

Université de Montréal

**Rôle de la molécule CD47 sur le lymphocyte T dans la
régulation de la réponse immunitaire**

par

Salim Bouguermouh

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

Juillet 2009

© Salim Bouguermouh, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôle de la molécule CD47 sur le lymphocyte T dans la
régulation de la réponse immunitaire**

présentée par :

Salim Bouguermouh

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Naglaa Shoukry, président-rapporteur

Dr Marika Sarfati, directeur de recherche

Dr Guy Delespesse, co-directeur

Dr Élie Haddad, membre du jury

Dr Giovanni John Di Battista, examinateur externe

Dr Claude Perreault, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'importance respective des lymphocytes T régulateurs naturels générés dans le thymus ou induits en périphérie dans la régulation immunitaire et la résolution de l'inflammation est désormais bien établie. Nous avons contribué à mettre en évidence une nouvelle voie d'induction de lymphocytes T régulateurs périphériques à partir de cellules T humaines $CD4^+CD25^-$ naïves et mémoires. Nous avons montré que l'engagement de la molécule ubiquitaire transmembranaire CD47 sur la cellule T par un anticorps monoclonal ou par le peptide 4N1K (peptide dérivé du domaine carboxy-terminal de la thrombospondine-1 et spécifique du site de liaison à CD47) induisait des lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs exerçant une fonction suppressive sur les lymphocytes T effecteurs. Les propriétés suppressives induites par la thrombospondine-1 confortent les fonctions anti-inflammatoires de cette protéine de la matrice extracellulaire. L'inhibition exercée par les lymphocytes T régulateurs induits dépend du contact intercellulaire entre les cellules T régulatrices et leurs cibles, et est indépendante du TGF- β .

Nos résultats démontrent également le rôle de CD47 sur le lymphocyte T $CD4^+$ dans la réponse immunitaire spécifique de l'antigène *in vivo*. En effet, les souris BALB/c déficientes pour CD47 présentent un biais de la sécrétion d'anticorps et de cytokines de type Th1, alors que les souris BALB/c sont décrites comme exprimant un profil de production de cytokines de type Th2. Nos travaux mettent en évidence le rôle de CD47 dans l'inhibition du développement d'une réponse cellulaire et humorale de type Th1 *in vivo*, confirmant de précédentes études *in vitro* réalisées avec des cellules T $CD4^+$ humaines.

Nous présentons également le rôle inhibiteur de l'engagement de CD28 *in vitro* sur la différenciation en cellules Th17 des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs isolés de souris

BALB/c. Le mécanisme proposé est dépendant de la production de l'IL-2 et de l'IFN- γ , et indépendant de la présence de lymphocytes T régulateurs.

Notre étude du rôle de deux molécules transmembranaires CD47 et CD28 exprimées sur la cellule T CD4⁺, contribue à une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la tolérance immunologique, la résolution de l'inflammation et la différenciation des cellules T "helper" CD4⁺.

Mots-clés : CD47, CD4, CD172a, CD28, Inflammation, Integrin associated protein, Immunologie, Cellules T régulatrices, Lymphocyte T, Signal regulatory proteins alpha, SIRP-alpha, Thrombospondines, Thrombospondine-1, Th1, Th17, IL-17, Interleukine-17, TSP-1.

Abstract

Nowadays, the importance of natural regulatory T cells and adaptive regulatory T lymphocytes in immune regulation and resolution of inflammation are well established. We report a previously unknown pathway to generate adaptive regulatory T cells in the periphery from naive and memory human CD4⁺CD25⁻ T cells. We show that the stimulation of the broadly expressed transmembrane proteins CD47 on T cells by a monoclonal antibody or by the 4NK1 peptide (carboxy-terminal peptide of thrombospondin-1 (TSP) specific of the binding site of CD47) induced regulatory T cells that exerted an inhibitory function on effector T cells. Our study on the suppressive properties of the TSP corroborates with reported anti-inflammatory activities of this extracellular matrix protein. The suppressive function of TSP induced regulatory T cells was contact-dependent and TGF- β -independent.

Our data further demonstrate the role of CD47 expression on T cells in the antigenic-specific immune response *in vivo*. We report that the CD47-deficient BALB/c mice displayed a Th1-biased antibody and cytokine responses, instead of the Th2 cytokine profile observed in unmanipulated BALB/c mice. Our study outlines the role of CD47 as a self-control mechanism to negatively regulate type 1 cellular and humoral immune responses and most importantly confirm *in vivo* previous *in vitro* studies with human CD4⁺ T cells.

We also report that soluble anti-CD28 monoclonal antibody suppressed *in vitro* differentiation of naïve CD4⁺ T cells isolated from BALB/c mice into IL-17-producing cells by mechanism that are IL-2 and IFN- γ -dependent but independent of the presence of regulatory T cells.

Our studies highlight the suppressive function of two transmembrane molecules CD47 and CD28 expressed by CD4⁺ T cells *in vitro* and *in vivo* in human and mice. They thus may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the induction of immune tolerance, the resolution of inflammation and the differentiation of the T helper cells.

Key words : CD47, CD4, CD172a, CD28, Inflammation, Immunology, Integrin associated protein, T cells, Regulatory T cells, Signal regulatory proteins alpha, SIRP-alpha, Thrombospondins, Thrombospondin-1, Th1, Th17, IL-17, Interleukin-17, TSP-1.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xv
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	xviii
Introduction.....	1
1. L'immunité adaptative et sa régulation.....	1
1.1. Le paradigme Th1/TH2.....	1
1.1.1. Description des Cellules Th1 et Th2.....	1
1.1.2. Régulation de la différenciation Th1.....	2
1.1.3. Régulation de la différenciation Th2.....	5
1.2. La réponse Th17.....	8
1.2.1 Contradictions du paradigme Th1/Th2 et découverte des cellules Th17.....	8
1.2.2. Régulation de la différenciation Th17 chez la souris.....	10
1.2.3. Régulation de différenciation Th17 chez l'homme.....	12
1.3. Les lymphocytes T régulateurs.....	15
1.3.1. Découverte des lymphocytes T régulateurs (Treg)	15
1.3.2. Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) générés dans le thymus.....	16
1.3.3. Foxp3 contrôle la différenciation et le développement des lymphocytes T régulateurs.....	17

1.3.4. Contrôle de la fonction des Treg par Foxp3.....	18
1.3.5. Les lymphocytes T régulateurs induits en périphérie à partir de lymphocytes T naïfs (iTreg)	19
1.3.6. Mécanismes de l'immuno-modulation induite par les lymphocytes T régulateurs.....	24
<i>A. Cytokines inhibitrices</i>	25
<i>B. Suppression par cytotoxicité</i>	25
<i>C. Suppression par perturbation métabolique de la cellule T effectrice</i>	26
<i>D. Suppression par action sur les cellules dendritiques</i>	27
1.4. Plasticité du lignage des lymphocytes T et épigénétique.....	29
2.CD47.....	32
2.1. La Molécule CD47.....	32
2.2. Ligands connus de CD47.....	34
2.2.1. Les thrombospondines-1 et 2 (TSP-1, 2) et autres (TSP-3, 4, 5).....	34
2.2.2. SIRP (Signal inhibitory regulatory protein).....	41
<i>A. SIRP-α</i>	41
<i>B. SIRP-γ</i>	44
2.2.3. CD47 s'associe en cis aux intégrines: $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$	44
2.3. Fonctions décrites en immunologie.....	46
2.3.1. Dans la mort cellulaire programmée (apoptose)	46
2.3.2. Dans le répons immunitaire innée.....	47
2.3.2.1. La liaison CD47 – TSP.....	47
2.3.2.2. La liaison CD47 – SIRP- α	48
<i>A. Cellules dendritiques, monocytes, cellules de Langerhans</i>	48

<i>B. Macrophages : La discrimination entre "le soi" et "le non-soi" et l'inhibition de la phagocytose.....</i>	49
<i>C. Macrophages : fusion des phagocytes.....</i>	50
2.3.2.3. La liaison CD47/ α v β 3.....	51
<i>A. Monocytes, Neutrophiles, Macrophages.....</i>	51
2.3.3. Dans l'adhérence et la migration des leucocytes	51
2.3.3.1. La liaison CD47 – SIRP- α /SIRP- γ	52
<i>A. Cellules dendritiques et monocytes.....</i>	52
<i>B. Neutrophiles.....</i>	53
<i>C. Lymphocytes T et B.....</i>	55
2.3.4. Dans la réponse immunitaire adaptative.....	56
2.3.4.1. La liaison CD47 - TSP-1.....	56
2.3.4.2. La liaison CD47 - SIRP- α /SIRP- γ	58
Résultats.....	59
1. Article I.....	59
2. Article II.....	90
3. Article III.....	136
Discussion et Perspectives.....	171
1. Introduction.....	171
2. CD47 et inhibition du développement Th1.....	171
3. CD28 et inhibition du développement Th17.....	177
4. CD47 et induction de cellules T régulatrices.....	179
5. Thrombospondine-1/TGF- β : fonctions dépendantes ou indépendantes du CD47.....	180
6. CD47 et Apoptose.....	186

7. Pourquoi les souris BALB/c déficientes pour CD47 ne développent-elles pas de maladies auto-immunes ou inflammatoires spontanément ?.....	188
7.1. Rôle de l'IFN- γ	188
7.2. Rôle de l'IL-10.....	189
7.3. Rôle de l'oxyde nitrique (NO)	190
7.4. Rôle des cellules Th1 et Th17 dans l'auto-immunité spécifique d'organe.....	192
7.5. Rôle des cellules Th1 et Th17 dans l'auto-immunité systémique.....	194
8. Perspectives.....	195
A. Étudier le rôle de CD47 sur le lymphocyte CD4 ⁺ dans un modèle infectieux.....	195
B. Étudier dans un modèle expérimentale de myocardite auto-immune le rôle de CD47 et CD28 dans la dynamique Th1/Th17.....	197
C. Rôle de CD47 et de CD28 sur les cellules T CD8 ⁺	198
D. D'autres études peuvent également être entreprises telles que.....	199
9. Conclusions générales.....	200
Bibliographie.....	201

Liste des tableaux

Tableau 1. Études montrant la génération en dehors du thymus de cellules T régulatrices CD4 ⁺ CD25 ⁺ à partir de cellules T non régulatrices CD4 ⁺ CD25 ⁻	22
Tableau 2. Liste des séquences des différents domaines de la TSP-1 ayant des fonctions connues.....	39

Liste des figures

Figure 1. Cytokines et facteurs de transcription régulant la différenciation Th1 et Th2.....	3
Figure 2. Rôle de Notch dans la différenciation Th1 et Th2.....	7
Figure 3. Cytokines et facteurs de transcription régulant la différenciation des cellules iTreg Foxp3 ⁺ et Th17 chez la souris.....	13
Figure 4. Ontogenèse des cellules T régulatrices dans le thymus et en périphérie.....	21
Figure 5. Cytokines et facteurs de transcription régulant la différenciation des cellules T CD4 ⁺	28
Figure 6. Statut épigénétique des gènes des facteurs de transcription clé de la différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺	30
Figure 7. Structure de la molécule CD47 associée à ses différents ligands en <i>cis</i> et à la protéine G intracytoplasmique.....	33
Figure 8. Structure schématique de la thrombospondine-1 et 2.....	36
Figure 9. Structure schématique de SIRP-a et SIRP-g associé à CD47.....	42
Figure 10. Rôle de CD47 et de ces ligands dans le maintien de l'homéostasie.....	196

Figures Article I.

Figure 1. Induction of T anergic/suppressor cells Tas by CD47/TSP interactions.....	78
Figure 2. Contact-dependent but TGF- β -independent Tas regulatory function and role of IL-2.....	80
Figure 3. Activated phenotype of Tas and expression of <i>Foxp3</i>	82
Figure 4. Ligation of TSP receptor directly converts CD4 ⁺ CD25 ⁻ naive and memory T cells into <i>Foxp3</i> ⁺ regulatory T cells.....	85

Figures Article II.

Figure 1. CD47 on T cells negatively regulates Th1 development <i>in vitro</i>	116
Figure 2. CD47 deficiency favors Th1 differentiation <i>in-vivo</i>	118

Figure 3. Impact of CD47-deficient environment on <i>in vivo</i> CD4 ⁺ Tg T cell responses.....	120
Figure 4. CD47 deficiency on DC and T cells enhances IL-12, IFN- γ and T-bet expression.....	122
Figure 5. Absence of CD47 on CD4 ⁺ T cells favours Th1 polarization <i>in vivo</i>	124
Figure 6. Th1-biased antibody profile in CD47 ^{-/-} mice.....	126
Figure 7. Enhanced Ag-specific Th1 responses with no B cell-intrinsic defect in non transgenic CD47 ^{-/-} mice.....	128
Figure 8. Exacerbated DNFB-induced CHS response in CD47 ^{-/-} mice.....	130

Figures Article III.

Figure 1. CD28 co-stimulation inhibits <i>in vitro</i> generation of IL-17 producing CD4 ⁺ T cells.....	155
Figure 2. CD28 co-stimulation did not modulate memory Th17 cells.....	157
Figure 3. TCR avidity and CD28 co-stimulation signals regulate Th17 development.....	159
Figure 4. The CD28-driven inhibition of Th17 differentiation is mediated by IL- 2 and IFN- γ production.....	161
Figure 5. Inhibition of Th17 differentiation by anti-CD28 mAb is not correlated with a expansion of Foxp3 ⁺ T cells.....	163
Figure 6. Mature BMDC inefficiently support Th17 differentiation.....	165
Figure 7. CTLA4-Ig favours Th17 development.....	167

Liste des Abréviations

ADN : Acide desoxyribonucléique

AR : Arthrite rhumatoïde

mAc : Anticorps monoclonal

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

DC : Clusters of Differentiation

DCs: Cellules dendritiques

DID : Diabète insulino dépendant

EAE: Encéphalite auto-immune expérimentale

HA : Haemaglutinine

IL : Interleukine

Ig : Immunoglobuline

iTreg : Lymphocyte T régulateur induit ou adaptatif

ND : Non déterminé

NK : Natural Killer

nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel

OVA : Ovalbumine

RAG : Recombination-activating gene

STAT: Signal transducer and activator of transcription

TCR : T-cell receptor

TLR : Toll like receptor

À mes Parents,

À Dania,

À Madjid,

À mes Amis,

À ma Famille,

À Na-Baya,

À Rahima,

Remerciements

À mon Directeur de Recherche Madame la Dre Marika Sarfati, j'ai eu l'honneur et le privilège d'effectuer mon doctorat dans votre laboratoire. Votre grande disponibilité, vos encouragements, votre encadrement scientifique rigoureux et stimulant, votre enthousiasme communicatif, ainsi que votre soutien permanent, ont été déterminants dans mon cheminement. Je ne saurais vous témoigner ma profonde gratitude et mes sincères remerciements qu'en essayant de prendre exemple sur vous.

À mon Co-Directeur de Recherche Monsieur le Dr Guy Delespesse, je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et accordé votre confiance. Vos conseils, votre écoute, vos encouragements et votre aide continue ainsi que votre générosité m'ont été d'un très précieux soutien tout au long de ces années et m'ont particulièrement touché. Qu'il me soit permis de vous témoigner ma profonde reconnaissance et mes plus vifs remerciements.

Mes sincères remerciements aux Drs Naglaa Shoukry, Élie Haddad, Giovanni John Di Battista et Claude Perreault qui ont accepté avec beaucoup de bienveillance de juger mon travail.

À Monsieur Manuel Rubio, je vous remercie pour l'excellente et très précieuse aide technique que vous m'avez apportée dès le début, ainsi que pour vos encouragements et soutiens tout au long de mon séjour au laboratoire.

A Madame Norma Del Bosco, tout mes remerciements pour votre aide et votre grande disponibilité.

A l'ensemble de mes collègues avec qui j'ai partagé la vie du laboratoire, un grand merci à : Nobuyasu Baba, Marianne Raymond, Vu Quang Van, Zoulfia Allakhverdi, Julie Martel, Geneviève Fortin, Patrick Gautier-Ethier, Jinane Darwiche, Annie Boisvert, Sylvie

Lesage, Claudine Beauchamp, Keiko Wakahara, Martin Levesque, Philippe Grimbert, Sébastien Nguyen.

Tous mes remerciements aux Drs Nathalie Arbour et Yve Raymond pour l'intérêt que vous m'avez témoigné.

À mes collègues du Centre de Recherche de l'Hôpital Notre-Dame, un grand merci à : Hania Kebir, Igal Ifergan, Mike Sabbagh, Romain Cayrol,

Mes plus sincères remerciements à l'ensemble du personnel du Service des Animaleries du Centre de Recherche du CHUM de l'Hôpital Notre-Dame pour leur aide et disponibilité.

Tout mes remerciements à la Faculté des Études Supérieures, au Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal et aux Instituts de Recherche en Santé du Canada pour les bourses de recherche que j'ai eu l'honneur et le privilège de recevoir.

Je tiens à exprimer mes remerciements à mes Maîtres de la Faculté de Médecine d'Alger, les professeurs Kamel Bouzid, Safia Khaled et Dhakya Mohammedi pour l'intérêt constant que vous avez porté à mon travail.

Ma profonde gratitude à mon ami Madjid et à ses parents pour leur générosité, leur aide, leur soutien et encouragements constants.

Je tiens à remercier également tout mes amis, Malik, Hakim, Baya, Najy, Lydia, Tarik, Mourad, Linda, pour leur inestimable soutien et leurs encouragements.

Ma profonde gratitude à mes parents, pour leur amour, leur grand dévouement, leur soutien, leurs encouragements et leur présence continue.

Ma profonde reconnaissance à ma sœur Dania pour son immense générosité, ses encouragements et sa très précieuse aide.

Je voudrais également remercier l'ensemble de ma Famille pour son soutien.

Avant propos

Ma contribution aux trois articles inclus dans ma thèse est indiquée de la manière suivante.

Pour le premier article, j'ai réalisé les expériences relatives à l'induction des cellules T régulatrices suppressives à partir de cellules T $CD4^+CD25^-$ mémoires représentées par la figure 4. J'ai également participé aux expériences réalisées à partir de cellules T $CD4^+CD25^-$ naïves en isolant les cellules T $CD4^+CD25^-$ naïves à partir du sang d'adulte et de cordon représentées par la figure 1 et au phénotypage cellulaire de la figure 3.

Quant au second article, j'ai réalisé les expériences *in vivo* de transfert adoptif et les expériences *in-vitro* représentées par les figures 1 (B) 2, 3, 4 (A, C, D) et 5. J'ai également participé à l'expérience illustré par la figure 8. J'ai aussi contribué à la rédaction de l'article.

Pour le troisième article, j'ai réalisé les expériences *in vitro* représentées par les figures 1 (A, B, C), 2, 3, 4, 5, 6 (B, C, D, E) et 7 (A, B). J'ai aussi contribué à la rédaction de l'article.

