5319-5327.

Mateo, V., Lagneaux, L., Bron, D., Biron, G., Armant, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. 1999. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med.* **5**: 1277-1284.

Mattner, F., Magram, J., Ferrante, J., Launois, P., Di Padova, K., Behin, R., Gately, M.K., Louis, J.A., and Alber, J. 1996. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1553-1559.

Mazerolles, F., Amblard, F., Lumbroso, C., Van de Moortele, P.F., Lecomte, O., Barbat, C., Piatier-Tonneau, D., Auffray, C., and Fischer, A. 1990. Regulation of T helper-B lymphocyte adhesion through CD4-HLA class II interaction. *Eur. J. Immunol.* **20**: 637-644.

Mazerolles, F., Durandy, A., Piatier-Tonneau, D., Charron, D., Montagnier, L., Auffray, C., and Fischer, A. 1988. Immunosuppressive properties of synthetic peptides derived from CD4 and HLA-DR antigens. *Cell* **55**: 497-504.

Mazzeo, D., Panina-Bordignon, P., Recalde, H., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. 1998. Decreased IL-12 production and Th1 development by acetyl salicylic acid-mediated inhibition of NF- κ B. *Eur. J. Immunol.* **28**: 3205-3213.

McDyer, J.F., Dybul, M., Goletz, T.J., Kinter, A.L., Thomas, E.K., Berzofsky, J.A., Fauci, A.S., and Seder, R.A. 1999. Differential effects of CD40 ligand/trimer stimulation on the ability of dendritic cells to replicate and transmit HIV infection: evidence for CC-chemokine-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol.* **162**: 3711-3717.

McInnes, I.B., Al-Mughales, J., Field, M., Leung, B.P., Huang, F-P., Dixon, R., Sturrock, R.D., Wilkinson, P.C., and Liew, F.Y. 1996. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **2**: 175-182.

McInnes, I.B., Leung, B.P., Sturrock, R.D., Field, M., and Liew, F.Y. 1997. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **3**: 189-195.

McInnes, I.B., and Liew, F.Y. 1998. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol. Tod.* **19**: 75-79.

McIntyre, K.W., Shuster, D.J., Gillooly, K.M., Warriar, R.R., Connaughton, S.E., Hall, R.B., Arp, L.H., Gately, M.K., and Magram, J. 1996. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **26**: 2933-2938.

McKnight, A.J., Zimmer, G.J., Fogelman, I., Wolf, S.F., and Abbas, A.K. 1994. Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses *in vivo*. *J. Immunol.* **152**: 2172-2179.

McRae, B.L., Semnani, R.T., Hayes, M.P., and Van Severter, G.A. 1998. Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 development. *J. Immunol.* **160**: 4298-4304.

Meazza, R., Verdiani, S., Biassoni, R., Coppolecchia, M., Gaggero, A., Orengo, A.M., Colombo, M.P., Azzarone, B., and Ferrini, S. 1996. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* **12**: 2187-2192.

Meyaard, L., Hovenkamp, E., Otto, S.A., and Miedema, F. 1996. IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J. Immunol.* **156**: 2776-2782.

Mi, Z.P., Jiang, P., Weng, W.L., Lindberg, F.P., Narayanan, V., and Lagenaur, C.F. 2000. Expression of a synapse-associated membrane protein, P84/SHPS-1, and its ligand, IAP/CD47, in mouse retina. *J. Comp. Neurol.* **416**: 335-344.

Mingari, M.C., Maggi, E., Cambiaggi, A., Annunziato, F., Schiavetti, F., Manetti, R., Moretta, L., and Romagnani, S. 1996. Development *in vitro* of human CD4(+) thymocytes into functionally mature Th2 cells - exogenous interleukin-12 is required for priming thymocytes to produce both Th1 cytokines and interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1083-1087.

Miyazaki, T., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. 1996. Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science* **272**: 405-408.

Modlin, R.L., Melancon-Kaplan, J., Young, S.M.M., Pirmez, C., Kino, H., Convit, J., Rea, T.H., and Bloom, B.R. 1988. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 1213-1217.

Mohamadzadeh, M., Takashima, A., Dougherty, I., Knop, J., Bergstresser, P.R., and Cruz, P.D. Jr. 1995. Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin. *J. Immunol.* **155**: 4492-4496.

Moiola, L., Galbiati, F., Martino, G., Amadio, S., Brambilla, E., Comi, G., Vincent, A., Grimaldi, L.M., and Adorini, L. 1998. IL-12 is involved in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis, an antibody-mediated disease. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2487-2497.

Moller, D.R., Forman, J.D., Liu, M.C., Noble, P.W., Greenlee, B.M., Vyas, P., Holden, D.A., Forrester, J.M., Lazarus, A., Wysocka, M., Trinchieri, G., and Karp, C. 1996. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* **156**: 4952-4960.

Monteiro, J.M., Harvey, C., and Trinchieri, G. 1998. Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *J. Virol.* **72**: 4825-4831.

Morita, Y., Yamamura, M., Nishida, K., Harada, S., Okamoto, H., Inoue, H., Ohmoto, Y., Modlin, R.L., and Makino, H. 1998. Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**: 306-314.

Morris, S.C., Madden, K.B., Adamovicz, J.J., Gause, W.C., Hubbard, B.R., Gately, M.K., and Finkelman, F.D. 1994. Effects of IL-12 on *in vivo* cytokine gene expression and Ig isotype selection. *J. Immunol.* **152**: 1047-1056.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**: 2348-2357.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* **7**: 145-173.

Möttönen, M., Isomaki, P., Luukkainen, R., Toivanen, P., Punnonen, J., and Lassila, O. 2000. Interleukin-15 up-regulates the expression of CD154 on synovial fluid T cells. *Immunology* **100**: 238-244.

Mrózek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M.A. 1997. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**: 2632-2640.

Muchamuel, T., Menon, S., Pisacane, P., Howard, M.C., and Cockayne, D.A. 1997. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12 production. *J. Immunol.* **158**: 2898-2903.

Muller, G., Saloga, J., Germann, T., Bellinghausen, I., Mohamadzadeh, M., Knop, J., and Enk, A.H. 1994. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *J. Clin. Invest.* **94**: 1799-1805.