"Le soleil, en déclinant, étire l'ombre des arbres. Le vent, pareil à un chat sagace, joue avec des papiers et des feuilles mortes qu'il fait tournoyer sur place. Des ombres passent : les gens ont acquis une manière de se faufiler au lieu de marcher. Boualem Yekker a, depuis maintenant plus d'une année, le sentiment de vivre dans un espace et un temps anonyme, irréel et provisoire, où ni les heures, ni les saisons, ni les lieux ne possèdent la moindre caractéristique propre ou la moindre importance. C'est comme si on vivait une vie en blanc en attendant que les choses reprennent leurs poids, leurs couleurs et leur saveur. C'est comme si le monde avait renoncé à son apparence, à ses attributs, à ses différentes fonctions, déguisé le temps d'un carnaval".

Tahar Djaout Le Dernier Été de la raison 1999

Introduction

1. L'immunité adaptative et sa régulation

1.1. Le paradigme Th1/TH2

1.1.1. Description des Cellules Th1 et Th2

En réponse à une stimulation antigénique, les cellules T CD4⁺ naïves prolifèrent et se différencient en cellules T effectrices, qui se distinguent par leur production de cytokines et leurs fonctions. Au début des années 80, à la faveur du développement des techniques de clonage des lymphocytes T, Tim Mosmann et Bob Coffman proposèrent un modèle de différenciation des cellules T CD4⁺, qui permettait de relier l'ancienne dichotomie de la réponse immunitaire induite à médiation cellulaire et humorale, à la fonction des effecteurs T CD4⁺ (1). Ces travaux initiaux, et de nombreux autres ont permis par la suite de classer les cellules T effectrices en deux catégories: les cellules Th1 (T helper) et Th2, qui sont issues d'une différenciation de précurseurs T CD4⁺ naïfs (2, 3). Les cellules Th1 produisent principalement l'IFN- γ (Interferon- γ), la LT- α (Lymphotoxine- α) et l'IL-2 (Interleukine-2), alors que les cellules Th2 sécrètent essentiellement les cytokines suivantes: l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-25 (4, 5). Les cellules Th1 sont responsables de la réponse immune contre les pathogènes intracellulaires, particulièrement les infections à *Listeria monocytogenes* et *Leishmania majore*, et induisent une hypersensibilité retardée. Une réponse Th1 anormale spécifique d'antigènes du «soi» se traduirait par des pathologies auto-immunes, telles que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), le diabète auto-immun de type 1 (DID) ou l'arthrite rhumatoïde (AR). Cependant, ce concept est aujourd'hui révisé à la suite de la découverte des cellules Th17 et du rôle de l'IL-23, comme nous l'aborderons plus loin. L'IFN- γ active les fonctions bactéricides des macrophages. L'IL-2 est

importante pour l'induction de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ mémoires. Inversement, les cellules Th2 sont efficaces vis à vis des parasites extracellulaires, incluant les helminthes, et sont responsables de l'induction et de la persistance de l'asthme et des autres maladies allergiques. L'IL-4 favorise la commutation isotypique et la production d'IgE, IgG1 par les lymphocytes B (6).

1.1.2. Régulation de la différenciation Th1

À la suite de l'activation des cellules dendritiques, soit par au moins deux différents TLRs (Toll like receptor, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR11), un TLR en présence d'IFN de type 1, ou bien encore par l'IFN- γ et l'engagement de CD40L, ces cellules produisent de l'IL-12, initient la différenciation Th1 et activent les cellules NK (7, 8). Le développement Th1 est déclenché par le facteur de transcription STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1), qui est activé en réponse à l'IFN- γ et l'IL-27 que produisent les cellules NK activées en présence d'IL-12, et les DCs matures respectivement (9). STAT1 associé aux facteurs de transcription induit par l'engagement du TCR entraîne la synthèse du facteur de transcription T-bet (T-box expressed in T cells), régulateur majeur de la différenciation Th1 (Fig. 1) (10). Les souris T-bet-déficientes sont incapables de lutter efficacement contre les infections nécessitant une réponse de type Th1, et leurs cellules Th présentent un défaut de production d'IFN- γ après stimulation antigénique en présence d'IL-12 *in vitro* (11) et développent spontanément un asthme expérimental (12).

Différenciation Th1

Différenciation Th2

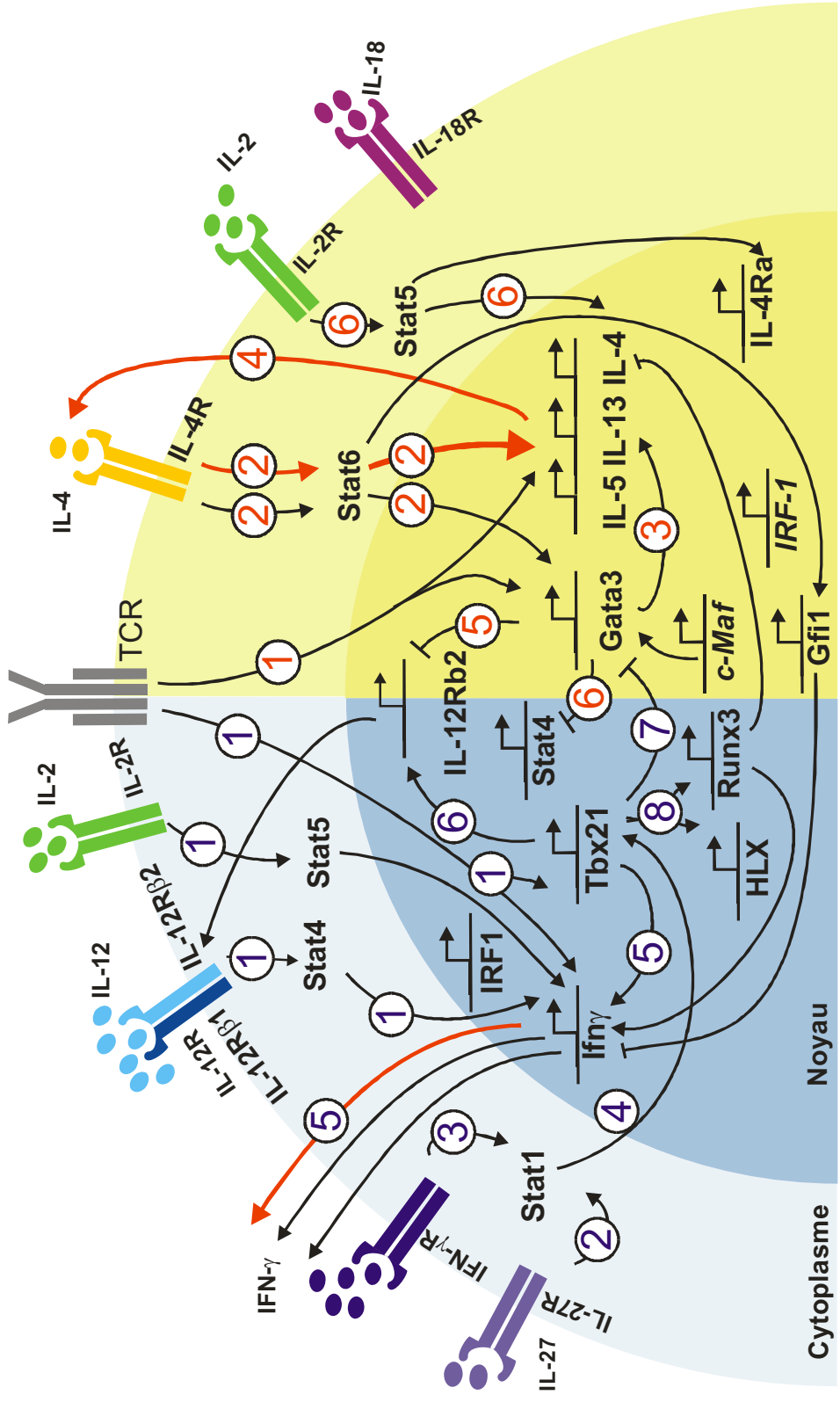


Figure 1. Cytokines et facteurs de transcription régulant la différenciation Th1 et Th2
 Adapté de Amsen D. *et al* in *Curent Opinion in Immunology*, vol 21, Issue 2, April 2009,153-160.

T-bet à son tour induit la production d'IFN- γ , l'activation des facteurs de transcriptions HLX (H2.0-like homeobox), Runx3 (Runt-related transcription factor 3) et s'oppose à l'effet inhibiteur de GATA3 (GATA-binding protein 3) sur la différenciation Th1 (13-18). T-bet entraîne également l'expression par les cellules T de l'IL-12R β 2 (IL-12 receptor- β 2), qui se lie à l'IL-12R β 1 pour former le récepteur de l'IL-12 (Fig. 1) (19).

L'IL-12 produite par les cellules dendritiques matures favorisera ensuite le développement des cellules T, exprimant fortement l'IL-12R β 2 et T-bet, et induira la synthèse du facteur de transcription STAT4 (20). L'IL-12R β 1, normalement présent sur les cellules T CD4⁺ naïves, est surexprimé par les cellules Th1 et dépend du facteur de transcription IRF1 (21). STAT4 soutient la production d'IFN- γ et maintient l'expression de l'IL-12R β 2 (22-24), établissant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive en stimulant l'expression de STAT1 et de T-bet, qui se traduit par une synthèse plus importante d'IFN- γ (Fig. 1) (16, 24-27).

Une étude récente montre que l'IFN- γ n'est nécessaire pour la synthèse de T-bet qu'au cours des 48 premières heures de la différenciation Th1, synthèse qui dépendra par la suite que de l'IL-12 (28). Par ailleurs, T-bet et Runx3 répriment la production d'IL-4 et la différenciation Th2 (13, 15). Un autre facteur de transcription de la famille T-box, l'Eomesodermin (Eomes), important pour la production d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺, est également surexprimé pendant la différenciation des cellules CD4⁺ en cellules Th1 (29). En effet, le traitement des cellules Th1 par l'IL-21 inhibe partiellement la synthèse d'IFN- γ via la suppression d'Eomes, et non de T-bet (30). L'IL-18R α est également surexprimé à un stade tardif de la différenciation Th1 à la suite de l'activation de la voie IL-12/STAT4, et est soutenue par l'IFN- γ (31, 32). Ensemble, l'IL-12 et l'IL-18 favorisent la production d'IFN- γ par les cellules Th1 en l'absence d'engagement du TCR (33). Cette

production de cytokine antigène-indépendante peut-être impliquée dans le recrutement de cellules Th1 préexistantes amplifiant ainsi la réponse Th1.

D'autres études ont impliqué la voie de Notch dans la différenciation Th1 (Fig. 2) (34). L'expression de la molécule DLLs (Delta-like ligands) par les APC suite à une stimulation par des produits microbiens, leur attribue la capacité d'induire la différenciation Th1 en engageant Notch3 à la surface de la cellule T CD4⁺. Notch3, en s'associant avec la protéine RBPJ (DNA-binding factor recombination-signal-binding protein for immunoglobulin-κ J region) et d'autres coactivateur tel MAML1 (Mastermind-like 1), peut alors directement activer la synthèse du facteur de transcription T-bet (35, 36). Un autre mécanisme fait appel à la voie NF-κB (37). L'inhibition par Notch du développement Th2 constitue également un moyen indirect d'induire la différenciation Th1 (38).

1.1.3. Régulation de la différenciation Th2

La différenciation Th2 est initiée à la suite de l'engagement du TCR des cellules T CD4⁺, qui se traduit par la production de faible taux d'IL-4, qui induit l'expression de GATA-3 par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription STAT6 (39-41) et de l'activation de STAT5 par l'IL-2 (Fig. 1) (3, 42). GATA3 est un facteur de transcription clé du développement des cellules Th2, dont une des importantes fonctions est le remodelage de la structure de la chromatine en regard du locus des cytokines de type Th2, qui comprend les gènes de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, et l'activation directe de l'expression des gènes de l'IL-5 et l'IL-13 (43-46), permettant ainsi à d'autres facteurs de transcription impliqués dans le développement Th2 d'interagir (3, 47). L'auto-activation de l'expression de GATA3 et l'activation autocrine et paracrine de STAT6 par l'IL-4,

gènèrent une boucle de rétrocontrôle positif et l'inhibition par STAT6 et GATA3, de l'expression de l'IFN- γ et de la différenciation Th1, stabilisant ainsi le lignage Th2 (Fig. 1) (3, 48). L'inactivation conditionnelle de GATA-3 dans les cellules T CD4⁺ entraîne un défaut de différenciation Th2 *in vitro* et *in vivo* (49, 50). La source de l'IL-4 au départ, qui initie la boucle de rétrocontrôle positive dépendante de STAT6 au cours de la réponse Th2, pourrait provenir de cellules T mémoires CD4⁺CD44⁺, de cellules CD4⁺ naïves ou de cellules de l'immunité innée, tels que les basophiles (51-53). Les cellules STAT6-déficientes sont incapables de produire de l'IL-4 *in vitro*, alors qu'*in vivo*, une réponse Th2 indépendante de l'activation de STAT6, bien que moins efficace, est malgré tout possible (54-56).

Aussi, Il existe une voie alternative de la différenciation Th2 indépendante de STAT6 et passant par la voie d'activation de Notch (Fig. 2) (57, 58). Une autre voie de développement Th2 indépendante de STAT6 repose sur l'activation de la voie de l'IL-2/IL-2R-STAT5A et induit directement la synthèse d'IL-4, sachant que celui-ci possède un site de liaison au locus de l'IL-4 (42, 59, 60). Les cellules déficientes pour STAT5A sont incapables de se différencier en cellules Th2 *in vitro* et *in vivo*, malgré l'activation de STAT5B (42, 60). L'IL-4 et l'IL-2 sont indispensables à la différenciation des cellules Th2 *in vitro* (60, 61).

La voie de signalisation IL-4/STAT6 aboutit également à l'expression transitoire de Gfi-1 (Growth factor independent-1), un répresseur de transcription qui favorise la croissance des cellules exprimant fortement GATA-3, assurant ainsi un développement Th2 préférentiel (62, 63). Le facteur de transcription c-Maf (Cellular muscular aponeurotic fibrosarcoma) joue également un rôle dans l'expression de l'IL-4 (64, 65).

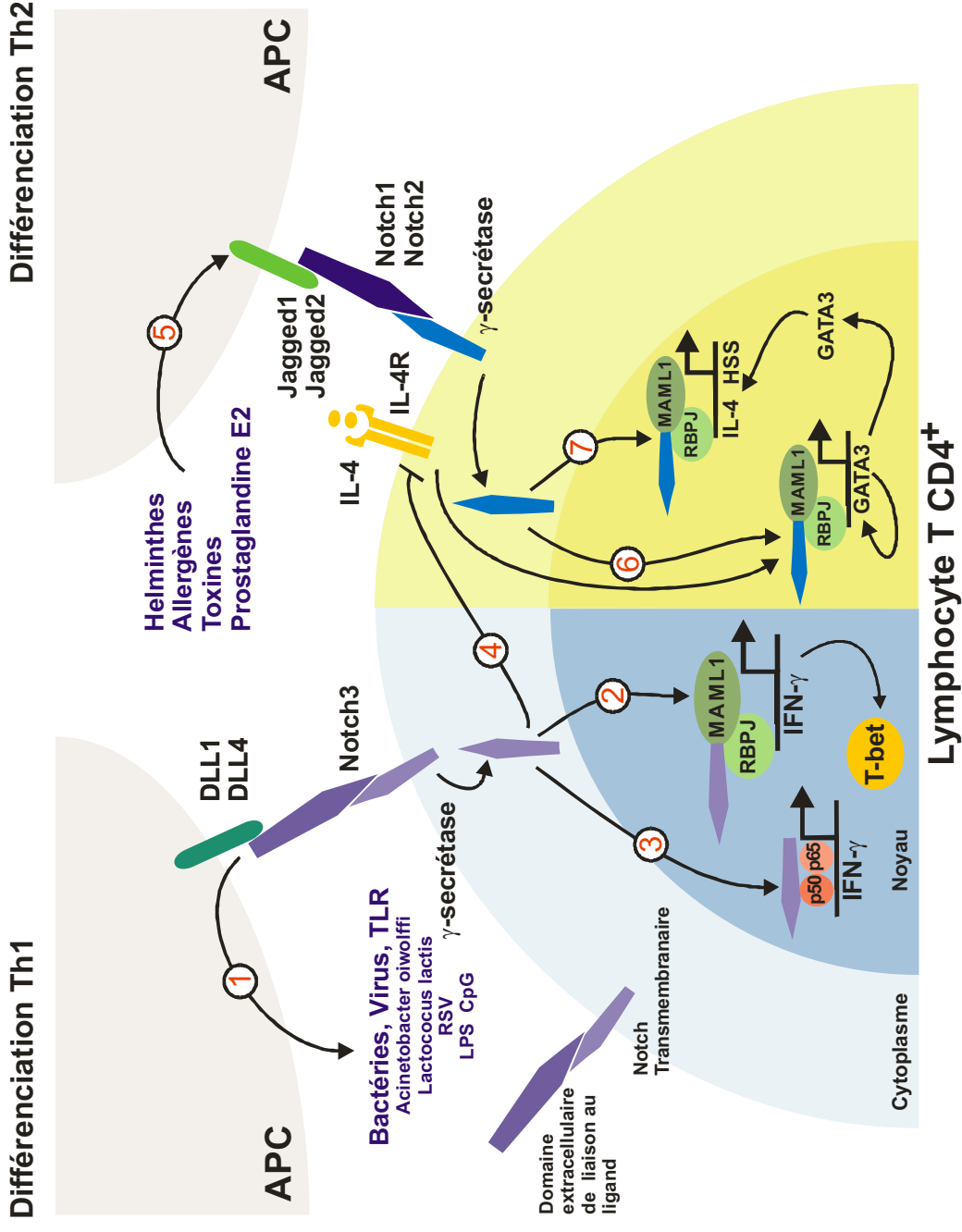


Figure 2. Le Rôle de Notch dans la différenciation Th1 et Th2
Adapté de Amsen D. et al in Nature reviews Immunology, Issue 9, February 2009, 116-124.

L'expression de l'IRF-4 est aussi essentielle au développement Th2. Les cellules IRF-4-déficientes produisent beaucoup moins d'IL-4, insuffisance qui peut être remédiée par la surexpression de GATA-3, suggérant qu'IRF-4 régule positivement l'expression de GATA-3 (66, 67).

1.2. La réponse Th17

1.2.1. Contradictions du paradigme Th1/Th2 et découverte des cellules Th17

Traditionnellement, le développement de pathologies inflammatoires et auto-immunes, telles que la sclérose en plaque, le diabète auto-immun de type-1 (DID), le psoriasis ou l'arthrite rhumatoïde (AR) et leurs modèles expérimentaux relatifs, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), et l'arthrite à adjuvant, était considéré comme associé à une activation incontrôlée, quasi exclusive d'effecteurs Th1 spécifiques d'antigènes du «*soi*». Cependant, le paradigme Th1/Th2 s'avérait insuffisant pour expliquer certains paradoxes (68). En effet, des souris déficientes pour l'IFN- γ , le récepteur de l'IFN- γ ou le facteur de transcription STAT1, essentiels à la différenciation Th1, sont susceptibles à l'EAE, voire développent une forme plus sévère de la maladie (69-73). De même que l'administration d'anticorps neutralisants anti-IFN- γ rendait des souris préalablement résistantes à l'EAE, susceptibles de développer des formes sévères de la maladie (74), alors que l'administration d'IFN- γ améliore les manifestations cliniques dans des modèles expérimentaux établis d'EAE et d'arthrite à adjuvant (75, 76). Toutefois, les souris IL-12-déficientes après l'ablation génique de la chaîne IL-12p40 sont résistantes à ces pathologies auto-immunes (77, 78). Par ailleurs, contrairement à l'inactivation du gène codant pour l'IL-12p40, les souris déficientes pour la chaîne IL-

IL-12p35 ayant une perte d'expression de l'IL-12 et un défaut de différenciation Th1 ainsi que les souris déficientes pour l'IL-12R β 2, développent une EAE (79).

L'identification de l'IL-23 et des cellules T productrices d'IL-17 allait résoudre certains de ces paradoxes (80). L'IL-23 fait partie de la famille des cytokines hétérodimériques IL-6/IL-12. Elle est constituée de la chaîne p19, homologue à la chaîne IL-12p35, et de la chaîne p40, qu'elle partage avec l'IL-12 (80, 81). Ainsi, les souris invalidées pour la chaîne IL-12p40, résistantes à l'EAE sont déficientes à la fois pour l'IL-12 et l'IL-23, alors que l'inactivation de la chaîne IL-12p35, qui est associée à une susceptibilité accrue à l'EAE, induit uniquement la perte d'IL-12 (77, 82).

Ces observations suggéraient donc un rôle essentiel de l'IL-23 et non de l'IL-12 dans le développement de l'EAE, rôle qui fut confirmé par la démonstration que des souris invalidées pour la chaîne IL-23p19 sont résistantes au développement de l'EAE et de l'arthrite induite par l'injection de collagène (83, 84), de même qu'était établie la relation entre l'IL-23 et la production d'IL-17 par des cellules T CD4⁺ effectrices ou mémoires (85, 86). En accord avec l'observation que des souris déficientes pour l'IL-17 étaient résistantes à l'EAE et à l'arthrite expérimentale, ces différents résultats démontraient que l'IL-23 induisait ces pathologies inflammatoires et auto-immunes en favorisant le développement d'une nouvelle classe de cellules Th productrices d'IL-17 (87-89).

L'IL-17A, dont le récepteur (IL-17RA) est exprimé par les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes, est une cytokine pro-inflammatoire qui induit la production de cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1 β) et de chimiokines (CXCL8, CXCL1, CXCL10) permettant ainsi le recrutement et la maturation de cellules de l'immunité innée dont les polynucléaires neutrophiles (90, 91). Les souris déficientes pour

l'IL-17A ou l'IL-17RA sont susceptibles aux infections à *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* (92, 93). Les cytokines IL-17F et IL-22 sont également impliquées dans le contrôle des infections à *Klebsiella pneumoniae* et *Citrobacter rodentium* (94, 95).

1.2.2. Régulation de la différenciation Th17 chez la souris

Le TGF- β (Transforming growth factor β), l'IL-6 et l'IL-21, une cytokine de la famille de l'IL-2, sont les cytokines clés mises en évidence dans l'initiation de la différenciation Th17 (Fig. 3) (96-99). Le TGF- β est également important pour la génération des cellules T régulatrices. Cependant, en présence de signaux inflammatoires tels que l'IL-6 ou l'IL-21, le TGF- β est capable d'induire la polarisation de cellules Th17 (96). Le modèle actuel propose que l'IL-6 induise l'expression de l'IL-21 qui, de manière autocrine, favorise sa propre expression ainsi que celle du récepteur de l'IL-23 par les cellules T CD4⁺ naïves, suivant une logique similaire au développement Th1 et Th2 avec l'IFN- γ et l'IL-4 respectivement (Fig. 3) (100-102).

En accord avec le fait que l'IL-23R n'est pas exprimé par les cellules Th naïves mais par les cellules mémoires, l'IL-23 n'est pas essentielle à l'initiation de la différenciation Th17, par contre elle est requise pour son amplification, sa différenciation terminale, ainsi que la migration des cellules Th17 vers les ganglions lymphatiques, et contribue à la pathogénicité de ces cellules en inhibant la sécrétion d'IL-10 (103-105).

Aussi bien, les facteurs de transcriptions de la lignée Th1 que sont T-bet, STAT1 et STAT4, que ceux de la lignée Th2 tels que GATA-3, et STAT6, ne sont pas requis pour la différenciation Th17. (87, 88). De la même façon que les cellules Th1 et Th2 s'inhibent mutuellement dans leur développement de par la sécrétion de leurs principales cytokines, telles que l'IFN- γ et l'IL-4 respectivement (106). Le développement des cellules Th17 est

inhibé par les cytokines Th1 (IFN- γ ; IL-27), par les cytokines qui activent STAT1, et par les cytokines Th2 (IL-4; IL-25) (87, 88, 107-111). Le TGF- β , qui est fondamental à la différenciation Th17, supprime le développement Th1 et Th2 par le biais de l'inhibition de T-bet, STAT4 et GATA3 respectivement (112-114).

ROR γ t représente le facteur de transcription clé de la différenciation Th17 (Fig. 3) (81, 115-117). Son expression est induite dans des conditions optimales de différenciation Th17, alors que les cellules ROR γ t-déficientes produisent très peu d'IL-17. Le facteur de transcription ROR α est également exprimé par les cellules Th17 (118). De plus, les souris n'exprimant plus ROR γ t dans les cellules T sont protégées partiellement du développement d'EAE. Néanmoins, l'inactivation du gène de ROR α a une incidence minime sur la production d'IL-17, alors que celle-ci est totalement abolie chez les cellules déficientes en ROR γ t et ROR α (118).

L'IL-6, par l'intermédiaire du facteur de transcription STAT3, induit la synthèse de l'IL-21, l'IL-23 et également l'expression du récepteur de l'IL-23R (101, 102, 119, 120). Ce facteur est requis pour la différenciation *in vitro* et *in vivo* des cellules Th naïves en cellules Th17 et le développement d'EAE (119, 121, 122). L'IL-21 induit, par le biais de STAT3 en partie, l'expression de ROR γ t et ROR α (115, 123).

Le facteur de transcription AHR (Aryl hydrocarbon receptor) a également récemment été impliqué dans la genèse des cellules Th17 (124-126). Le facteur de transcription IRF4 (Interferon-regulatory factor 4), qui est essentiel au développement des cellules Th2, induit également la différenciation des cellules Th17 (127). Ainsi, l'expression de ROR γ t est fortement diminuée dans les cellules T CD4⁺ *Irf4*^{-/-} et les souris *Irf4*^{-/-} sont totalement protégées de l'EAE (127). Une étude récente montre que l'IL-1

régule l'expression de l'IRF4 et de ROR γ t, et est requise au début de la différenciation Th17 *in vitro* et *in vivo* (128).

La différenciation Th17 est aussi inhibée par l'IL-2 via STAT5 et Est-1 semble requis (129-131). Ainsi, les souris Est-1-déficientes sont résistantes à l'inhibition de la sécrétion de l'IL-17 par l'IL-2 (131). L'IL-10, dont la production est également induite par le TGF- β et l'IL-6, contrôle négativement en retour la production d'IL-17 (103). Le facteur de transcription Foxp3 inhibe la polarisation Th17 en se liant à ROR γ t et ROR α , bloquant ainsi leur activité transcriptionnelle (132, 133). Par ailleurs, le facteur de transcription Gfi1 (Growth factor independent 1) inhibe également la génération de cellules Th17 en bloquant l'activation du promoteur du gène de *IL17* par ROR γ t (134).

1.2.3. Régulation de la différenciation Th17 chez l'homme

Les cellules Th17 humaines ont été pour la première fois identifiées à partir du sang périphérique et de l'intestin de personnes saines et de patients atteints de la maladie de Crohn (135). Les personnes ayant un syndrome d'hyperimmunoglobuline E, une affection autosomale dominante caractérisée par une mutation du gène codant pour STAT3, présentent un défaut de la différenciation Th17 associé à des infections récurrentes de la peau et des poumons (136, 137).

Différenciation Th17 Souris

Différenciation iTreg Souris

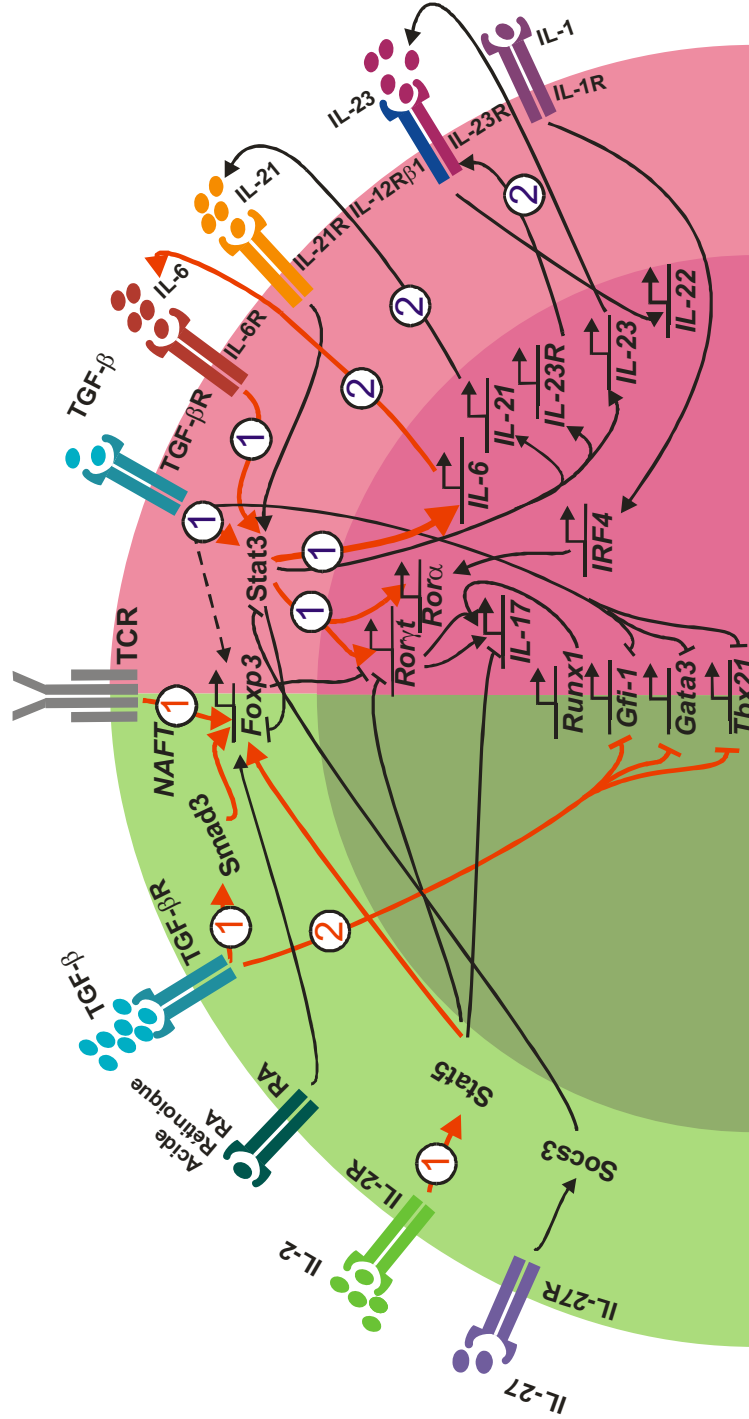


Figure 3. Cytokines et facteurs de transcription régulant la différenciation des cellules iTreg Foxp3⁺ et Th17 chez la souris. En présence de TGF-β, les cellules T CD4⁺ dont le TCR est activé expriment les deux facteurs de transcription RORγ et Foxp3, mais la fonction de RORγ est bloquée par Foxp3. Ces cellules peuvent se différencier aussi bien en iTreg ou en Th17. En présence d'IL-6 ou d'IL-21 et de faibles concentrations de TGF-β, RORγ et Stat3 sont exprimés alors que l'expression et la fonction de Foxp3 est inhibée. L'IL-6 induit l'expression de l'IL-21, de l'IL-23 et de l'IL-23R. L'activation du TCR et l'IL-1 induisent l'expression d'IRF4 qui renforce l'expression de RORγ et inhibe Foxp3. L'IL-2, l'IL-25, l'IL-4 et l'IFN-γ inhibent l'expression de RORγ. AhR inhibe l'expression de Foxp3. Cependant, en absence de cytokines proinflammatoires, une forte concentration de TGF-β favorise l'expression de Foxp3 qui inhibe l'activité de RORγ (et RORα) induisant des iTreg.

Si les études à ce jour s'accordent à dire que le TGF- β et l'IL-6 combinés ne permettent pas le développement des Th17 chez l'homme, les conditions précisent qui président à la régulation de la différenciation des cellules Th17 chez l'humain demeurent controversées (123, 138-143). À la lumière de l'ensemble des travaux qui ont analysé l'implication des différentes cytokines dans le développement des cellules Th17 chez l'homme, l'IL-23 et l'IL-1 β sont les cytokines critiques qui ressortent le plus souvent, alors que le rôle défini du TGF- β dans ce processus demeure imprécisément compris et toujours sujet à débat. Les premiers travaux montraient que la différenciation de cellules Th naïves humaines en effecteurs Th17 pouvait être induite par l'IL-23 ou l'IL-1 β sans l'addition de TGF- β , et que l'IL-6, en permettant une expression soutenue de RORC (orthologue de ROR γ t chez l'Homme) indispensable à la différenciation Th17, potentialiserait l'effet de l'IL-1 β (138, 144). Toutefois, d'autres études montraient que l'IL-1 β induisait la production de l'IL-17, préférentiellement par les cellules T mémoires et non par les cellules T naïves, remettant en cause le rôle majeure de l'IL-1 β dans la différenciation Th17 (141). Tandis que, d'autres travaux utilisant des lymphocytes T naïfs purifiés à partir de sang de cordon ombilical, ont montré que le TGF- β est essentiel à la différenciation de cellules Th17 chez l'homme (123, 140, 142). Ces divergences, quant au rôle du TGF- β , peuvent sans doute s'expliquer par une différence de pureté des cellules T naïves obtenues, sachant qu'une faible contamination avec des cellules effectrices mémoires peut, soit représenter une source détectable d'IL-17, soit supprimer *de novo* la différenciation Th17 et que le TGF- β inhiberait le développement des cellules T effectrices Th1 (145).

De même qu'au cours des premières études la concentration de TGF- β ajoutée ou présente dans les cultures cellulaires était plus élevée que celle nécessaire à la

différenciation Th17. De plus, l'IL-23 et l'IL-6 jouent également un rôle positif dans cette différenciation de la même façon que chez la souris. Comme chez la souris, l'IL-12 ou l'IL-4 réprime la différenciation Th17. Nonobstant les différences dans les cytokines nécessaires à la génération des Th17 chez l'homme et la souris, ces cellules expriment les mêmes cytokines IL-17A, IL-17F, IL-22 et IL-21, et récepteurs membranaires IL-23R et CCR6 (146, 147).

1.3. Les lymphocytes T régulateurs

1.3.1. Découverte des lymphocytes T régulateurs (Treg)

Le concept de lymphocytes T régulateurs, initialement dénommés suppresseurs, a émergé voici près de 40 ans, mais ce n'est qu'en 1995 qu'ont décrit chez la souris une population lymphocytaire T $CD4^+CD25^+$, pourvue de propriétés suppressives *in vitro* et *in vivo* (148, 149). Cette population empêche l'apparition d'une maladie auto-immune lorsqu'elle est transférée à des souris athymiques reconstituées avec des lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ (150). Différentes populations de lymphocytes T régulateurs ont été identifiées, qui partagent la propriété de moduler la réponse immune. Leur ontogénie permet de distinguer d'abord les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg), générés dans le thymus, et exprimant spontanément la molécule CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2, qui n'est exprimée sur les lymphocytes T effecteurs qu'après leur activation) (151, 152). Les Treg induits ou «adaptatifs» (iTreg) sont générés par diverses stimulations du système immunitaire en périphérie (indépendamment du thymus) : les lymphocytes T $CD4^+CD25^+$, les lymphocytes Tr1 et les lymphocytes Th3 (Fig. 4) (151).

1.3.2. Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) générés dans le thymus

Les lymphocytes T régulateurs naturels représentent 1 à 10 % du total des cellules T CD4⁺ dans le thymus, le sang et le tissu lymphoïde et acquièrent leur fonction régulatrice durant leur développement thymique (Fig. 4) (153). La thymectomie néonatale entre 2 et 4 jours entraîne des désordres auto-immuns profonds chez les souris. Ces cellules préviennent l'apparition d'une réponse auto-immune, de même qu'elles sont anergiques, leur prolifération et leur production de cytokines est faible suite à une stimulation antigénique. Les nTreg expriment également à leur surface les molécules CTLA4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), le récepteur GITR (Glucocorticoïde-induced TNF receptor family-related gene), le TGF- β membranaire, le marqueur LAG-3, la neuropiline-1, l'intégrine CD103 et CD127 (153). Le granzyme A serait également exprimé avec une capacité de cytotoxicité via la perforine contre des cellules autologues. Les nTreg expriment sélectivement les récepteurs Toll-like TLR-4, TLR-5, TLR-7 et TLR-8, et le LPS entraîne leur prolifération ainsi que leur activité suppressive. Ils expriment spécifiquement le facteur de transcription Foxp3, élément clé de la différenciation des Treg. De nombreuses études ont démontré que les nTreg sont générés dans le thymus à la suite de l'interaction de forte avidité entre le CMH de classe II et le TCR (153). Le rôle du TGF- β dans le développement des nTreg n'est pas encore parfaitement connu. Certaines études utilisant des cellules T déficientes pour le TGF- β RII n'indiquent pas de défaillance dans le développement des nTreg, alors que d'autres, basées sur une délétion conditionnelle du TGF- β RI au cours de la période postnatale se traduisent par un défaut de développement des nTreg (154-156). Certaines études, réalisées avec des souris IL-2- et IL2R-déficientes concluaient que l'IL-2 n'était pas indispensable pour la

genèse dans le thymus des cellules nTreg Foxp3⁺ (157-160). Cependant, d'autres publications ainsi que des travaux plus récents montrent le rôle essentiel de l'IL-2 et proposent un modèle de la différenciation intra-thymique des nTreg en deux étapes. Ainsi, un renforcement de l'activation du TCR entraînerait une augmentation de l'expression de CD25 (IL-2R), qui à son tour amplifie la réponse à l'IL-2 qui résulte en l'induction de Foxp3 (161-163). Par ailleurs, il semble que d'autres cytokines ayant en commun la chaîne gamma de l'IL-2 tel que l'IL-15 et l'IL-7 peuvent se substituer partiellement à l'action de l'IL-2 pour le développement des nTreg (162, 164-166).