Murphy, E.E., Terres, G., Macatonia, S.E., Hsieh, C.S., Mattson, J., Lanier, L., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K., and O'Garra, A. 1994. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J. Exp. Med.* **180**: 223-231.

Murphy, T.L., Cleveland, M.G., Kulesza, P., Magram, J., and Murphy, K.M. 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF- κ B half-site. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5258-5267.

Nabors, G.S., Afonso, L.C.C., Farrell, J.P., and Scott, P. 1995. Switch from a type 2 to type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3142-3146.

Nahill, S.R., and Welsh, R.M. 1993. High frequency of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes elicited during the virus-induced polyclonal cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* **177**: 317-327.

Nastala, C.L., Edington, H.D., McKinney, T.G., Tahara, H., Nalesnik, M.A., Brunda, M.J., Gately, M.K., Wolf, S.F., Schreiber, R.D., Storkus, W.J., and Lotze, M.T. 1994. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN- γ production. *J. Immunol.* **153**: 1697-1706.

Naume, B., Gately, M., and Espevik, T. 1992. A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56⁺ natural killer cells. *J. Immunol.* **23**: 1831-1838.

Naume, B., Johnsen, A.C., Espevik, T., and Sundan, A. 1993. Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56⁺ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7, and interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1831-1838.

Németh, Z.H., Haskó, G., Szabó, C., Salzman, A.L., and Vizi, E.S. 1998. Calcium channel blockers and dantrolene differentially regulate the production of interleukin-12 and interferon-gamma in endotoxemic mice. *Brain. Res. Bull.* **46**: 257-261.

Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E., and Strober, W. 1995. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* **182**: 1281-1290.

Nutku, E., Gounni, A.S., Olivenstein, R., and Hamid, Q. 2000. Evidence for expression of eosinophil-associated IL-12 messenger RNA and immunoreactivity in bronchial asthma. *J. All. and Clin. Immunol.* **106**: 288-292.

Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lanegaur, C.F., Gresham, H.D., and Lindberg, F.P. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* **288**: 2051-2054.

Orange, J.S., and Biron, C.A. 1996. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- γ production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J. Immunol.* **156**: 1138-1142.

Onu, A., Pohl, T., Krause, H., and Bulfone-Paus, S. 1997. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J. Immunol.* **158**: 255-262.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawsky, S., Liu, Y.J., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Wall-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., and Kastelein, R.A. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**: 715-725.

Ozmen, L., Pericin, M., Hakimi, J., Chizzonite, R.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Gately, M., and Garotta, G. 1994. Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor α are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *J. Exp. Med.* **180**: 907-915.

Panina-Bordignon, P., Mazzeo, P., Lucia, P.D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C., and Sinigaglia, F. 1997. β_2 agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* **100**: 1513-1519.

Park, J.H., and Shin, S.H. 1996. Induction of IL-12 gene expression in the brain in septic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**: 391-396.

Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckian, A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Abbas, A.K. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance *in vivo* requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **6**: 411-417.

Perussia, B., Chan, S.H., D'Andrea, A., Tsuji, K., Santoli, D., Pospisil, M., Young, D., Wolf, S.F., and Trinchieri, G. 1992. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR- $\alpha\beta^+$, TCR- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes, and NK cells. *J. Immunol.* **149**: 3495-3502.

Pettersen, R.D., Hestdal, K., Olafsen, M.K., Lie, S.O., and Lindberg, F.P. 1999. CD47 signal T cell death. *J. Immunol.* **162**: 7031-7040.

Piatier-Tonneau, D., Gastinel, L.N., Amblard, F., Wojcik, M., Vaigot, P., and Auffray, C. 1991. Interaction of CD4 with HLA class II antigens and HIV gp120. *Immunogenetics* **34**: 121-128.

Plevy, S.E., Gemberling, J.H., Hsu, S., Dorner, A.J., and Smale, S.T. 1997. Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4572-4588.

Poggi, A., Rubartelli, A., and Zocchi, M.R. 1998. Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* **273**: 7205-7209.

Presky, D.H., Gubler, U., Chizzonite, R.A., and Gately, M.K. 1995. IL12 receptors and receptor antagonists. *Res. Immunol.* **146**: 439-444.

Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C-H., Gately, M.K., and Gubler, U. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 14002-14007.

Prigent, P., El Mir, S., Dreano, M., and Triebel, F. 1999. Lymphocyte activation gene-3 induces tumor regression and antitumor immune responses. *Eur. J. Immunol.* **29**: 3867-3876.

Reinecker, H.C., MacDermott, R.P., Mirau, S., Dignass, A., and Podolsky, D.K. 1996. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin-15. *Gastroenterol.* **111**: 1706-1713.

Reiner, S.L., Zheng, S., Wang, Z.E., Stowring, L., and Locksley, R.M. 1994. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* **179**: 447-456.

Reinhold, M.I., Green, J.M., Lindberg, F.P., Ticchioni, M., and Brown, E.J. 1999. Cell spreading distinguishes the mechanism of augmentation of T cell activation by integrin-associated protein/CD47 and CD28. *Int. Immunol.* **11**: 707-718.

Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Kersh, G.J., Allen, P.M., and Brown, E.J. 1997. Costimulation of T cell activation by integrin-associated protein (CD47) is an adhesion-dependent, CD28-independent signaling pathway. *J. Exp. Med.* **185**: 1-11.

Reinhold, M.R., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., and Brown, E.J. 1995. *In vivo* expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J. Cell Sci.* **108**: 3419-3425.

Rieckmann, P., Weber, F., Günther, A., Martin, S., Bitsch, A., Broocks, A., Kitze, B., Weber, T., Börner, T., and Poser, S. 1996. Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **64**: 193-200.

Rieser, C., Bock, G., Klocker, H., Bartsch, G., and Thurnher, M. 1997. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **186**: 1603-1608.

Robertson, M.J., Soiffer, R.J., Wolf, S.F., Manley, T.J., Donahue, C., Young, D., Herrmann, S.H., and Ritz, J. 1992. Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* **175**: 779-788.

Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D.H., Gubler, U., and Sinigaglia, F. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* **185**: 825-831.

Romani, L., Puccetti, P., and Bistoni, F. 1997. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 611-636.

Rosales, C., Gresham, H.D., and Brown, E.J. 1992. Expression of the 50-kDa integrin-associated protein on myeloid cells and erythrocytes. *J. Immunol.* **149**: 2759-2764.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* **187**: 875-883.

Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A., and Raz, E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**: 352-354.

Saurwein-Teissl, M., Zisterer, K., Schmitt, T.L., Gluck, R., Cryz, S., and Grubeck-Loebenstein, B. 1998. Whole virus influenza vaccine activates dendritic cells (DC) and stimulates cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) while subunit vaccines support T cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **114**: 271-276.

Scala, E., Carbonari, M., Del Porto, P., Cibati, M., Tedesco, T., Mazzone, A.M., Paganelli, R., and Fiorilli, M. 1998. Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) expression and interferon-gamma production are variably coregulated in different human T lymphocyte subpopulations. *J. Immunol.* **161**: 489-493.

Schmitt, E., Hoehn, P., Germann, T., and Rde, E. 1994a. Differential effects of IL12 on the development of naive mouse CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* **24**: 343-347.

Schmitt, E., Hoehn, P., Huels, C., Goedert, S., Palm, N., Rde, E., and Germann, T. 1994b. T helper type 1 development of naive CD4⁺ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon- γ and is inhibited by transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.* **24**: 793-798.

Schuler, G., and Steinman, R.M. 1997. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* **186**: 1183-1187.

Schwartz, B.S. 1989. Monocyte synthesis of thrombospondin. The role of platelets. *J. Biol. Chem.* **264**: 7512-7517.

Sebbag, M., Parry, S.L., Brennan, F.M., and Feldmann, M. 1997. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor- α , but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **27**: 624-632.

Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W.E. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 10188-10192.

Segal, B.M., Dwyer, B.K., and Shevach, E.M. 1998. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **187**: 537-546.

Seiffert, M., Cant, C., Chen, Z., Rappold, I., Brugger, W., Kanz, L., Brown, E.J., Ullrich, A., and Bühring, H.J. 1999. Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. *Blood* **94**: 3633-3643.

Senior, R.M., Gresham, H.D., Griffin, G.L., Brown, E.J., and Chung, A.E. 1992. Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leucocyte response integrin. *J. Clin. Invest.* **90**: 2251-2257.

Sher, A., and Coffman, R.L. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* **10**: 385-409.

Shu, U., Kiniwa, M., Wu, C.Y., Maliszewski, C., Vezzio, N., Hakimi, J., Gately, M., and Delespesse, G. 1995. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1125-1128.

Sieburth, D., Jabs, E.W., Warrington, J.A., Li, X., Lasota, J., LaForgia, S., Kelleher, K., Huebner, K., Wasmuth, J.J., and Wolf, S.F. 1992. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics* **14**: 59-62.

Simon, K., Seipelt, E., and Sieper, J. 1994. Divergent T cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 8562-8566.

Smith, T.J., Ducharme, L.A., and Weis, J.H. 1994. Preferential expression of interleukin-12 or interleukin-4 by murine bone-marrow mast cells derived in mast cell growth factor or interleukin-3. *Eur. J. Immunol.* **24**: 822-826.

Snijders, A., Hilkens, C.M.U., Van Der Pouw Krann, T.C.T.M., Engel, M., Aarden, L.A., and Kapsenberg, M.L. 1996. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J. Immunol.* **156**: 1207-1212.

Sousa, C.R., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and 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. *J. Exp. Med.* **186**: 1819-1829.

Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-314.

Stahl, N., and Yancopoulos, G.D. 1993. The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell* **74**: 587-590.

Stalder, A.K., Pagenstecher, A., Yu, N.C., Kincaid, C., Chiang, C.S., Hobbs, M.V., Bloom, F.E., and Campbell, I.L. 1997. Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *J. Immunol.* **159**: 1344-1351.

Stern, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., Chizzonite, R., and Gately, M.K. 1990. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 6808-6812.

Subramanyam, M., Wands, G., Nabioullin, R., and Tepper, M.A. 1998. Soluble human lymphocyte activation gene-3 modulates allospecific T cell responses. *Int. Immunol.* **10**: 679-689.

Sutterwala, F.S., Noel, G.J., Clynes, R., and Mosser, D.M. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J. Exp. Med.* **185**: 1977-1985.

Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E.H., Subramanyam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., and Schaub, R.G. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin-12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* **177**: 1797-1802.

Szabó, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., and Murphy, K.M. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* **185**: 817-824.

Tagaya, Y., Burton, J.D., Miyamoto, Y., and Waldmann, T.A. 1996. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO J.* **15**: 4928-4939.

Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T.A., Losi, J.M., Azimi, N., Hanover, J.A., Bamford, R.N., and Waldmann, T.A. 1997. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 14444-14449.

Takahashi, M., Ogasawara, K., Takeda, K., Hashimoto, W., Sakihara, H., Kumagai, K., Anzai, R., Satoh, M., and Seki, S. 1996. LPS induces NK1.1⁺ alpha beta T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. *J. Immunol.* **156**: 2436-2442.

Takeuchi, M., Alard, P., and Streilein, J.W. 1998. TGF- β promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **160**: 1589-1597.

Tarrant, T.K., Silver, P.B., Chan, C.-C., Wiggert, B., and Caspi, R.R. 1998. Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *J. Immunol.* **161**: 122-127.

Tarrant, T.K., Silver, P.B., Wahlsten, J.L., Rizzo, L.V., Chan, C.-C., Wiggert, B., and Caspi, R.R. 1999. Interleukin 12 protects from a T helper type 1-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune uveitis, through a mechanism involving interferon γ , nitric oxide, and apoptosis. *J. Exp. Med.* **189**: 219-230.

Thienel, U., Loike, J., and Yellin, M.J. 1999. CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leucocyte subsets. *Cell. Immunol.* **198**: 87-95.

Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., and Ihle, J.N. 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**: 171-174.

Ticchioni, M., Deckert, M., Mary, F., Bernard, G., and Bernard, A. 1997. Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *J. Immunol.* **158**: 677-684.

Tone, Y., Thompson, S.A.J., Babik, J.M., Nolan, K.F., Tone, M., Raven, C., and Waldmann, H. 1996. Structure and chromosomal location of the mouse interleukin-12 p35 and p40 subunit genes. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1222-1227.