1.3.3. Foxp3 contrôle la différenciation et le développement des lymphocytes T régulateurs

L'immunodérégulation, polyendocrinopathies, entéropathie, liées au chromosome X (Ipx) a été pour la première fois décrite en tant qu'entité syndromique récessive liée au chromosome X en 1982 (167). L'Ipx se manifeste classiquement chez un garçon, en période néonatale précoce ou avant l'âge de 4 mois, avec l'apparition essentiellement d'une diarrhée sécrétoire, d'une dermatite de type atopique, diffuse (sans localisation préférentielle), d'un diabète auto-immun de type I, de complications infectieuses ou vaccinales (168). Par la suite le rapprochement de ces symptômes humains avec un modèle murin, la souris scurfy (sf), apparut de façon spontanée au sein d'une lignée murine de laboratoire en 1949 a représenté une avancée majeure (168). Cette lignée montrait en effet, un caractère récessif dont la transmission était liée au chromosome X et dont les symptômes, proches du tableau clinique humain, entraînaient une mort prématurée des mâles hémizygotés pour sf, ainsi que des rares femelles homozygotes. La liaison orthologue entre scurfy et Ipx fut établie en 2001 par trois études qui montraient

que le gène *foxp3* était responsable du caractère scurfy et qu'il existait un gène *FOXP3*, orthologue, chez l'homme (169) ; que la mutation de *FOXP3* était responsable de l'Ipex (baptisant ainsi le syndrome) (170) et que la souris Scurfy était l'équivalent murin du syndrome Ipex (171). Ce n'est qu'en 2003 que le rapprochement fut fait entre la mutation *foxp3* responsable des syndromes Ipex/scurfy et les tableaux cliniques d'auto-immunité chez les souris thymectomisées ou dépourvues de Treg en mettant en évidence que l'expression de *foxp3* se faisait spécifiquement dans des lymphocytes $CD4^+CD25^+$, et les thymocytes $CD4^+CD25^+CD8^-$, et que cette expression était nécessaire à la fonction et au développement des cellules T régulatrices (172-174). En effet, d'une part l'injection in vivo de lymphocytes $CD4^+CD25^+foxp3^+$ chez des souris Scurfy empêchait le développement de la plupart de leurs symptômes et évitait leur mort précoce (172) ; d'autre part l'injection de lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ transduisant le transgène *foxp3* supprimait la colite induite par l'injection de $CD4^+CD25^-$ chez des souris RAG (172).

1.3.4. Contrôle de la fonction des Treg par Foxp3

La protéine Foxp3 (Scurfin) a une fonction de régulateur de transcription : inhibition de la transcription de facteurs nucléaires et de séquences sous la dépendance de NFAT (Nuclear factor of activated T cells), AML-1/Runx1 (Acute myeloid leukemia-1/runt-related transcription factor 1), le complexe HAT/HDAC (The histone acetyl transferase/histone deacetyl transferase) chez des lymphocytes T activés, inhibition de la transcription des cytokines IL-2, IL-4 et IFN- γ (175, 176).

L'activité du NFAT est régulée par le calcium qui active la calmoduline, laquelle s'unit à la calcineurine. Le complexe calmoduline-calcineurine déphosphoryle le NFAT qui est présent dans les cellules lymphoïdes quiescentes à l'état phosphorylé. Le NFAT

déphosphorylé pénètre dans le noyau et forme un complexe avec AP-1 et NF- κ B et favorise la synthèse d'IL-2, d'IL-4, CTLA4 et d'autres gènes participant à l'activation et la différenciation en cellules T effecteur (177). L'interaction entre Foxp3 et NAFT est dépendante de leur liaison à l'ADN. La substitution d'acide aminé dans la région d'interaction entre Foxp3 et NAFT empêche Foxp3 d'inhiber la synthèse d'IL-2, d'activer CTLA4, CD25 et d'exercer une activité suppressive (175). Foxp3 contrôle également la fonction des Treg en interagissant avec le facteur de transcription AML-1/Runx1 (Acute myeloid leukemia-1/runt-related transcription factor 1). La sécrétion de l'IL-2 et d'IFN- γ n'est plus supprimée par Foxp3 si la liaison entre Foxp3 et AML-1/Runx1 est interrompue. De même les nTreg des souris AML-1/Runx1-déficientes ne présentent plus de phénotype suppresseur (178). L'HAT (Histone acetyl transferase) tel que TIP60 et HDAC (Histone deacetyl transferase) comme l'HDAC7 sont également impliqués dans le contrôle transcriptionnelle exercé par Foxp3 (179). En effet l'acétylation de Foxp3 par TIP60 accroît son inhibition de l'IL-2 (180). Des travaux récents montrent que Foxp3 contrôle directement ou indirectement de très nombreux gènes (~700) et se lie directement à environ 10% d'entre eux. Ces gènes comprennent ceux codant pour des molécules transductrices du signal (Zap70 et Ptpn22), des facteurs de transcriptions (Crem), des cytokines (IL-2), des molécules de surface cellulaire (IL2R α , CTLA4, et FASL), des enzymes pour le métabolisme cellulaire (Pde3b) et des microRNAs (miR-155) (181, 182).

1.3.5. Les lymphocytes T régulateurs induits en périphérie à partir de lymphocytes T naïfs (iTreg)

Des expériences de transfert adoptif de lymphocytes T naïfs CD4⁺CD25⁻ dans des souris lymphopéniques ou ayant des Lymphocytes T avec un répertoire monoclonal du

TCR exempt de nTreg, ont permis de mettre en évidence leur conversion périphérique en cellules T suppressives $CD25^+CTLA4^+GITR^+Foxp3^+$ (157, 183, 184). Des iTreg sont également générés après activation antigénique des cellules T naïfs (185-188). L'activation du TCR ainsi que les cytokines TGF- β (185, 189) et l'IL-2 (190) sont requis pour le développement *in vivo* et *in vitro* des iTreg (152). Toutefois en présence d'IL-6, le TGF- β induit le développement de cellules Th17 chez la souris (96, 98). Alors que l'IL-2 induit la différenciation de T naïfs en lymphocytes T régulateurs $CD4^+Foxp3^+$ et inhibe le développement de Th17 (129). L'expression de CTLA-4 par les cellules T naïves activées en présence de TGF- β *in vitro* est requise pour l'expression de haut niveau de Foxp3 et l'activité suppressive, alors que CTLA-4 n'est pas nécessaire au développement des nTreg (191). De plus, l'inhibition du développement des iTreg en présence de TGF- β par des cytokines inflammatoires ou une robuste costimulation, est supprimée par l'acide rétinoïque (RA) produit par les DC de la lamina propria de la muqueuse intestinale qui favorise l'induction de lymphocytes T régulateurs $CD4^+Foxp3^+$ (192-195). Les cellules dendritiques $CD103^+$ isolées de la muqueuse intestinale ou des ganglions lymphatiques mésentériques induisent la différenciation des cellules T naïves en cellules iTreg $Foxp3^+$ (196, 197).

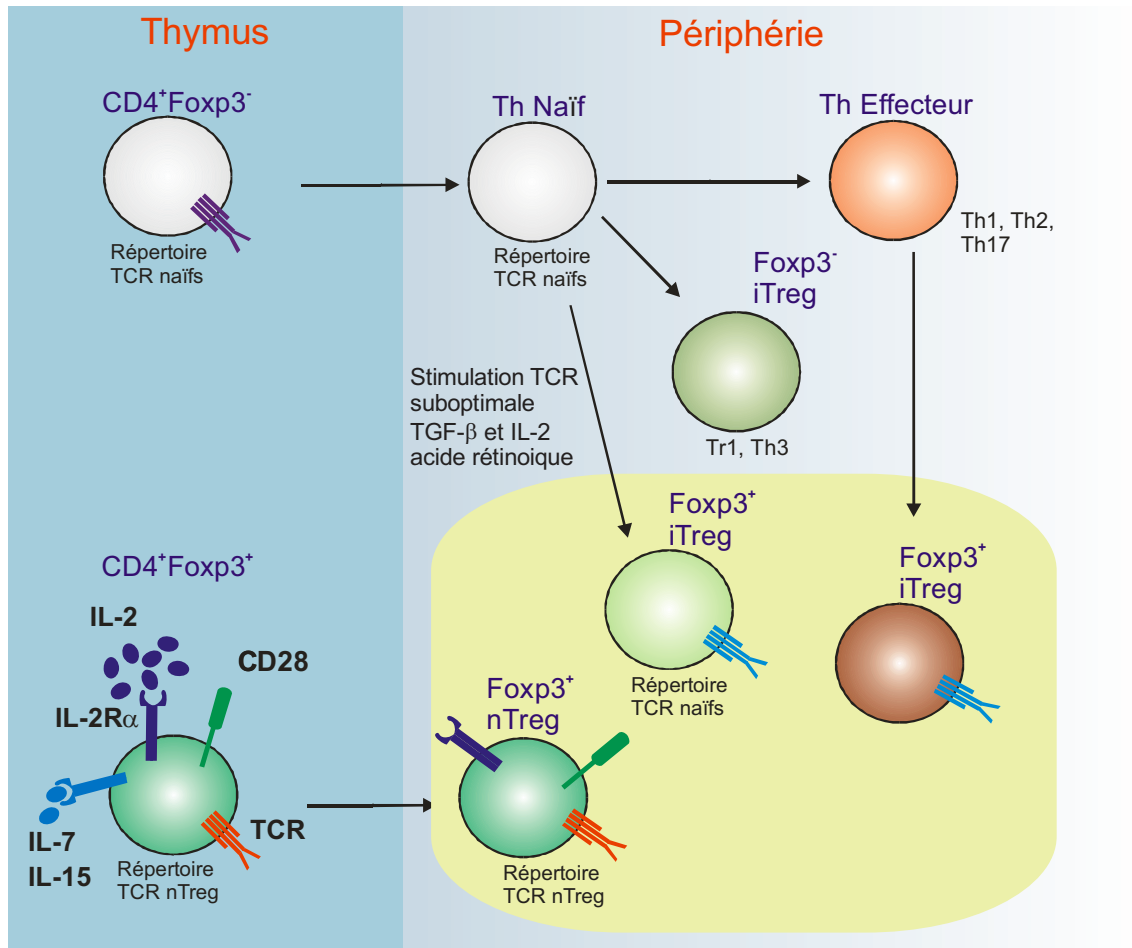


Figure 4. Ontogenèse des cellules T régulatrices dans le thymus et en périphérie. Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) se différencient dans le thymus et migrent vers les tissus périphériques. Les cellules T régulatrices induites ou adaptatives (iTreg) se différencient dans les tissus lymphoïdes secondaires (tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, ganglions lymphatiques, rate) et dans les tissus. La population périphérique de cellules Foxp3⁺ comprend les cellules T nTreg et iTreg. Le répertoire TCR des cellules nTreg et iTreg diffèrent très probablement du fait que les iTreg sont issus des cellules T CD4⁺ périphériques naïves ou mémoires. Adapté de Curotto de Lafaille *et al*, in *Immunity*, vol 30, issue 5, 22 May 2009, 626-635.

Tableau 1. Études montrant la génération en dehors du thymus de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ à partir de cellules T non régulatrices CD4⁺CD25⁻ (modifié de (198)).

Source des cellules T	Stimuli induisant des Treg	Expression de FOXP3	Références
<i>Souris études in vitro</i>			
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻	TGF-β	Oui	(185, 199)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻	IFN-γ	Oui	(200)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻	Oxyde Nitrique NO	Non	(201)
<i>Souris études in vitro et in vivo</i>			
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻	Stimulation avec aCD3 et aCD28	Oui	(202, 203)
<i>Souris études in vivo</i>			
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻	Prolifération homéostatique et/ou conversion	Oui	(157, 203)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻ (Souris transgénique Rag ^{-/-} TCR-OVA-spécifique)	Administration intraveineuse ou orale d'OVA	ND	(204)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻ (Souris transgénique Rag ^{-/-} TCR-HA-spécifique)	Exposition prolongée à une faible dose d'antigène	ND	(186, 187)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻ (Souris transgénique Rag ^{-/-} TCR-OVA-spécifique)	Exposition prolongée à un antigène périphérique	ND	(205)
<i>Humain études in vitro</i>			
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻	Stimulation avec aCD3 et/ou aCD28 ou antigène spécifique	Oui	(206-208)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻	IFN-γ	Oui	(200)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻ CD45RA ⁺	TGF-β	Oui	(185, 209, 210)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻ CD45RA ⁺	IL-4 et/ou IL-13	Oui	(211)
Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁻ CD45RA ⁺	Interaction Thrombospondin et/ou CD47	Oui	(212)

Il reste cependant à déterminer dans quelle mesure les lymphocytes T induits en périphérie à partir de T naïfs sont fonctionnellement stables et qu'elle proportion du "pool" total des Treg Fosp3⁺ ils représentent ? En effet, la région régulatrice du gène de Foxp3 chez la souris est plus fortement déméthylée chez les nTreg en comparaison avec les Treg induits par le TGF- β suggérant chez ces derniers une plus grande instabilité (213-215).

Du reste, les cellules T humaines peuvent exprimer Foxp3 transitoirement à la suite d'une stimulation antigénique, mais dont la signification fonctionnelle demeure toujours controversée (206, 216-220). Certains auteurs lui prêtent des propriétés suppressives transitoire (206, 220), alors que d'autres suggèrent que l'effet suppressif n'est pas systématiquement corrélé à l'expression de Foxp3 (217-219).

Les iTreg comprennent également une sous-population de lymphocytes T régulateurs appelée Tr1, obtenue *in vitro* à partir de cellules T naïves, suite à la présentation de l'antigène en présence d'IL-10 (221, 222). Leur capacité suppressive de la réponse immunitaire passe par la sécrétion de l'IL-10 et du TGF- β . Il existe aussi des lymphocytes Treg, appelés Th3, qui se développent après tolérance orale ou nasale, dans la muqueuse intestinale chez l'animal, qui sécrètent de forte quantité de TGF- β et favorisent la sécrétion d'IgA par des plasmocytes (221, 223, 224).

D'autres sous-populations de lymphocytes T ayant des propriétés régulatrices, tels que les lymphocytes T CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ et les cellules T γ/δ ont également été décrites. Les lymphocytes T CD8⁺ supresseurs ont été identifiés au début des années 1970 (225). Par la suite, des expériences d'immunisation avec des antigènes du soi et de déplétion des cellules T CD8⁺ chez l'animal, démontraient le rôle d'une sous population de lymphocytes T CD8⁺ dans l'auto-immunité et dans la transplantation d'allogreffe (226). Les cellules T régulatrices CD8⁺ ont été impliquées dans la protection et la guérison de

l'encéphalomyélite expérimentale auto-immune chez les rongeurs (227, 228) et leur disfonctionnement a été également incriminé dans certaines pathologies auto-immunes chez l'homme comme la maladie inflammatoire de l'intestin et la sclérose en plaque (229).

Les cellules iTreg, par définition, ont le répertoire TCR des cellules T CD4⁺ naïves. Le répertoire TCR des cellules T régulatrice CD4⁺Foxp3⁺ est différent du répertoire TCR des cellules T naïves mais avec toutefois un certain pourcentage de similitude variant de 10 à 42 % selon les études, mais distribué à des fréquences très différentes dans les deux populations cellulaires (230-234). Ces séquences TCR partagées sont à attribuer probablement à la présence de cellules iTreg parmi les cellules T régulatrices étudiées.

1.3.6. Mécanismes de l'immuno-modulation induite par les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs inhibent la prolifération de lymphocytes T naïfs, ainsi que leurs différenciations en T effecteurs *in vivo*. De même qu'ils suppriment l'activité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs, ainsi que les fonctions des cellules NK (Natural killer), des cellules NKT (Natural killer T cells), des lymphocytes B, des macrophages, des ostéoclastes, des mastocytes et des cellules dendritiques. Bien que le mode d'action des Treg reste en grande partie à clarifier, on peut identifier 4 mécanismes par lesquels les lymphocytes T régulateurs exercent leur immunomodulation : par l'intermédiaire de cytokines inhibitrices, par induction d'une cytotoxicité, par interférence métabolique et enfin via les DCs (235, 236).

A. Cytokines inhibitrices

Des études *in vitro* utilisant des Ac neutralisants les cytokines IL-10 et TGF- β ou des cellules T incapables de produire ou insensibles à ces cytokines, suggéraient que celles-ci n'étaient pas indispensables à l'action suppressive des nTreg (237-240). Ces observations sont en contradiction avec des études *in vivo*. Dans de nombreux modèles expérimentaux de maladies tels que l'asthme (241-243), la colite inflammatoire chez la souris (244), l'encéphalomyélite expérimentale (245) l'importance de l'IL-10 et/ou du TGF- β dans l'activité suppressive des Treg a été mise en évidence. L'IL-35, une nouvelle cytokine membre de la famille de l'IL-12, préférentiellement exprimée par les Treg Foxp3⁺ de souris, est requise pour une fonction suppressive maximale (246).

B. Suppression par cytotoxicité

Les granzymes A et B sont des sérines protéases sécrétées principalement par les cellules Natural killer (NK) et les Lymphocytes T Cytotoxiques (CTL), qui induisent l'apoptose des cellules cibles par un mécanisme perforine dépendant. Les cellules T régulatrices humaines produisent le granzyme A et des perforines leur permettant de lyser les cellules cibles aux quelles elles ont adhéré grâce à CD18 (247). De même, les souris déficientes en granzyme B possèdent des Treg avec une capacité suppressive réduite, mais une expression normale de FoxP3. La granzyme B déclenche l'apoptose des cellules effectrices d'une manière dose dépendante, mais contrairement aux cellules cytotoxiques indépendamment de la perforine ou de FAS-L (Apoptosis stimulating fragment ligand) (248).

Même si la majorité des études qui analysent le mode d'action par cytotoxicité des Treg concerne le granzyme B, des données récentes impliquant la voie TRAIL-DR5

(Tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor 5) dans la cytolyse des T effecteurs, a été mise en évidence. Par ailleurs, les cellules Treg déficientes en Galectin-1, protéine membranaire surexprimée sur les Treg chez l'homme et la souris, ont une activité suppressive diminuée *in vitro* (249).

C. Suppression par perturbation métabolique de la cellule T effectrice

La forte expression de CD25 (récepteur de l'IL-2) par les cellules T régulatrices faisait de ces cellules d'importants compétiteurs pour l'IL-2 disponible dans l'environnement cellulaire. La déplétion de l'IL-2 par les lymphocytes T régulateurs entravait la survie et la prolifération des T effecteurs, et pouvait même avoir comme conséquence une apoptose des cellules T effectrices (238, 250). Néanmoins, d'autres études ultérieures chez la souris sont venues remettre en question l'importance de ce mécanisme de suppression (159, 251). Des travaux originaux ont relancé le débat sur le rôle important joué par la privation en cytokines, et particulièrement l'IL-2 dans l'induction de l'apoptose des cellules T effectrices chez la souris (252). Alors que chez l'homme une étude arrivait à une conclusion opposée (253).

L'expression conjointe par les Treg des ectoenzymes CD39 et CD73 qui hydrolysent l'ATP en ADP ou AMP, entraînant une production d'adénosine péri-cellulaire qui active le récepteur de l'adénosine A2AR (adenosine A2A receptor) et aboutit à la suppression des cellules T effecteurs (254-257). Cette interaction inhibe également la production d'IL-6, alors qu'elle augmente celle du TGF- β , aboutissant à l'induction de cellules T régulatrices. De plus l'adénosine favorise l'apparition de cellules dendritiques dites «tolérogéniques». Un autre moyen de suppression est le transfert de cAMP dans les T effecteurs par canaux de jonction (258). La molécule FGL2 (Fibrinogen-like protein 2)

secrétée par les Treg et qui a pour ligand sur les DCs le Fc γ RIIB, inhibe également la prolifération des cellules T (259).

D. Suppression par action sur les cellules dendritiques

L'avènement de la microscopie *in vivo* a mis en évidence l'interaction directe entre les cellules T régulatrices et des DC, mais sans mettre en évidence l'interaction entre les lymphocytes T effecteurs et les Treg (260, 261). L'action activatrice des cellules T effecteurs par les DC est inhibée par les cellules T régulatrices et cette action suppressive est dépendante de l'expression constitutive de CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) par les Treg, qui bloque l'augmentation ou diminue l'expression de CD80 et CD86 sur les DC, comme le démontrent les expériences utilisant des Ac bloquants CTLA-4 et des souris CTLA-4-déficientes (262-266). Il a été établi que les cellules T régulatrices peuvent conditionner les DC via l'interaction entre CTLA-4 et CD80 et/ou CD86 afin d'exprimer l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), qui induit des produits métaboliques de dégradation du tryptophane aux propriétés suppressives (267-269). De même les Treg peuvent exercer un effet immunomodulateur sur le phénotype et la fonction des cellules dendritiques, inhibant ainsi la capacité de ces cellules d'activer les lymphocytes T effecteurs (270-275).

De plus, des études réalisées avec des cellules T régulatrices humaines indiquent que les Treg peuvent exercer une immunomodulation fonctionnelle des monocytes et des macrophages, possiblement médiée par le CTLA-4 et le TGF- β (276, 277). L'inhibition des cellules dendritiques est également médiée par une autre molécule membranaire des Treg, LAG3 (Lymphocyte-activation gene 3 ou CD223) homologue de CD4 qui se lie avec une haute affinité au CMH de classe II des DCs immatures (278).

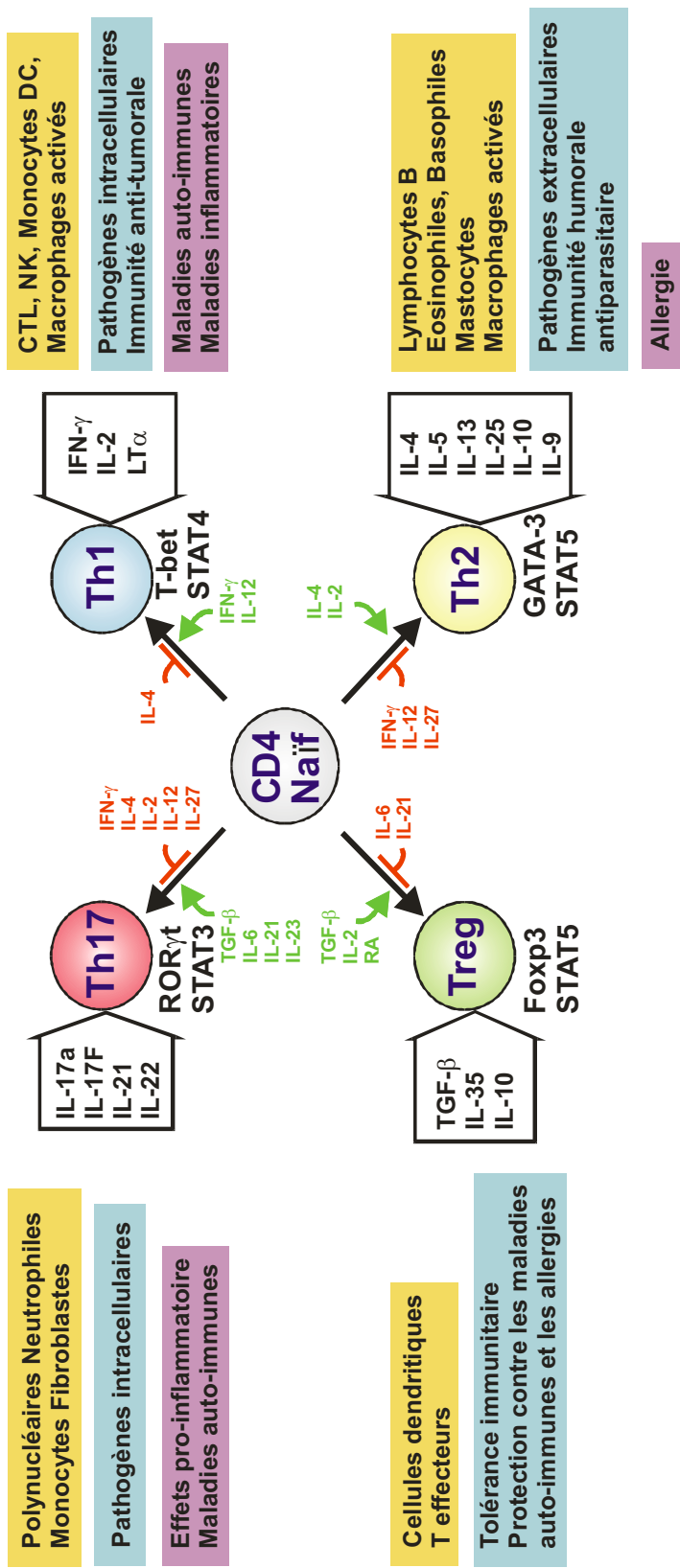


Figure 5. Cytokines et facteurs de transcription régulant la différenciation des cellules T CD4⁺.

Chacun des quatre phénotypes de cellules T CD4⁺ produit des cytokines spécifiques qui contrôlent leurs fonctions biologiques et peuvent dans certaines circonstances être responsables de pathologies. Sous chaque type de cellule T CD4⁺ figurent les facteurs de transcription-clés impliqués dans la différenciation de chaque lignage. Les cytokines représentées en vert favorisent, alors que celles en rouge inhibent la différenciation vers un lignage de cellules T CD4⁺ particulier. Adapté de Ochs H.D. *et al*, in *Journal of Allergy and clinical immunology*, vol 123, Issue 5, May 2009, 977-983.

1.4. Plasticité du lignage des lymphocytes T et épigénétique

L'engagement des cellules T naïves CD4⁺ vers une voie de différenciation Th1 ou Th2 était considéré à l'origine comme un processus unidirectionnel non réversible et terminal. Chaque type de cellules Th exprimant ses facteurs de transcription spécifiques et ses cytokines mutuellement exclusives (Fig. 5). La découverte des Treg et des Th17 et leur capacité à produire des cytokines qui auraient été considérées comme la caractéristique du lignage opposé suggèrent que l'engagement des cellules T vers des lignages différents est plus plastique qu'il n'était apparu au départ. La différenciation des cellules "T helper" est étroitement liée à des changements épigénétiques de la structure de la chromatine, à des modifications des histones et de l'ADN, ainsi qu'à l'expression d'ARN non codant qui contribue à l'activation ou au "silencing" de gènes de cytokines et de gènes régulateurs transcriptionnels fondamentaux (279-281).

Il est admis que la modification de la chromatine H3, est soit un facteur d'activation par tri-méthylation des résidus de lysine 4 (H3K4me3), ou bien un facteur de répression par tri-méthylation des résidus de lysine 27 (H3K27me3), de gènes clés durant la différenciation des lymphocytes T naïves CD4⁺ (Fig. 6) (282). Les marqueurs épigénétiques retrouvés au niveau des locis des gènes *Ifng*, *Il4* et *Il17* témoignent d'une parfaite corrélation avec les lignages Th1 et Th2. Ainsi, on retrouve une augmentation de la marque H3K4me3 (activateur) dans les régions du gène de l'*Ifng* et H3K27me3 (répresseur) dans les locus *Il4* et *Il17* dans les cellules Th1 (Fig. 6), alors que l'on observe une augmentation de la marque H3K4me3 dans les locus *Il4* et H3K27me3 dans les locus *Ifng* et *Il17* dans les cellules Th2 (Figure. 6) (283).

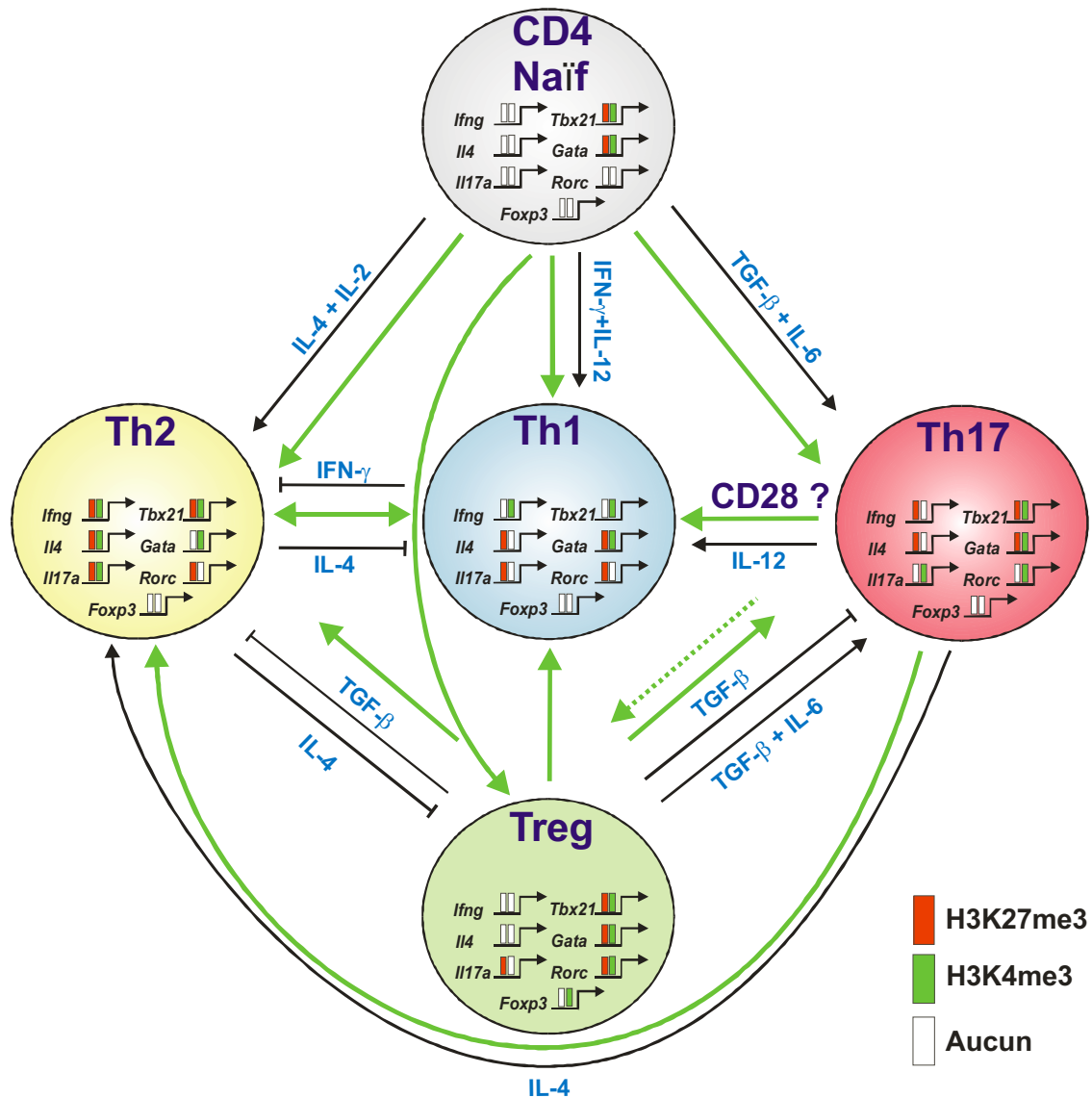


Figure 6. Statut épigénétique des gènes des facteurs de transcription clé de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺. La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ est un processus flexible. Parmi les quatre lignages de lymphocytes T que sont les Th1, Th2, Th17 et les cellules T régulatrices, les cellules Treg et Th17 présentent le plus grand potentiel de différenciation vers d'autres phénotypes. Le mécanisme moléculaire qui sous-tend cette plasticité semble lié aux modifications épigénétiques des histones. H3K4me3 et H3K27me3 marquent respectivement, les loci des gènes régulateurs (tels que, T-bet et Gata3) activés et réprimés. En accord avec la présence de marque épigénétique permissive au niveau des gènes de *Foxp3* et *ROR γ t*, la coexpression de *Foxp3* et *ROR γ t* se produit dans les cellules Treg, mais l'activité de *ROR γ t* est inhibée par *Foxp3*. Adapté de Zhou L et al. *Immunity*, vol 30, Issues 5, 22 May 2009, 646-655.

Une bivalence des régions régulatrices, impliquant la marque active H3K4me3 et la marque répressive H3K27me3 a également été mise en évidence durant la différenciation des lymphocytes T naïves CD4⁺. Ainsi, les gènes *Tbx21* (codant pour Tbet) et *Gata3* présentent cette bivalence des régions régulatrices impliquant la marque active H3K4me3 et la marque répressive H3K27me3 dans les cellules Th2 et Th1 respectivement, permettant la conversion de cellules Th1 en Th2 et réciproquement, lors de conditions inflammatoires particulières (Fig. 6) (284). De même en rapport avec la plasticité évidente des Treg, l'expression des gènes *Tbx21*, *Gata3* et *Rorc* est régulé de la même façon (Fig. 6) (282). Cette modification bivalente permet l'activation de gènes régulateurs spécifiques de lignage en réponse à différentes conditions de polarisation, tel que la reprogrammation des Treg en d'autres lignages. De même, les cellules Th17 différenciées *in vitro* arborent également un statut épigénétique également bivalent pour *Tbx21* et *Gata3*, rendant possible une nouvelle reprogrammation vers Th1 ou Th2 (282, 285, 286). Toutefois, cette conversion semble unidirectionnelle en raison du marqueur épigénétique répressif retrouvé au niveau des gènes *Il17a* et *Rorc* dans les cellules Th1 et Th2 (Fig. 6) (282).

Les cellules nTreg générés dans le thymus, et les cellules iTreg induites en périphérie diffèrent par leur capacité de reprogrammation, conséquence de leur statut différent de méthylation de l'ADN du locus *Foxp3*, ainsi que des marqueurs d'histone du locus *Rorc*. H3K27me3 est retrouvé dans le locus de l'*Il17a* alors que H3K4me3 est retrouvé au locus de *Rorc* des iTreg, en accord avec le fait que l'expression de ROR γ t est induite par le TGF- β , et que la synthèse de l'IL-17 induite par ROR γ t est inhibé par Foxp3 (133, 282). Alors que pour les nTreg les deux marqueurs H3Kme3 et H3K27me3 sont présent au locus de *Rorc*, permettant la coexpression de Foxp3 et ROR γ t. Lorsque les

nTreg sont cultivés *in vitro* en condition polarisante Th17 ou Th1, une proportion des cellules deviennent Foxp3⁺IL-17⁺ ou Foxp3⁺IFN- γ ⁺. Alors que les iTreg TGF- β -induit, dans un environnement polarisant Th17 perdent l'expression de Foxp3 et acquièrent l'expression de l'IL-17 (132, 282, 287). Cette distinction dans l'expression de Foxp3 entre les nTreg et les iTreg est due à des différences épigénétiques résultant d'une déméthylation d'une région du locus de Foxp3 (213, 215, 288, 289). Cette région est déméthylée chez les nTreg alors qu'elle demeure méthylée avec les iTreg TGF- β -induit et dans les cellules T humaines exprimant transitoirement Foxp3 après activation de leur TCR (290, 291).

2. CD47

2.1. La Molécule CD47

CD47 ou IAP (Integrin associated protein) a été découverte pour la première fois dans une préparation extraite de placenta humain afin d'isoler l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (292, 293). Il a été montré également que l'IAP (CD47) est identique à un antigène du carcinome de l'ovaire (OA3) et à une protéine membranaire érythrocytaire (CD47) dont l'expression est diminuée dans la maladie Rh nulle (294-296). CD47 est une protéine transmembranaire, exprimée de façon ubiquitaire et permanente sur les cellules de tous les tissus avec une expression prédominante sur les leucocytes, les plaquettes sanguines et les hématies (293, 295, 297). C'est une protéine de 50 kDa avec un domaine extracellulaire homologue à la superfamille des immunoglobulines (IgV) fortement glycosylée, une partie intramembranaire formée de cinq segments hydrophobes et une courte partie intracytoplasmique (Fig. 7) (298, 299).