Trembleau, S., Germann, T., Gately, M.K., and Adorini, L. 1995a. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* **16**: 383-386.

Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M.K., and Adorini, L. 1995b. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J. Exp. Med.* **181**: 817-821.

Trembleau, S., Penna, G., Gregori, S., Chapman, H.D., Serreze, D.V., Magram, J., and Adorini, L. 1999. Pancreas-infiltrating Th1 cells and diabetes develop in IL-12-deficient nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **163**: 2960-2968.

Trembleau, S., Penna, G., Gregori, S., Gately, M.K., and Adorini, L. 1997. Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2230-2239.

Trepicchio, W.L., Bozza, M., Pedneault, G., and Dorner, A.J. 1996. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J. Immunol.* **157**: 3627-3634.

Triebel, F., Jitsukawa, S., Baixeras, E., Roman, R.S., Genevee, C., Viegas, P.E., and Hercend, T. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* **171**: 1393-1405.

Trinchieri, G., and Gerosa, F. 1996. Immunoregulation of interleukin-12. *J. Leuk. Biol.* **59**: 505-511.

Trinchieri, G., and Scott, P. 1994. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol. Tod.* **15**: 460-463.

Tripp, C.S., Wolf, S.F., and Unanue, E.R. 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killer cells in severe combined immuno-deficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 3725-3729.

Ulfgren, A-K., Lindblad, S., Klareskog, L., Andersson, J., and Andersson, U. 1995. Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **54**: 654-661.

Uronen, H., and Callard, R.E. 2000. Absence of CD40-CD40 ligand interactions in X-linked hyper-IgM syndrome does not affect differentiation of T helper cell subsets. *Clin. Exp. Immunol.* **121**: 346-352.

Uyemura, K., Demer, L.L., Castle, S.C., Jullien, D., Berliner, J.A., Gately, M.K., Warrier, R.R., Pham, N., Fogelman, A.M., and Modlin, R.L. 1996. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **97**: 2130-2138.

Vallejo, A.N., Mugge, L.O., Klimiuk, P.A., Weyand, C.M., and Goronzy, J.J. 2000. Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *J. Immunol.* **164**: 2947-2954.

Van der Pouw Kraan, T.C., Boeijs, L.C.M., Smeenk, R.J.T., Wijdenes, J., and Aarden, L.A. 1995. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. *J. Exp. Med.* **181**: 775-779.

Van der Pouw Kraan, T.C., Snijders, A., Boeije, L.C., Degroot, E.R., Alewijnse, A.E., Leurs, R., and Aarden, L.A. 1998. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H₂ receptors. *J. Clin. Invest.* **102**: 1866-1873.

Van Parijs, L., Perez, V.L., Biuckians, A., Maki, R.G., London, C.A., and Abbas, A.K. 1997. Role of interleukin-12 and costimulators in T cell anergy *in vivo*. *J. Exp. Med.* **186**: 1119-1128.

Van Strijp, J.A.G., Russell, D.J., Tuomanen, E., Brown, E.J., and Wright, S.D. 1993. Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, alpha m beta 2, Mac-1). Indirect effects of Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. *J. Immunol.* **151**: 3324-3336.

Verdijk, R.M., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C.J., Brand, A., and Goulmy, E. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J. Immunol.* **163**: 57-61.

Verdrengh, M., Lindberg, F.P., Ryden, C., and Tarkowski, A. 1999. Integrin-associated protein (IAP) - deficient mice are less susceptible to, developing *Staphylococcus aureus* - induced arthritis. *Microbes and Infection* **1**: 745-751.

Vernon-Wilson, E.F., Kee, W.J., Willis, A.C., Barclay, A.N., Simmons, D.L., and Brown, M.H. 2000. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha1. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2130-2137.

Via, C.S., Rus, V., Gately, M.K., and Finkelman, F.D. 1994. IL-12 stimulates the development of acute graft-versus-host disease in mice that normally would develop chronic, autoimmune graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **153**: 4040-4047.

Vieira, P.L., Kalinski, P., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L., and Dejong, E.C. 1998. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by *in vitro*-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J. Immunol.* **161**: 5245-5251.

Vyth-Dreese, F.A., Van Kooyk, Y., DelleMijn, T.A.M., Melief, C.J.M., and Figdor, C.G. 1993. Regulatory effect of interleukin-4 (IL-4) on the expression and function of lymphocyte adhesion receptors involved in IL-2-induced cell aggregation. *Immunol.* **78**: 244-251.

Waclavicek, M., Majdic, O., Stulnig, T., Berger, M., Baumruker, T., Knapp, W., and Pickl, W. 1997. T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4. *J. Immunol.* **159**: 5345-5354.

Wagers, A.J., Waters, C.M., Stoolman, L.M., and Kansas, G.S. 1998. Interleukin 12 and interleukin 4 control T cell adhesion to endothelial selectins through opposite effects on α 1,3-fucosyltransferase VII gene expression. *J. Exp. Med.* **188**: 2225-2231.

Wagner, U.G., Kurtin, P.J., Wahner, A., Brackertz, M., Berry, D.J., Goronzy, J.J., and Weyand, G.M. 1998. The role of CD8⁺ CD40L⁺ T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.* **161**: 6390-6397.

Wang, J., Wakeham, J., Harkness, R., and Xing, Z. 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* **103**: 1023-1029.

Wang, X.Q., and Frazier, W.A. 1998. The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha 2 beta 1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell* **9**: 865-874.

Wiley, J.A., and Harmsen, A.G. 1995. CD40 ligand is required for resolution of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J. Immunol.* **155**: 3525-3529.

Wolf, S.F., Bliss, J., Stokes, K., and Sypek, J. 1995. Activity of IL12 as adjuvant in promoting Th1 and Th2 recall responses. *Res. Immunol.* **146**: 486-493.

Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., Kelleher, K., Herrmann, S.H., Clark, S.C., Azzoni, L., Chan, S.H., Trinchieri, G., and Perussia, B. 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**: 3074-3081.

Wong, H.L., Wilson, D.E., Jenson, J.C., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., and Gately, M.K. 1988. Characterization of a factor(s) which synergizes with recombinant interleukin 2 in promoting allogeneic human cytolytic T-lymphocyte responses *in vitro*. *Cell. Immunol.* **111**: 39-54.