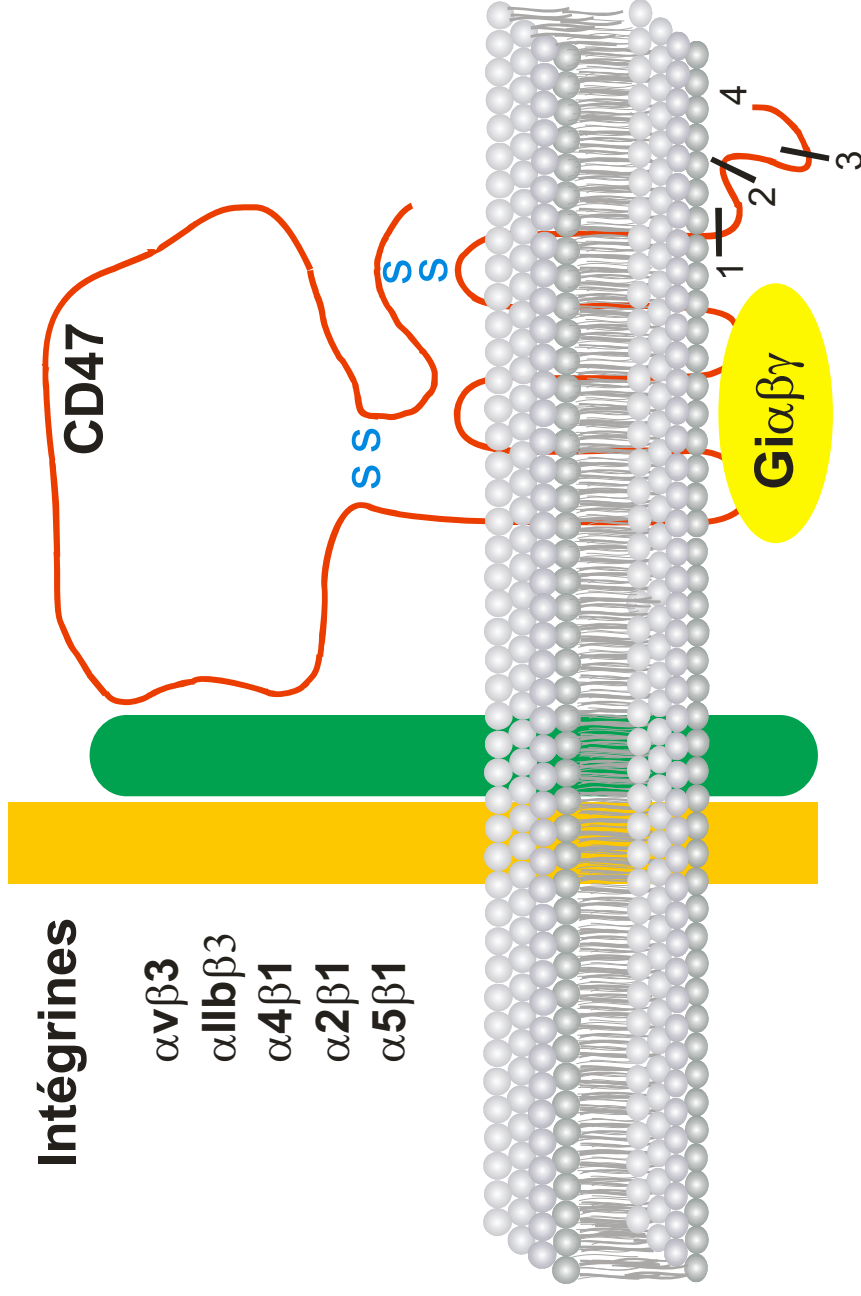


Figure 7. Structure de la molécule CD47 associée à ses différents ligands en cis et à la protéine G intracytoplasmique. On retrouve un domaine extracellulaire apparenté aux domaines variables des Ig, un domaine transmembranaire avec cinq parties intramembranaires et enfin un domaine cytoplasmique de longueur variable suivant l'épissage alternatif. La forme complète 4 est représentée.

Un pont disulfure nécessaire pour la fonction de CD47, est formé entre le domaine extracellulaire et un des segments membranaires (Fig. 7) (300).

Le gène codant pour CD47 est d'environ 1Mb et se trouve chez l'homme sur le chromosome 3 [3q13.1-q13.2] (295, 301). Son expression donne 5 ARNm différents suivant l'épissage, ce qui se traduit par une partie intracytoplasmique de la molécule de longueur variable chez la souris et l'humain (294, 297, 301).

CD47 peut interagir en *cis* avec les intégrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (302) mais également avec la thrombospondine-1 (TSP-1), et en *trans* avec les SIRP- α et γ (Signal inhibitory regulatory protein), et la thrombospondine-1 et 2 (TSP-1 et 2) (298). La voie de signalisation de CD47 se fait par la protéine hétérotrimérique G suggérant que CD47 pourrait être un récepteur couplé à la protéine G inusuel, si ce n'est qu'il ne possède que cinq hélices hydrophobes transmembranaires au lieu de sept (303-306). CD47 est fortement exprimé au niveau des lymphocytes T et au niveau de la membrane cellulaire où il est surtout associé à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$.

2.2. Ligands connus de CD47

2.2.1. Les thrombospondines-1 et 2 (TSP-1, 2) et autres (TSP-3, 4, 5)

Un des ligands de CD47 est une protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine (TSP) (307-312). La TSP-1 a été décrite en 1971 comme une glycoprotéine libérée à partir des granules alpha des plaquettes sanguines sous l'effet de la thrombine, d'où son nom (313, 314).

Les thrombospondines forment une famille de glycoprotéines de la matrice extracellulaire subdivisée suivant leur structure et oligomérisation en deux sous-groupes A et B (Fig. 8) (315-318). Le groupe A comprend deux membres TSP-1 et TSP-2 qui sont

très semblables dans leur structure, constituées d'un homotrimer de poids moléculaire 420 kDa, formés de 3 monomères identiques de 170 kDa. Les thrombospondines-1 et 2 sont souvent colocalisées dans la matrice extracellulaire, même si la TSP-2 présente une expression plus restreinte, on la retrouve de manière prépondérante dans le cartilage et l'os en développement (319-322). Chaque monomère consiste en un domaine NH₂ terminal liant l'héparine, un domaine liant le pro-collagène, les domaines répétitifs 1, 2 et 3 et un domaine COOH terminal liant les cellules (Tableau 2 et Fig. 8). Leurs monomères présentent un taux d'homologie qui va croissant de l'extrémité amino-terminale (32 % d'homologie) vers l'extrémité carboxy-terminale (82 % d'homologie) et se joignent par des ponts sulfuriques. Le groupe B comprend les pentamères TSP-3, 4 et 5 et consistent en monomères de 100 kDa.

La TSP est une protéine ubiquitaire qui est synthétisée, sécrétée et incorporée dans la matrice extracellulaire par un grand nombre de cellules en culture, incluant, les cellules épithéliales et endothéliales (323-325), les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules du système immunitaire (326-329). *In vivo*, la thrombospondine-1 est détectée dès les premiers stades de l'embryogenèse puis lors du développement embryonnaire dans les régions de migration cellulaire. Chez l'adulte, on la trouve exprimée à la face luminale des vaisseaux et dans le sous-endothélium où elle est associée à des structures microfibrillaires présentes à la jonction entre la membrane basale et le tissu conjonctif (330).

La TSP-1 est induite par des facteurs de croissance, tels que le PDGF (Platelet-derived growth factor), le BFGF (Basic fibroblast growth factor), le sérum, le TGF- β 1, l'IL-1 β (Interleukine-1 β), le stress oxydatif, l'hypoxie ou l'angiotensine II (331, 332).

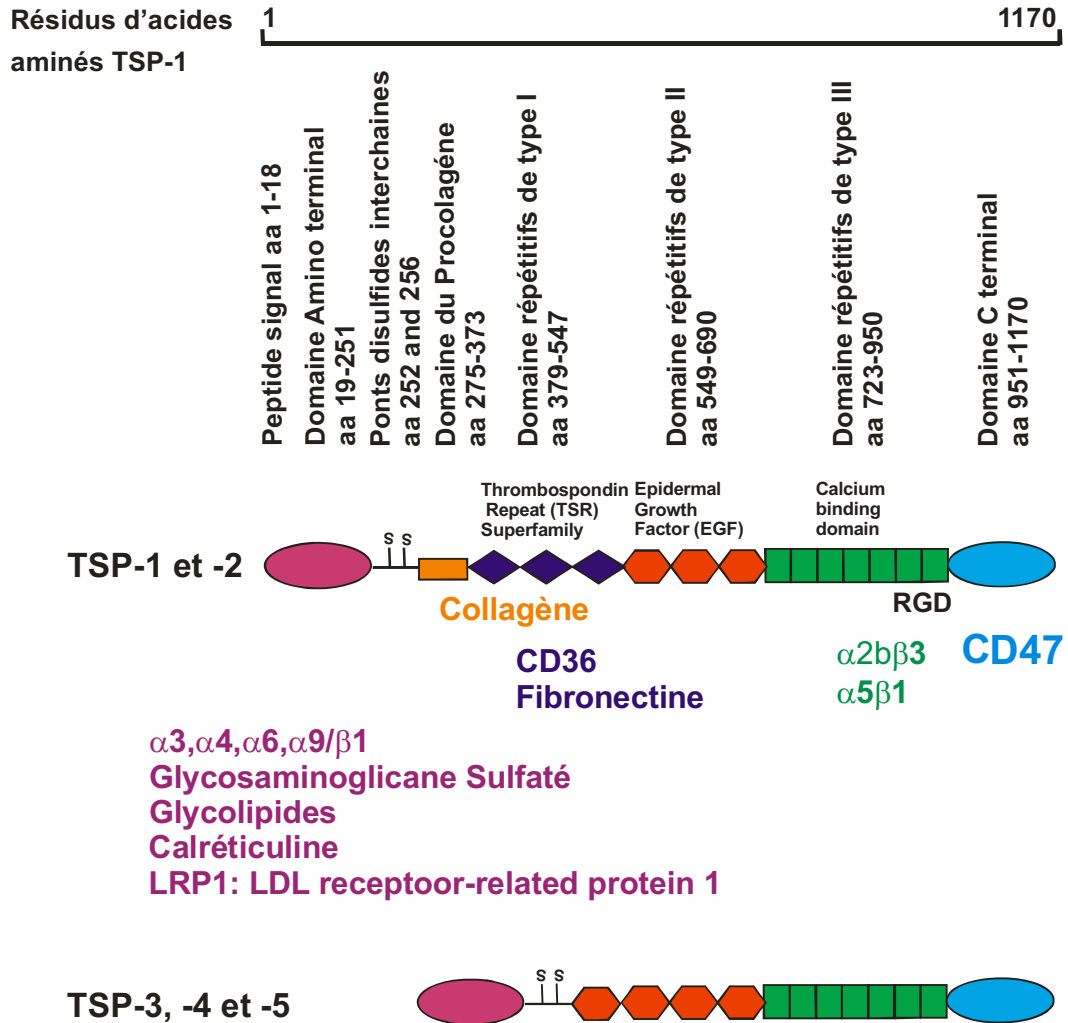


Figure 8. Structure schématique de la thrombospondine-1 et 2.
 Adapté de Forslöw A. *et al*, in Cell. Mol. Life Sci, vol 64, 2007, 66-76.

Des molécules solubles telles que l'acide rétinoïque, l'ATP et la PGE-2 (prostaglandin E2) qui induisent des iTreg, favorisent également la production de la TSP-1 (333-338). Elle est produite immédiatement après une altération tissulaire (339-341). La sécrétion de la TSP-1 par les cellules endothéliales humaines est inhibée par l'IL-1 β et le TNF- α (342).

La TSP-1 représente le principal activateur du précurseur de la cytokine TGF- β (Latent-TGF- β) (343-345).

La TSP a la capacité de s'associer à un grand nombre de molécules membranaires telles que les intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$ et $\alpha3\beta1$ et CD36 (346). La TSP se lie également aux autres protéines de la matrice extracellulaire comme la LDL-LPRP (Low-density lipoprotein receptor related protein), l'HSPGs (Heparane sulfate proteoglycans), les sulfatides, ainsi qu'à de nombreuses protéases incluant la thrombine, la plasmine, la cathepsine G et la metalloprotéinase-2. La plupart des séquences d'adhérence de la TSP-1 sont conservées dans la TSP-2 qui présente cependant une affinité plus faible pour l'héparine. TSP-1 et 2 partagent certaines propriétés, comme l'inhibition de l'angiogénèse, de la prolifération tumorale et de la dissémination métastatique et sont toutes deux des facteurs chimiotactiques pour de nombreuses cellules (347-349).

La TSP-1 est présente en grande quantité au niveau d'organes considérés comme des sanctuaires immuno-privilegiés en accord avec leur résistance au rejet de greffe, tels que l'œil. Ainsi, les cellules de l'épithélium pigmentaire de l'œil expriment la TSP-1 et induisent des lymphocytes T régulateurs, grâce entre autre, à l'activation du TGF- β (350-352). La TSP-1 est retrouvée également au niveau du placenta, ce qui est en faveur de son implication dans la tolérance fœtale immunologique au cours de la grossesse (353, 354).

Le TGF- β est une molécule immunosuppressive majeure inhibant la prolifération cellulaire et induisant des cellules T régulatrices (185, 199) qui est synthétisée sous forme

d'un précurseur latent (Latent-TGF- β), qui requiert une maturation pour se fixer à son récepteur et induire une réponse cellulaire (355). Cette activation est également réalisée par différentes protéases comme la plasmine, la thrombine, les transglutaminases plasmiqes et des endoglycases, ou bien par des interactions physiques avec d'autres protéines, telles que la TSP-1, et les intégrines $\alpha\text{v}\beta 6$ ou $\alpha\text{v}\beta 8$ (355, 356). À noter que la TSP-2 peut se lier au TGF- β , mais est incapable de l'activer.

Une analyse de la littérature suggère que la régulation de l'immunité par le TGF- β semble surtout dépendante de la liaison aux récepteurs membranaires et à la modification conformationnelle du TGF- β (355). Des études récentes utilisant des souris transgéniques expriment le récepteur TGF- β RII muté ou dont le récepteur était invalidé pour les cellules T ont permis d'analyser spécifiquement sur ces derniers le rôle du TGF- β , confirmant son implication dans l'inhibition de la différenciation Th1, des fonctions effectrices des cellules T et dans la sensibilité à la suppression par les Treg (112, 154, 155, 357-359). Malgré la reconstitution chez une souris TGF- β déficiente, du niveau normal du TGF- β circulant, celle-ci développe malgré tout un phénotype fatal, mettant en évidence le rôle essentiel de la source du TGF- β autocrine ou paracrine dans la tolérance des lymphocytes T (360). L'expression du TGF- β par les cellules T manifeste une dualité fonctionnelle, en effet il est nécessaire au maintien des lymphocytes T régulateurs dans les tissus périphériques alors que le TGF- β inhibe leur prolifération dans les ganglions lymphatiques (361).

Tableau 2. Liste des séquences des différents domaines de la TSP-1 ayant des fonctions connues (modifié de la ref. (346))

Domaines de la TSP-1	Séquences	Récepteurs	Fonctions	Références
Domaine amino terminal	QNV	$\alpha 3\beta 1$	adhérence cellulaire à la TSP-1 hémostase	(362, 363)
	RKGSRR/KKTR	HSPG-LRP-gp330 syndecan glycolipide sulfaté	endocytose	(364-366)
	ELTGAARKGSGR	calréticuline	activité anti-adhérence	(367-369)
	RLVKGP (Hep1)	héparine	inhibition de la motilité des cellules T	(370)
	MKKTRG	décorine	inhibition de l'adhérence cellulaire	(371)
	LDVP	$\alpha 4\beta 1$	favorise l'adhérence cellulaire et le chimiotaxisme	(372, 373)
	LALERKDHS	$\alpha 6\beta 1$	adhérence des cellules endothéliales à la TSP-1 et TSP-2	(374)
	25-kDa peptide		ND	
Domaine d'oligomérisation				
Domaine d'homologie du procollagène	NGVQYRN		inhibition de l'angiogénèse inhibition du chimiotactisme	(348)
Domaines répétitifs de Type I (1-3)	RFK	LTGF- β	activation du TGF- β latent	(375-377)
	WSHWSPW	protéine glycosaminoglycan	activation du TGF- β latent	(378, 379)
	CSVTCG	HIV gp120 HSPG, CD36	inhibition de l'angiogénèse adhérence cellulaire	(380-382)
	GVQxR	CD36	migration des cellules endothéliales	(383)
Domaines répétitifs de Type II (1-3)				
Domaines répétitifs de Type III (1-7)	RGD	$\alpha v\beta 3$ $\alpha IIb\beta 3$ $\alpha 5\beta 1$	adhérence cellulaire active l'angiogénèse	(372, 373, 384-387)
			fixation du calcium	(388, 389)
	NCPFHYNP NCQYVNV	cathepsin G, elastase		(321)
Domaine carboxy-terminale	RFYVVM IRVVM	CD47	chimiotaxisme prolifération cellulaire apoptose induction d'iTreg régule la réponse au NO	(212, 308, 390-397)

Les souris déficientes pour la TSP-1 ou $\alpha v\beta 6$ présentent respectivement, une inflammation pulmonaire spontanée, une cicatrisation aberrante après blessure, ainsi qu'une diminution du recrutement des monocytes et la présence d'un infiltrat inflammatoire chronique, de même qu'une augmentation de la prolifération de fibroblastes et de cellules épithéliales (339, 398) et une inflammation exagérée de la peau et des poumons (399). Par ailleurs, dans un modèle d'infarctus expérimental les souris TSP^{-/-} présente une inflammation plus importante (400). De plus, les souris TSP^{-/-} $\alpha v\beta 6$ ^{-/-} présentent une inflammation encore plus sévère des poumons et des autres tissus (401).

Enfin, les souris dont l'intégrine $\alpha v\beta 8$ a été invalidée sur les cellules dendritiques et les cellules myéloïdes, développent une auto-immunité ainsi qu'une colite et leur propriété d'induire des lymphocytes T régulateurs est diminuée en raison d'un défaut d'activation du TGF- β (402-404).

Récemment, il a été rapporté que le LAP (Latency associated peptide), produit de la maturation du latent-TGF- β , supprimait indépendamment de l'action du TGF- β la réaction d'hypersensibilité cutanée retardée via l'IL-10, et que la présence de la TSP-1 était nécessaire. En effet, cette inhibition n'est plus observée après stimulation antigénique en présence d'anticorps anti-TSP-1, de même qu'au cours de l'injection de la TSP-1 avec l'antigène seule sans le LAP (405).

La thrombospondine-1, via son interaction avec CD47, inhibe la réponse à l'oxyde nitrique (NO) des cellules endothéliales et musculaires lisses et bloque la voie de signalisation NO/cGMP, permettant ainsi une fine régulation du tonus vasculaire (308, 390-395).

La TSP-1, qui a été décrite initialement comme une molécule plaquettaire intervenant dans l'hémostase, a vu son rôle considérablement élargie en raison du fait que

beaucoup de cellules ont la capacité de la synthétiser et/ou d'exprimer des récepteurs pouvant la fixer. L'intégration des différentes interactions qu'établit la TSP-1 lui confère la possibilité d'agir de façon autocrine et/ou paracrine pour induire l'adhésion des cellules, modifier leur comportement migratoire et prolifératif (406).

2.2.2. SIRP (Signal inhibitory regulatory protein)

Deux autres ligands de CD47 appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) sont décrits, les protéines SIRP- α et SIRP- γ (Fig. 9) (407-412). SIRP- β (CD172b), est un autre membre de la famille SIRP qui est associé à la protéine membranaire DAP12, mais ne possède pas la capacité de se lier à CD47, sauf si quelques acides aminés sont mutés (408, 413, 414).

A. SIRP- α

SIRP- α (Signal inhibitoire regulatory protein α) est également connu sous les dénominations de SHPS-1 (Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1) (415, 416); BIT (Brain Ig-like molecule with tyrosine-based activation motifs) (417); MFR (Macrophage fusion récepteur) (418); MyD1 (419); CD172a et P84 (420). SIRP- α est une protéine de la membrane plasmique appartenant à la superfamille des immunoglobulines (IgSF) formée d'une région extracellulaire qui contient trois boucles *Ig-like* et d'une région intramembranaire hydrophobe, ainsi que d'une région cytoplasmique comprenant 4 résidus tyrosine formant deux motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) définis comme un enchaînement (I/L/V)_xYxx(L/V) (416, 421, 422). Ces motifs fonctionnent à la suite de la phosphorylation de leurs résidus tyrosine.