Wu, C.Y., Demeure, C.E., Gately, M., Podlaski, F., Yssel, H., Kiniwa, M., and Delespesse, G. 1994. *In vitro* maturation of human neonatal CD4 T lymphocytes. *J. Immunol.* **152**: 1141-1153.

Wu, C.Y., Demeure, C., Kiniwa, M., Gately, M., and Delespesse, G. 1993. IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells. *J. Immunol.* **151**: 1938-1949.

Wynn, T.A., Jankovic, D., Hieny, S., Zioncheck, K., Jardieu, P., Cheever, A.W., and Sher, A. 1995. IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN- γ . *J. Immunol.* **154**: 3999-4009.

Wysocka, M., Kubin, M., Vieira, L.Q., Ozmen, L., Garrota, G., Scott, P., and Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12 is required for interferon- γ production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* **25**: 672-676.

Yashimoto, T., Kojima, K., Funakoshi, T., Endo, Y., Fujita, T., and Nariuchi, H. 1996. Molecular cloning and characterization of murine IL-12 genes. *J. Immunol.* **156**: 1082-1088.

Yawalkar, N., Karlen, S., Hunger, R., Brand, C.U., and Braathen, L.R. 1998. Expression of interleukin-12 is increased in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* **111**: 1053-1057.

Yehualaeshet, T., O'Connor, R., Green-Johnson, J., Mai, S., Silverstein, R., Murphy-Ullrich, J.E., and Khalil, N. 1999. Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am. J. Pathol.* **155**: 841-851.

Yoshida, H., Tomiyama, Y., Ishikawa, J., Oritani, K., Matsumura, I., Shiraga, M., Yokota, T., Okajima, Y., Ogawa, M., Miyagawa, Ji., Nishiura, T., and Matsuzawa, Y. 2000. Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42. *Blood* **96**: 234-241.

Zaccone, P., Hutchings, P., Nicoletti, F., Penna, G., Adorini, L., and Cooke, A. 1999. The involvement of IL-12 in murine experimentally induced autoimmune thyroid disease. *Eur. J. Immunol.* **29**: 1933-1942.

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F., and Sprent, J. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells *in vivo* by IL-15. *Immunity* **8**: 591-599.

Zhou, M., and Brown, E.J. 1993. Leucocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J. Exp. Med.* **178**: 1165-1174.

ANNEXES

Annexe 1

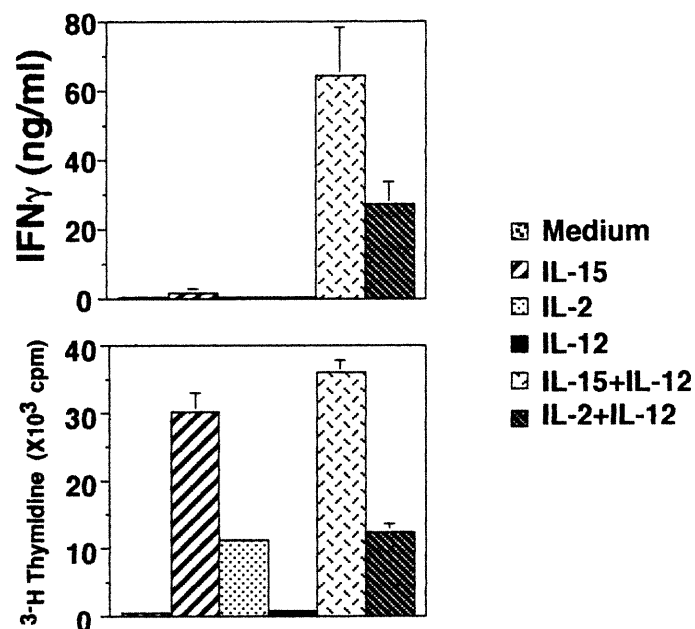


Figure 1

Effet régulateur de l'IL-15, l'IL-2 et l'IL-12 sur la prolifération et la production d'IFN- γ par des lymphocytes T CD8 $^+$ hautement purifiés

Les lymphocytes T CD8 $^+$ hautement purifiés ont été stimulés avec de l'IL-15 (100 ng/ml), de l'IL-2 (50 U/ml) ou de l'IL-12 (60 pM) seule ou en combinaison. Les surnageants de culture ont été collectés après 5 jours afin de mesurer la sécrétion d'IFN- γ . Après 5 jours, la prolifération cellulaire a aussi été quantifiée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de 3 expériences.

Annexe 2

	control mAb	anti-CD47
IFN γ	2.2 \pm 0.8	0.4 \pm 0.2
TNF α	0.5 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0
LT α	4.6 \pm 0.9	0.2 \pm 0.1
IL-4	0.5 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
IL-5	7.7 \pm 0.9	2.4 \pm 1.1
IL-10	1.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2
IL-13	8.9 \pm 1.0	0.7 \pm 0.3
TGF β	0.5 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1

Table I

Profil des cytokines des lymphocytes T effecteurs pré-traités à l'anti-CD47

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle (10 μ g/ml). Après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées au bleu de trypan puis expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avec de l'IL-2 (25 U/ml) pour 9 à 12 jours. Les cellules ont été à nouveau comptées, ajustées à 1×10^6 cellules/ml et restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé et une costimulation B7. Les cytokines ont été mesurées 24 heures (IL-4), 48 heures (IFN- γ , TNF- α , LT- α , IL-5, IL-10 et IL-13) ou 72 heures (TGF- β) suivant la culture secondaire. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 5 expériences. Les cytokines sont exprimées en ng/ml. Les niveaux de production de cytokines des cellules traitées à l'anti-CD47 diffèrent de façon significative ($p < 0.05$) de ceux des cellules traitées avec l'anticorps contrôle.

Exp.	control mAb	anti-CD47
1	40 ^a	3
2	23	3
3	11	5
4	16	8
5	13	9
6	60	40

^a nombre de cellules viables ($\times 10^6$) après 9 à 12 jours d'expansion en IL-2

Table II

L'engagement du CD47 inhibe la réponse des lymphocytes T à l'IL-2 lors de la phase d'expansion

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle ($10 \mu\text{g/ml}$). Après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées, et expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml en présence d'IL-2 (25 U/ml) pour une période de 9 à 12 jours. Le nombre de cellules viables a été compté à la fin de la phase d'expansion en IL-2 à l'aide de bleu de trypan.

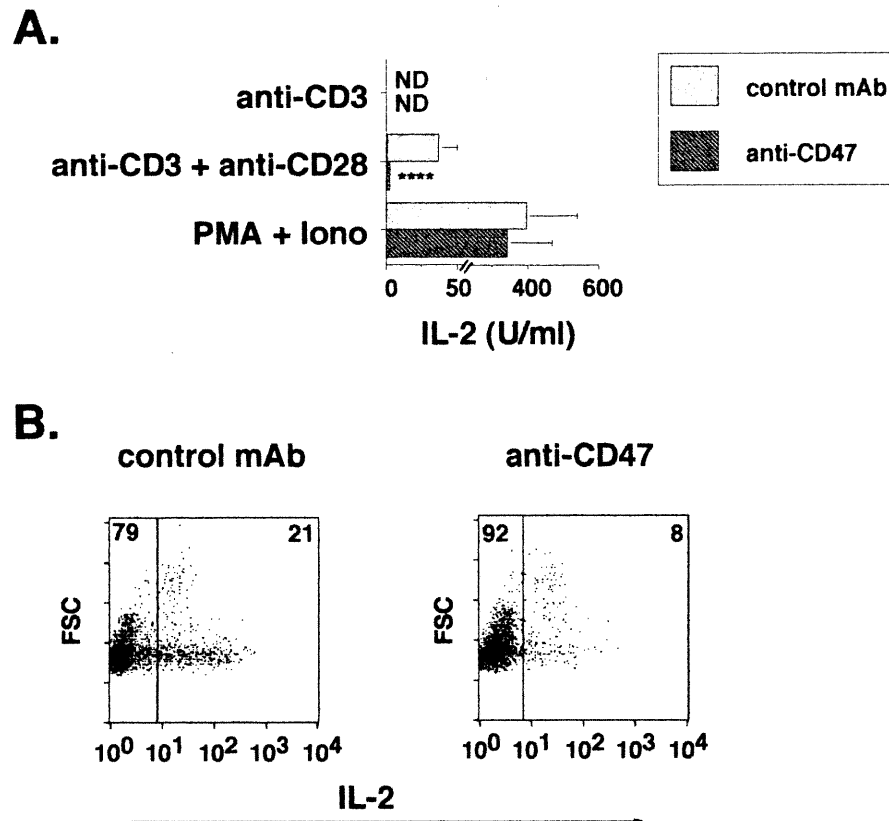


Figure 1

L'engagement du CD47 inhibe la production d'IL-2 par les lymphocytes T effecteurs

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle ($10 \mu\text{g/ml}$). **Panneau A:** après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées au bleu de trypan puis expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avec de l'IL-2 (25 U/ml) pour 9 à 12 jours. Les cellules ont été à nouveau comptées, ajustées à 1×10^6 cellules/ml et restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé en absence ou en présence d'anti-CD28 ou avec de la PMA et de l'ionomycine. La sécrétion d'IL-2 a été mesurée 24 heures suivant la culture secondaire. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 5 expériences **** $p < 0.001$. ND=non détectable. **Panneau B:** après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été traitées tel que décrit dans le panneau A. Par contre, à la culture secondaire les cellules ont été restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé sur 2×10^5 cellules L transfectées (CD32-B7.1) et irradiées. L'IL-2 intracytoplasmique a été mesurée 5 heures après la restimulation. Les résultats montrent 1 expérience représentative.

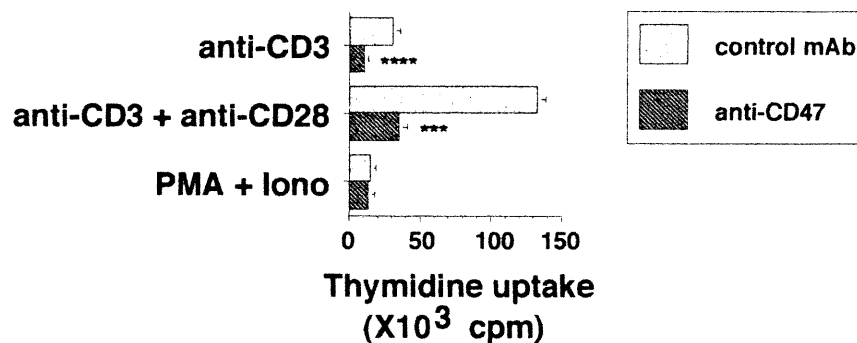


Figure 2

L'engagement du CD47 inhibe la prolifération des lymphocytes T effecteurs

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle ($10 \mu\text{g/ml}$). Après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées au bleu de trypan puis expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avec de l'IL-2 (25 U/ml) pour 9 à 12 jours. Les cellules ont été à nouveau comptées, ajustées à 1×10^6 cellules/ml et restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé en absence ou en présence d'anti-CD28 ou avec de la PMA et de l'ionomycine. La prolifération cellulaire a été mesurée 48 heures suivant la culture secondaire par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 5 expériences. *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