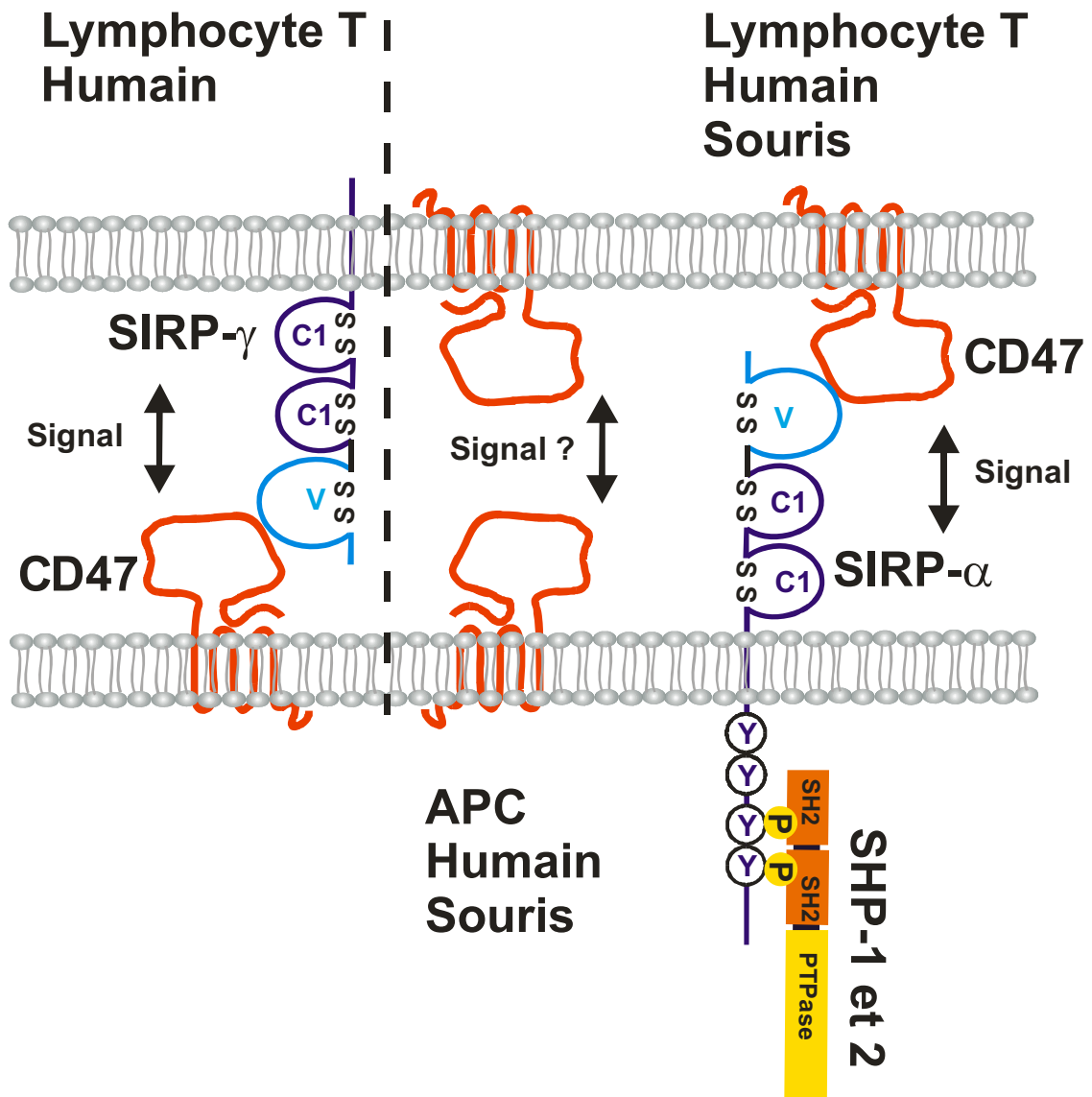


Figure 9. Structure schématique de SIRP- α et SIRP- γ associés à CD47. SIRP- α a été caractérisé chez l'humain et la souris. La présence de SIRP- γ est rapportée uniquement chez l'homme. CD47 est un ligand pour SIRP- α et SIRP- γ . "Y" indique les sites de phosphorylation de la tyrosine qui se lient aux domaines SH2 (Src homology domain 2) de deux catégories de phosphatases: SHP-1 et SHP-2 et les actives. Adapté de Matozaki T *et al*, in Trends Cell Biol, vol 19, issue 2, Feb 2009, 72-80.

Les ITIM phosphorylés sont alors reconnus spécifiquement par des groupements protéiques spécialisés, dits domaines de signalisation comme les domaines SH2 (Src homology domain 2) de deux catégories de phosphatases : les SHP-1 et SHP-2 (Figure 9) (415, 423).

SHP-1 régule négativement de nombreuses fonctions des cellules hématopoïétiques ou immunitaires (424). SIRP- α est exprimé de façon prédominante par les cellules de la lignée myéloïde, particulièrement les macrophages, les cellules de Langerhans, les neutrophiles et les cellules dendritiques, mais également par les cellules neuronales (415, 417, 423, 425, 426). La liaison de SIRP- α à CD47 est indépendante des intégrines (427), et l'étude structurale de la région N-terminale de SIRP- α qui lie CD47, révèlent que cette liaison ressemble à celle rencontrée avec le récepteur des cellules T (428). En effet, le domaine-1 Ig-like le plus proéminent de la région N-terminale de SIRP- α interagit avec le seul domaine Ig-like, au sommet de la boucle de CD47 (429-431).

De même, il existe un important polymorphisme de la région N-terminale de SIRP- α et l'interaction entre SIRP- α et CD47 est spécifique de l'espèce. Néanmoins, le SIRP- α exprimé par les souris NOD peut interagir avec le CD47 des cellules humaines et empêcher leur phagocytose par les macrophages lorsqu'elles sont transférées dans une souris croisée SCID/NOD présentant une immunodéficiência combinée sévère, induisant «une tolérance des macrophages» (432-434).

CD47 via son interaction avec SIRP α (420, 435, 436) est également impliqué dans le développement neuronal (437-439), dans la synaptogénèse (440-442) ainsi que dans le processus de mémorisation (443, 444).

L'expression de CD47 par les cellules stromales de la rate, de la moelle osseuse et du foie fœtale joue un rôle dans l'hématopoïèse (445).

B. SIRP- γ

SIRP- γ (CD172g; SIRP- β 2) est une protéine transmembranaire avec un domaine cytoplasmique d'importance négligeable dépourvu de tyrosine à phosphoryler ou d'interaction avec d'autres protéines transmembraires (446, 447). SIRP- γ est caractérisé par une liaison de faible affinité pour CD47 en comparaison avec SIRP- α . Il est de plus exprimé uniquement par les lymphocytes humains T et B (une partie) et non sur les APCs (446).

2.2.3. CD47 s'associe en *cis* aux intégrines: α v β 3, α IIb β 3, α 4 β 1, α 5 β 1 et α 2 β 1

L'association de CD47 à α v β 3 (Vitronectin receptor; CD51/CD61; leucocyte response integrin) entraîne son activation et permet l'adhésion des cellules à la vitronectine et la migration transendothéliale des monocytes, (448-451).

L'interaction de CD47 exprimé par les plaquettes sanguines et SIRP- α entraîne une suppression des fonctions plaquettaires via l'inhibition de l'activation de l'intégrine α IIb β 3 (glycoprotein GPIIb/IIIa), alors que la liaison à la TSP-1 produit l'effet inverse (452-454).

CD47 active l'intégrine α 4 β 1 (VLA-4; CD29/49d) qui est exprimée de façon prédominante sur les cellules hématopoïétiques. VLA-4 fonctionne comme récepteur de la fibronectine, de VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1), de MAdCAM-1 (Mucosal addressin cell adhesion molecule-1) et de la TSP-1 (372, 373, 455-457). L'adhérence des lymphocytes T à l'endothélium vasculaire inflammatoire dépend de l'interaction d' α 4 β 1 sur la cellule T avec son ligand VCAM-1 sur les cellules endothéliales (CE). Ce

phénomène est potentialisé par la liaison de CD47 (Lymphocyte T) à SIRP- α ou TSP-1 (CE), ce qui entraîne l'activation de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et facilite l'adhérence des lymphocytes T à l'endothélium vasculaire (458). De plus, l'interaction de la séquence LDVP du domaine NH2 terminal de la TSP-1 avec $\alpha 4\beta 1$ augmente le chimiotaxisme, l'expression des gènes des métalloprotéinases et l'activation des lymphocytes T dépendante de l'adhérence et semble indirectement influencée par la liaison du complexe moléculaire $\alpha 4\beta 1$ /TSP-1 à CD47 (373). Sur les cellules T activées avec de l'anti-CD3, l'engagement *in vitro* de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ par son ligand VCAM-1 immobilisé, induit leur activation, la synthèse de facteur de transcriptions et de cytokines, alors que, l'inhibition de l'activation du TCR et de la prolifération des T, par l'interaction CD47/TSP-1, est indépendante d' $\alpha 4\beta 1$ (373, 455, 459, 460).

La régulation de l'entrée du calcium dans les cellules endothéliales ou les neutrophiles par les intégrines requièrent CD47. En effet, le traitement des cellules endothéliales avec un mAc anti-CD47 bloque l'augmentation du calcium intracellulaire à la suite d'une stimulation par la vitronectine (461). De même, l'augmentation de l'influx du calcium à l'intérieur des neutrophiles humains en réponse à l'activation par un ligand de la MEC portant une séquence RGD (Arg-Gly-ASP) est bloquée par le même mAc anti-CD47 (462).

CD47 se lie au mécanorécepteur $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) sur la membrane cellulaire des chondrocytes humains et participe à la transduction d'une stimulation mécanique (463).

L'engagement de CD47 par la TSP, module l'activation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, qui augmente la migration des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins en réponse au collagène soluble et active les plaquettes sanguines (302, 464, 465).

2.3. Fonctions décrites en immunologie

2.3.1. Dans la mort cellulaire programmée (apoptose)

CD47 est impliqué dans l'apoptose de deux façons, soit directement par une voie caspase-indépendante (304, 466, 467), soit indirectement en augmentant la sensibilité au FAS (CD95) qui entraîne une mort cellulaire caspase dépendante (468). L'engagement d'épitopes spécifiques du domaine extracellulaire immunoglobuline-like de CD47 (IAP) par certains anticorps anti-CD47 immobilisés, par la TSP-1 non soluble et son peptide dérivé agoniste 4N1K, induit une forme de mort cellulaire indépendante des caspases des cellules B isolées de patients ayant une leucémie lymphoïde chronique à cellule B (B-LLC), des lymphocytes T activés et des cellules d'une lignée cellulaire T Jurkat (304, 466, 467, 469-471). Cependant, les cellules T périphériques normales sont insensibles à l'apoptose induite par l'engagement de CD47, sauf si celles-ci ont été activées par de l'anti-CD3 immobilisé.

Ce mode d'apoptose médié par CD47 ressemble dans une certaine mesure à la "mort nécrotique programmée" ou "mort programmée de type III" (304, 466, 472, 473). L'observation expérimentale que les cellules Jurkat (JinB8) et les lymphocytes T de souris déficientes en CD47 sont moins sensibles à l'apoptose, a mis en évidence l'action facilitatrice en *cis* du domaine extracellulaire IgV de CD47 sur le récepteur FAS (CD95) entraînant une activation renforcée de la voie d'apoptose caspase-dépendante (304, 468).

Il a été également rapporté que l'engagement simultané du complexe CD47/ $\alpha v \beta 3$, respectivement, par le domaine C terminal et les domaines répétitifs de type 3 de la TSP-1 soluble, entraînait une apoptose caspase-indépendante des cellules NB4, cellules dérivées de cellules de leucémie à promyélocytes (474) et des fibroblastes *in vitro* (397). Pour

certain auteurs, l'engagement de CD47 entraînerait aussi l'apoptose des cellules dendritiques et des monocytes (475), alors qu'une autre étude ne montre aucun effet (466).

L'engagement de CD47 par la TSP entraîne également l'apoptose de différents types de cellules (476), comme les cellules endothéliales (477, 478), les neurones (479, 480) et les cellules cancéreuses (306). De même, des constructions solubles de protéines SIRP α semblent, en engageant le CD47 exprimé par la lignée de cellules T Jurkat, induire une apoptose (304). Par ailleurs, la TSP-1 induit l'apoptose des cellules endothéliales via CD36.

La propriété de CD47 d'induire l'apoptose a suscité l'intérêt d'utiliser cette voie afin de développer de nouveaux moyens thérapeutiques contre les cancers issus des cellules lymphocytaires (481, 482).

2.3.2. Dans la réponse immunitaire innée

2.3.2.1. La liaison CD47 – TSP

L'engagement de CD47 par la TSP-1 endogène sécrétée par les DCs (338), ainsi que par un mAc anti-CD47, sa fraction (Fab')₂ ou par le peptide 4N1K dérivé du site de liaison de CD47 à la TSP-1 (483), inhibe la maturation des cellules dendritiques humaines, ainsi que la synthèse de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-12, le TNF- α , l'IL-6, le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) et l'IL-1, sans pour autant augmenter la sécrétion d'IL-10 qui est également diminuée. (484). Par ailleurs, l'engagement de CD47 sur les monocytes s'accompagne spécifiquement d'une diminution de la sécrétion d'IL-12 (485). L'engagement de CD47 sur les cellules dendritiques par la TSP-1 ou par un mAc anti-CD47 régule négativement la production d'IL-12 et la maturation de ces cellules (338, 483, 485). La stimulation des mastocytes

isolées du tissu conjonctif de rat avec le peptide 4N1K se traduit par l'activation du complexe intégrine/CD47/protéine-Gi associé aux radeaux lipidiques et qui aboutit à la sécrétion d'histamine via la mobilisation du calcium intracellulaire (486).

2.3.2.2. La liaison CD47 – SIRP- α

A. Cellules dendritiques, monocytes, cellules de Langerhans

L'engagement de SIRP- α et/ou de CD47 par une protéine de fusion SIRP- α -Fc sur les cellules de Langerhans, inhibe la maturation et la migration de ces cellules, l'activation des cellules T et l'induction d'une réaction d'hypersensibilité de contact (487). De même, la liaison de SIRP- α sur les cellules dendritiques par la protéine de fusion CD47-Fc inhibe la production d'IL-12, d'IFN- γ et d'IL-10 (488, 489). De plus, l'activation de SIRP- α sur les monocytes traités au LPS inhibe la sécrétion de TNF- α (490). Cette fonction immunorégulatrice de CD47 est exploitée par les virus de la famille des *poxviridae*, qui induisent l'expression d'un important facteur de virulence homologue de CD47, à la surface des cellules qu'ils infectent, qui inhibe l'activation des macrophages et la production d'oxyde nitrique (491-493). La présence de CD47 sur la même membrane cellulaire que SIRP- α , n'est pas requise pour son activation, cependant elle l'augmente en favorisant une meilleure adhérence aux cellules via l'activation des intégrines (494). Il a été également suggéré que SIRP- α est activé par les TLR4 et TLR3, qui, à la suite de la phosphorylation des résidus tyrosine, inhibe la production des cytokines proinflammatoires TNF- α et IL-6 en réponse à l'activation des TLR4 et TLR3, respectivement par du LPS ou du Poly(I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid) (495)

B. Macrophages : La discrimination entre "le soi" et "le non-soi" et l'inhibition de la phagocytose

La liaison de CD47 à SIRP- α bloque la phagocytose des GR (496-498). Indubitablement, des GR ou des lymphocytes T CD47^{-/-}, transférés à des souris CD47^{+/+} sont rapidement éliminés dans la rate, et cela tout à fait indépendamment de l'action des effecteurs lymphocytaires (T et B) et du système du complément (496, 497). Les macrophages de la pulpe rouge splénique (mais aussi les DCs) sont responsables de cette élimination, puisque la destruction sélective de cette population, de même que la splénectomie, s'oppose à l'élimination des GR CD47^{-/-} (496, 499-501). Quoique les macrophages dérivés des cellules de la moelle osseuse de souris CD47^{+/+} sont incapables de phagocyter les GR CD47^{-/-} *in vitro* (496).

SIRP- α prolonge la survie des GR en inhibant leur phagocytose par les macrophages de la rate (501). En effet, les GR conservées dans une banque de sang, finissent par voir diminuer au cours du temps l'expression de CD47 à leur surface, les rendant ainsi plus sensibles à la phagocytose à la suite d'une transfusion ultérieure (502, 503). Il est à noter que les personnes présentant une sphérocytose héréditaire (anémie hémolytique due à une déficience pour la protéine 4.2) ainsi que les patients Rh-déficients, présentent une expression réduite de CD47 sur les globules rouges et peuvent développer un large spectre clinique d'anémie hémolytique auto-immunes (504, 505). Une éventuelle plus grande sensibilité à la phagocytose, du fait de la faible expression de CD47 avait été évoquée chez ces patients comme mécanisme physiopathologique. Toutefois, il a été établi par la suite qu'une expression même très limitée de CD47 était suffisamment efficiente pour inhiber la phagocytose. (506-510).

L'expression de CD47 par l'ensemble des cellules délivre donc un «do not eat me signal» à la cellule phagocytaire, qui via SIRP- α , reconnaît CD47 comme «une molécule du soi» et prévient leur phagocytose *in vitro* (511-517). Le mécanisme impliqué dans l'inhibition résulterait d'une désactivation de la Myosine IIa, qui inhiberait ainsi la phagocytose (518). Cette interaction SIRP- α /CD47 a d'importantes implications en transplantation (516). Par exemple, des porcs transgéniques dont les cellules expriment la molécule CD47 humaine ou l'addition de CD47-Fc humain, inhibe la phagocytose de ces cellules par les macrophages humains (519).

Cependant, chez une souris CD47-déficiente, ces macrophages sont «éduqués à la naissance» afin de ne pas phagocyter les cellules n'exprimant pas CD47. Comme cela a été établi lorsque l'on crée une chimère pour CD47, les macrophages CD47^{+/+} développés *in vivo* dans un environnement dépourvu de CD47 deviennent tolérants envers les cellules nucléées n'exprimant pas CD47 (520). D'autres SIRP- α ligands, comme le surfactant A et D suppriment également la phagocytose par les macrophages alvéolaires du poumon (521).

Récemment, il a été toutefois montré que CD47 sur des thymocytes de souris en apoptose facilitait leur phagocytose phosphatidylsérine-dépendante ou indépendante par des macrophages non activés, alors que sur des thymocytes viables CD47 inhibait leur phagocytose (522).

C. Macrophages : fusion des phagocytes

L'interaction entre SIRP- α et CD47 est importante dans la fusion des phagocytes mononucléés, entraînant la génération de cellules géantes multinucléés et d'ostéoclastes,

augmentant ainsi leur capacité de résorption d'agents pathogènes, de corps étrangers et du tissu osseux (523-525).