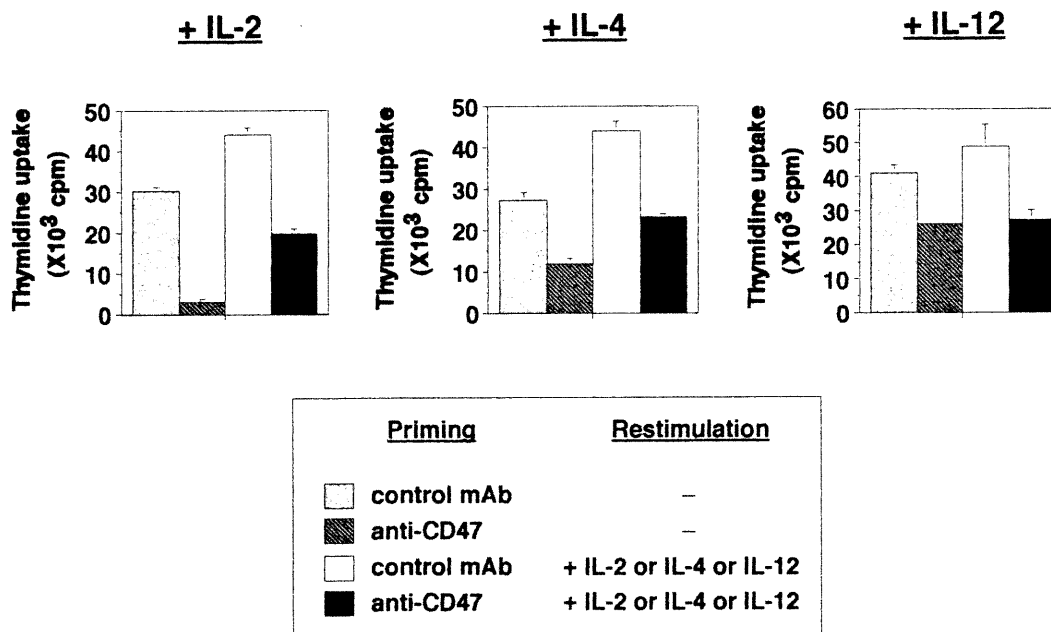
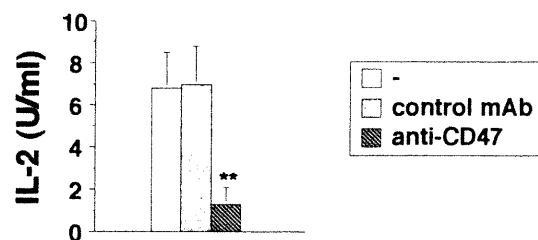


Figure 3

L'engagement du CD47 inhibe la réponse des lymphocytes T effecteurs à l'IL-2, l'IL-4 ou l'IL-12 exogène

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle (10 μ g/ml). Après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées au bleu de trypan puis expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avec de l'IL-2 (25 U/ml) pour 9 à 12 jours. Les cellules ont été à nouveau comptées, ajustées à 1×10^6 cellules/ml et restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé en absence (-) ou en présence d'IL-2 (50 U/ml), d'IL-4 (20 ng/ml) ou d'IL-12 (60 pM) exogène. La prolifération cellulaire a été mesurée 48 heures suivant la culture secondaire par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de triplicats.

A.



B.

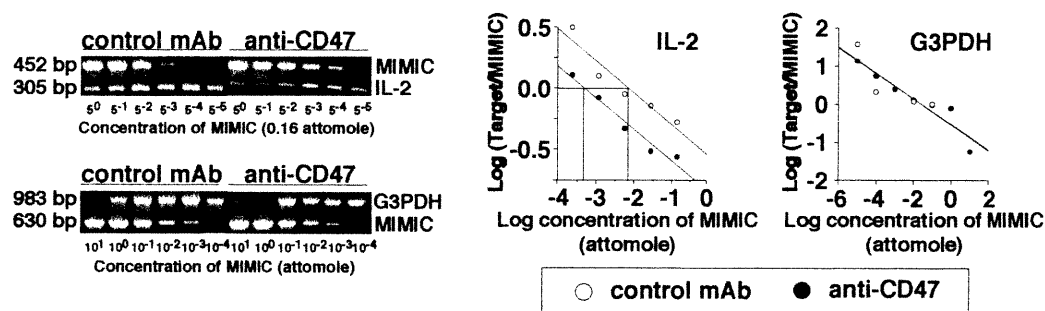


Figure 4

L'engagement du CD47 inhibe la production d'IL-2 dans la culture primaire

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en absence (-) ou en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle ($10 \mu\text{g/ml}$). **Panneau A:** la sécrétion d'IL-2 a été mesurée 24 heures après le début de la culture primaire. Les résultats montrent la moyenne \pm SEM de 5 expériences. $**p < 0.01$. **Panneau B:** les ARNm pour l'IL-2 et le G3PDH ont été extraits et quantifiés par RT-PCR après 6 heures de culture primaire. Les résultats montrent 1 expérience représentative.

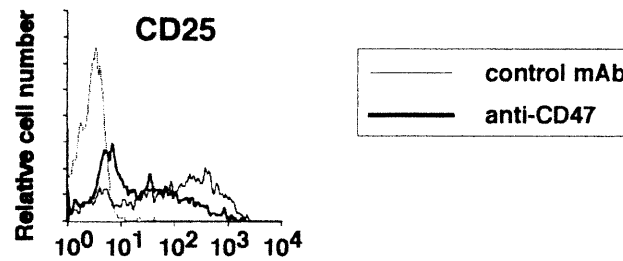


Figure 5

**L'engagement du CD47 inhibe la réponse à l'IL-2
dans la culture primaire**

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle ($10 \mu\text{g/ml}$). Après 3 jours de culture primaire, l'expression du CD25 a été déterminée par une méthode de coloration directe. Le bruit de fond est montrée par la ligne pointillée. Les résultats montrent 1 expérience représentative de 3.

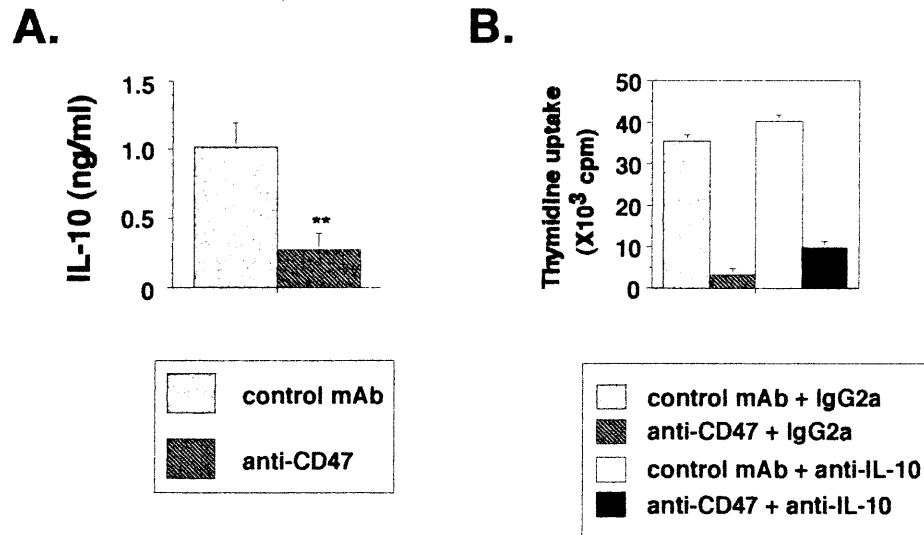


Figure 6

L'engagement du CD47 induit l'anergie de façon indépendante à l'IL-10 endogène

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA en présence d'anti-CD47 ou d'anticorps contrôle (10 μ g/ml). **Panneau A:** la sécrétion d'IL-10 a été mesurée à la fin des 3 jours de la culture primaire. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences. ****p<0.01.** **Panneau B:** les CBMC ont été traités avec de l'anti-IL-10 (5 μ g/ml) ou l'anticorps contrôle IgG2a (5 μ g/ml). Après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées au bleu de trypan puis expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avec de l'IL-2 (25 U/ml) pour 9 à 12 jours. Les cellules ont été à nouveau comptées, ajustées à 1×10^6 cellules/ml et restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé. La prolifération cellulaire a été mesurée 48 heures après la restimulation par incorporation de thymidine. Les résultats montrent la moyenne \pm SD de triplicats.

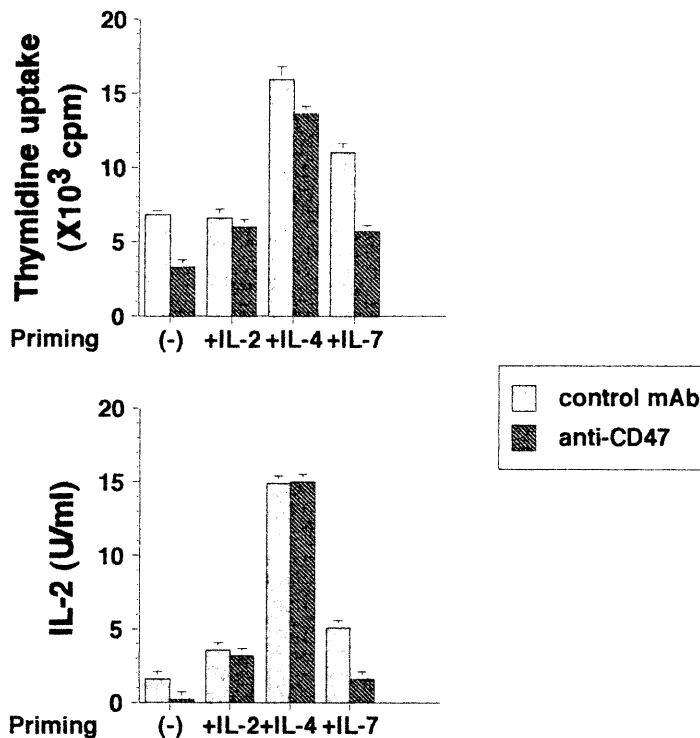


Figure 7

L'anergie induite par l'engagement du CD47 est complètement restaurée par l'IL-2 ou l'IL-4, mais pas l'IL-7, exogène

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA et de l'anti-CD47 ou de l'anticorps contrôle (10 μ g/ml) en absence (-) ou en présence d'IL-2 (20 U/ml), d'IL-4 (20 ng/ml) ou d'IL-7 (10 ng/ml) exogène. Après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées au bleu de trypan puis expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avec de l'IL-2 (25 U/ml) pour 9 à 12 jours. Les cellules ont été à nouveau comptées, ajustées à 1×10^6 cellules/ml et restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé et une costimulation B7. La prolifération cellulaire et la sécrétion d'IL-2 ont été mesurées 24 heures suivant la culture secondaire. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de triplicats.

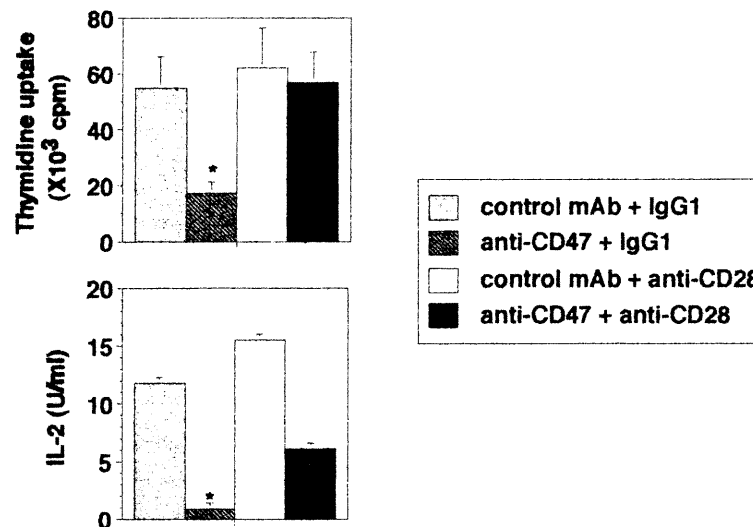


Figure 8

L'anergie induite par l'engagement du CD47 est largement restaurée par une costimulation CD28

Les CBMC ont été stimulés à 1×10^6 cellules/ml avec de la PHA et de l'anti-CD47 ou de l'anticorps contrôle ($10 \mu\text{g/ml}$) en présence d'anti-CD28 ($2 \mu\text{g/ml}$) ou d'anticorps contrôle IgG1 ($2 \mu\text{g/ml}$). Après 3 jours de culture primaire, les cellules ont été lavées, comptées au bleu de trypan puis expandues à une concentration initiale de 0.5×10^6 cellules/ml avec de l'IL-2 (25 U/ml) pour 9 à 12 jours. Les cellules ont été à nouveau comptées, ajustées à 1×10^6 cellules/ml et restimulées avec de l'anti-CD3 immobilisé et une costimulation B7. La prolifération cellulaire et la sécrétion d'IL-2 ont été mesurées 24 heures suivant la culture secondaire. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences pour la prolifération cellulaire et la moyenne \pm SD de triplicats pour l'IL-2. * $p < 0.05$.