2.3.2.3. La liaison CD47/ α v β 3

A. Monocytes, Neutrophiles, Macrophages

Le complexe trimoléculaire CD47/ α v β 3 participe à la résolution de l'inflammation en favorisant la phagocytose de leucocytes sénescents (en voie d'apoptose) avant que ceux-ci ne libèrent leurs produits potentiellement délétères (526-529). Par ailleurs, le complexe CD47/ α v β 3 via "leur dialogue croisé" avec les intégrines CR3 (CD11b/CD18; Mac-1; α m β 2) et α 5 β 1 exprimées par les macrophages, module la phagocytose (530, 531). En effet, les souris CD47-déficientes sont incapables de phagocyter la bactérie *C. burnetii* (532). Cette interaction régule également la fonction d'adhérence de CR3 exprimé par les monocytes (533). Le complexe CD47/ α v β 3 favorise également la réponse oxydative des phagocytes (534). De plus, l'engagement par CD23 du complexe CD47/ α v β 3 sur les monocytes entraîne la synthèse de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-12, et IFN- γ) (535-537) et sur les macrophages la synthèse de TGF- β , un important inhibiteur de la synthèse de cytokines proinflammatoires.

2.3.3. Dans l'adhérence et la migration des leucocytes

CD47 et SIRP- α sont exprimés à la fois sur la surface des cellules myéloïdes et sur les cellules de l'endothélium vasculaire (538). De manière intéressante, CD47 aussi bien que la protéine E-cadhérine, est retrouvé à la jonction intercellulaire où il participe à la régulation de l'adhérence et la migration des cellules épithéliales (539). De manière

générale CD47/SIRP- α contrôle positivement la migration cellulaire. Cependant, la liaison de la TSP-1 au complexe CD47/ α v β 3 favorise aussi le déplacement des cellules à travers la vitronectine, protéine de la MEC (450).

La migration des neutrophiles humains à travers une couche de cellules endothéliales (CE) *in vitro* est diminuée lorsque les CE sont traitées avec un mAc anti-CD47 ou avec sa fraction F(ab')₂ (540). De même que leur migration à travers des cellules épithéliales humaines *in vitro* est diminuée, en présence d'un mAc anti-SIRP- α ou avec une molécule CD47 recombinante soluble se liant à SIRP- α (541), en présence d'un peptide qui se lie à SIRP- α (sur le neutrophile) et empêche sa liaison à CD47 (542) ou encore lorsque les cellules épithéliales sont traitées avec un mAc anti-CD47 (543).

Par ailleurs, l'engagement de CD47 sur les cellules endothéliales par la TSP-1 ou par le peptide de la TSP-1 spécifique de la liaison à CD47, entraîne une augmentation par ces cellules de l'expression des molécules d'adhérences telles que VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine, sans affecter l'expression des autres molécules d'adhérences comme CD36 et les intégrines β 1 (544). De même, il a été montré que le TNF- α augmente l'expression de ces molécules d'adhérences par le biais de l'augmentation de la synthèse de la TSP-1 et de CD47 par ces cellules endothéliales (544).

A. Cellules dendritiques et monocytes

Les souris CD47-déficientes présentent un défaut de migration des DCs à travers les vaisseaux lymphatiques et l'endothélium vasculaire, mais sans conséquences sur la migration des lymphocytes T et B (545, 546). Seule l'expression de CD47 par les DCs est requise pour leur migration, alors que son expression par les cellules endothéliales ne joue pas un rôle majeur (546). Le défaut de migration des DCs CD47^{-/-} de l'épiderme et du

derme vers les organes lymphoïdes secondaires, que ce soit en conditions inflammatoires ou non inflammatoires, se traduit par un défaut de stimulation des lymphocytes T, corrélé avec une quasi-disparition des DCs de la zone marginale de la rate (545, 546).

L'interaction CD47/SIRP- α est impliquée dans le recrutement des monocytes. Premièrement, l'expression de SIRP- α par les monocytes semble nécessaire pour traverser l'endothélium vasculaire cérébral (547). Deuxièmement, des mAc anti-CD47 bloquent presque totalement la migration des monocytes à travers l'épithélium alvéolaire, indépendamment de leur fixation sur le CD47 exprimé par les monocytes ou les cellules épithéliales (548).

De manière intéressante, une étude rapporte que la surexpression de SIRP- α par une lignée cellulaire de monocytes THP-1 (Human acute monocytic leukemia cell line) s'accompagnait d'une réduction de l'expression des β 2 intégrines, qui se traduisait par une diminution de l'adhérence et la migration cellulaire (549). D'autre part, la lamina élastique inhibe l'adhésion des monocytes via SIRP- α (550).

De plus, sur la membrane du monocyte, le complexe CD47/ α v β 3 interfère avec la leucodiapédèse en altérant l'interaction des intégrines α L β 2 (LFA1) et α 4 β 1 (sur le monocyte) avec ICAM-1 et VCAM-1 sur l'endothélium, respectivement, nécessaire à la mobilité et la transmigration des cellules (448, 551).

B. Neutrophiles

L'importance de CD47 sur les neutrophiles et les cellules endothéliales est illustrée chez les souris CD47-déficientes, qui succombent rapidement par septicémie après l'inoculation intra-péritonéale d'*E. Coli*, en raison d'un retard de recrutement de polynucléaires neutrophiles (552).

Comme sur les APC, l'expression de CD47 et/ou de SIRP- α par les neutrophiles (PMN) favorise leur migration transendothéliale et transépithéliale *in vitro* (553-555). Ainsi, la migration transendothéliale ou transépithéliale des PMN est restreinte lorsque ces cellules sont traitées avec un mAc anti-CD47 ou avec la fraction F(ab')₂ de l'Ac (540, 543, 556). Le mécanisme d'action paraît comprendre une réorganisation du cytosquelette d'actine via l'activation d'une tyrosine kinase. Il semblerait aussi que CD47 à la surface des neutrophiles puisse se lier en *cis* à SIRP- α et réguler ainsi la migration des PMN par des mécanismes non élucidés à ce jour (541, 542). La présence de CD47 sur la même membrane cellulaire que SIRP- α semble requise pour son activation (SIRP- α), en favorisant une meilleure adhérence des cellules myéloïdes via l'activation des intégrines (494).

De même, l'expression de SIRP- α sur les PMN facilite aussi leur migration à travers l'engagement de CD47 exprimé sur la membrane latéro-basale des cellules endothéliales et épithéliales. La migration des neutrophiles à travers des cellules épithéliales-CD47 déficientes est augmentée après transfection avec CD47 (556). Par ailleurs, l'expression de CD47 par la cellule épithéliale est accrue après exposition à un stimulus inflammatoire et au cours de la colite inflammatoire expérimentale (554, 556). SIRP- α régule la migration des neutrophiles via l'activation de SHP-1/SHP-2, par un mécanisme PI3K dépendant et tyrosine kinase indépendant. De plus, les antagonistes de SIRP- α entraînent une inhibition de la migration des neutrophiles plutôt qu'un retard de migration attribué à CD47 (541). SIRP- α est surtout localisé au niveau des granules secondaires des neutrophiles, et n'est fortement exprimé qu'après stimulation des cellules. Le même phénomène est observé avec les cellules neuronales (414, 442).

À noter qu'un homodimère de SIRP- β , exprimé constitutivement sur les neutrophiles favorise également la migration cellulaire sans que son ligand soit encore connu (414).

Le complexe CD47/ $\alpha v\beta 3$ est également impliqué dans l'adhérence et l'attraction des polymorphonucléaires, qui se lient à différents ligands cellulaires ou de la matrice extracellulaire (MEC) portant la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) (450, 534, 557, 558). En effet, les cellules neutrophiles déficientes en CD47 présentent un défaut d'activation en réponse à la liaison d' $\alpha v\beta 3$ par les protéines de la MEC telle que la vitronectine (552).

C. Lymphocytes T et B

L'expression de SIRP- γ par les lymphocytes T humains est requise pour leur migration transendothéliale (559). Par ailleurs, les lymphocytes T de souris présentent également une migration transendothéliale grandement diminuée au cours d'expériences *in vitro* utilisant des cellules endothéliales CD47-déficientes et ce en dépit du fait qu'une expression de SIRP- α ou γ n'ait pas été démontrée sur ces lymphocytes murins (559). Alors qu'*in vivo* dans un modèle de transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺CD47^{-/-} et CD47^{+/+} dans une souris BALB/c CD47-déficiente, on ne retrouvait pas de différence dans la migration transendothéliale des cellules T (546). Toutefois, l'adhérence des lymphocytes T est au contraire accrue en raison d'une expression augmentée d'ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule 1) par les cellules endothéliales CD47-déficientes (559).

Une étude *in vitro* a également montré que CD47 sans interagir avec SIRP- α , TSP-1 ou des intégrines régulaît l'adhérence et la migration des lymphocytes à travers une couche monocellulaire de fibroblastes exprimant CD47, dans le cadre d'une interaction homotypique (560).

Les TSP-1 et 2 stimulent le chimiotactisme des lymphocytes T par le biais de l'interaction avec $\alpha 4\beta 1$ et la synthèse des métalloprotéinases MMP-7, 9 et 2. En réponse à la TSP, CD47 joue un rôle essentiel mais indirect dans le chimiotactisme et probablement également dans la production de MMP-2 (373). Ainsi, il a été rapporté un recrutement de leucocytes plus important au niveau des tumeurs du sein surexprimant la thrombospondine-1 (561).

L'interaction entre SIRP- α exprimé par les cellules endothéliales vasculaires (CEV) et CD47 sur les lymphocytes B facilite leur adhérence à l'endothélium non préalablement activés (562). L'engagement de CD47 régule la motilité des cellules d'une lignée de lymphocytes B humains et requière l'activité des GTPases de la famille Rho telles que Cdc42 et Rac (563).

2.3.4. Dans la réponse immunitaire adaptative

2.3.4.1. La liaison CD47 – TSP-1

De nombreuses études utilisant la thrombospondine-1 exogène, ses différents peptides, ainsi que des anticorps dirigés contre CD47 ont montré que la TSP-1 exerce une action sur les lymphocytes T via CD47 outre son activité biologique médiée par sa liaison aux intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ (346).

L'engagement de CD47 *in vitro* sur des cellules T humaines naïves isolées de sang de cordon ombilical et activées en condition polarisante inhibe le développement Th1, alors que ces cellules activées en conditions non polarisantes deviennent anergiques avec une synthèse d'IL-2 et une expression de l'IL-2R α inhibées. (564, 565). La TSP-1 soluble inhibe également l'activation précoce des lymphocytes T, l'inhibition dépend du CD47 et du site de liaison de la TSP-1 à l'héparine (566). De plus, des anticorps monoclonaux

solubles anti-CD47 suppriment la réaction lymphocytaire mixte (408, 567). CD47 n'a pas seulement un rôle inhibiteur de l'activation des lymphocytes T, mais peut dans certaines conditions induire l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Ainsi, il a été mis en évidence que certains mAc anti-CD47 immobilisés entraînent l'activation et la plupart induisent la mort des lymphocytes T activés par l'anti-CD3 (568, 569).

De même qu'il est rapporté chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïdes, une expansion des lymphocytes T inflammatoires médiée par les synoviocytes et par l'intermédiaire de l'activité costimulatrice de la TSP-1 via CD47 (570). La TSP-1 active également les lymphocytes T de façon dépendante de l'adhérence à travers l'engagement des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$, toutefois CD47 qui est lié en *cis* à $\alpha 4\beta 1$ inhibe cette activation (372). Les autres récepteurs de la TSP-1, CD36, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha IIb\beta 3$, ne sont pas exprimés sur les lymphocytes T CD4⁺ périphériques (455).

La TSP-1 régule également l'adhérence et la mobilité des cellules T de manière autocrine (346). La TSP-1 est retrouvée à la surface des lymphocytes T sous forme intacte de 175 kDa, mais aussi sous forme de fragments de 130 et 115 kDa. L'expression de la TSP-1 et de la protéine LRP1/CD91 (Lipoprotéine receptor-related protein) est respectivement moindre ou absente sur les cellules T en suspension. Par contre, l'adhérence des lymphocytes T à ICAM-1 ou à la fibronectine via les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ entraîne l'expression de la TSP-1 qui induit à son tour l'expression de la protéine LRP à la surface de la cellule T. Une fois sécrétée, la TSP-1 par son domaine NH2 terminale adhère à la calréticuline (CRT) et à son corécepteur la protéine LRP1/CD91 et par son domaine COOH terminale à CD47 sur la surface membranaire de la cellule T (369). Ce complexe moléculaire formé par la TSP-1 endogène et CD47 à la surface de la cellule T favorise la mobilité de la cellule de manière autocrine. Cette migration est renforcée lorsque les

protéines LRP/CRT s'associent au complexe moléculaire et le stabilise. À la surface des cellules T qui ont adhéré à la fibronectine ou à ICAM-1, le clivage par le Granzyme B ou A, en des fragments de 115 kDa et l'internalisation continue de ces fragments permet donc à la cellule de moduler sa propre migration (369, 571, 572).

De plus, il a été montré que l'engagement de CD47 associé aux radeaux lipidiques se traduit par une polymérisation de l'actine F et une translocation de la protéine kinase C thêta (PKC θ) entraînant une activation synergique des lymphocytes T et la production d'IL-2.

2.3.4.2. La liaison CD47 – SIRP- α /SIRP- γ

L'engagement de CD47 exprimé sur les lymphocytes T par un mAc anti-CD47 ou par SIRP- α entraîne une diminution de la réponse à l'IL-12 (mais non à l'IL-2) associé à une réduction de l'expression de IL-12R β 1 et β 2, se traduisant par une baisse de la production d'IFN- γ (488). Par ailleurs, la liaison de SIRP- α exprimé sur les DCs au CD47 à la surface des cellules T ou NKT, favoriserait un meilleur contact intercellulaire T/APC et donc une plus forte stimulation (573, 574).

CD47 a également pour ligand SIRP- γ sur les lymphocytes T humains (447). SIRP- γ ne possède pas de portion intracytoplasmique et favorise l'adhérence entre les cellules présentatrices d'antigène qui expriment CD47 et les cellules T qui expriment SIRP- γ , entraînant l'activation et la prolifération des lymphocytes T (575). Chez l'humain la TSP-1, exprimée sur les lymphocytes T, peut entrer en compétition en *cis* avec SIRP- γ pour la liaison au CD47 membranaire des APC se traduisant par une activation altérée ou impossible des lymphocytes T.

Résultats

1. Article I

Résumé Article I

L'interaction Thrombospondine/CD47: une voie pour générer des lymphocytes T régulateurs à partir de cellules humaine CD4⁺CD25⁻ en réponse à l'inflammation.

Les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ générées dans le thymus (nTreg) sont essentielles pour maintenir la tolérance immunologique aux antigènes du soi. Quels sont les facteurs critiques requis pour le développement de lymphocytes T régulateurs en dehors du thymus demeure une question importante. Dans cette étude, nous avons montré que la thrombospondine-1 une protéine anti-inflammatoire de la matrice extracellulaire, induit des cellules T régulatrices humaines à travers l'association à l'un de ses récepteurs, la molécule CD47. L'activation de CD47 par un mAc ou par un peptide dérivé de la thrombospondine-1 induisait des cellules T régulatrices suppressives à partir de cellules T CD4⁺CD25⁻ naïves ou mémoires. Ces cellules exprimaient un niveau plus élevé de CTLA-4, OX40, GITR et Foxp3 et inhiberaient les cellules Th0, Th1 et Th2. Leur activité régulatrice était contact-dépendante et TGF- β -indépendante, et partiellement contrecarrée par l'IL-2. Ce mécanisme non-décrit précédemment d'induction de cellules T régulatrices humaines en périphérie en réponse à l'inflammation, pourrait permettre de limiter d'éventuels dommages collatéraux conséquence d'une réponse immunitaire exagérée contre un antigène du soi ou étranger et avoir des implications thérapeutiques dans les maladies auto-immunes et la transplantation.

Ma contribution représente 50% du travail expérimental.

Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻T cells in response to inflammation

The Journal of Immunology, 2006, 177:3534-3541

Philippe Grimbert^{*†}, Salim Bouguermouh^{*†}, Nobuyasu Baba^{*‡}, Toshiharu Nakajima[‡], Zoulfia Allakhverdi[§], Deborah Braun^{*¶}, Hirohisa Saito^{***}, Manuel Rubio^{*}, Guy Delespesse[§] and Marika Sarfati^{*}.

* Immunoregulation and § Allergy Laboratories, Centre Hospitalier de l'Université de Montreal, Research Center. Hospital Notre-Dame, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada

‡Laboratory for Allergy Transcriptome, Institute for Physical and Chemical Research, Research Center for Allergy and Immunology, Tokyo, Japan.

¶Current address: Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

***Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

†The two authors contributed equally to this work.

Financial support: This project was supported by the Canadian Institute for Health and Research (CIHR, MOP-4490). Philippe Grimbert was sponsored by the French Society of Transplantation

Corresponding author

Marika Sarfati, MD, PhD

Immunoregulation Laboratory

Centre Hospitalier de l'Université de Montreal, CHUM

Hôpital Notre-Dame (Pavillon Mailloux, M4211K)

1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada.

Phone: (514) 890-8000

Fax: (514) 412-7652 Email: m.sarfati@umontreal.ca

Key words: thrombospondin, regulatory T cells, CD47.

Running title: TSP/CD47 interactions induce regulatory T cells

Abstract

Thymus-derived CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells (Tregs) are essential for the maintenance of self-tolerance. What critical factors and conditions are required for the extra-thymic development of Tregs remains an important question. Here we show that the anti-inflammatory extracellular matrix protein, thrombospondin-1 (TSP), promoted the generation of human peripheral regulatory T cells through the ligation of one of its receptors, CD47. CD47 stimulation by mAb or a TSP peptide induced naïve or memory CD4⁺ CD25⁻ T cells to become suppressive. The latter expressed increased amounts of CTLA-4, OX40, GITR and *Foxp3* and inhibited autologous Th0, Th1 and Th2 cells. Their regulatory activity was contact-dependent, TGF-β-independent and partially circumvented by IL-2. This previously unknown mechanism to induce human peripheral Tregs in response to inflammation may participate to the limitation of collateral damage induced by exacerbated responses to self or foreign Ags and thus be relevant for therapeutic intervention in autoimmune diseases and transplantation.

Introduction

Control of self-reactive T cells by “naturally occurring” CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) mediates peripheral T cell tolerance and prevention of auto-immunity (1, 2). *In vitro*, Tregs are anergic and suppress the activation and proliferation of naïve T cells in a non- Ag-specific, but contact-dependent manner (3). *In vivo* proliferation of Tregs, together with their migration to inflammatory sites increases their potential function for the control of pathogen-specific effector T cells in sites of inflammation as well as tumor-specific T cells (4-6). *Foxp3*, a member of the forkhead family of transcription factors encoding the protein scurfin, is a master gene controlling the development and the function of Tregs (7, 8). Scurfy mice and humans with IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy) syndrome have a loss-of-function mutation of *Foxp3*, and develop severe autoimmune and inflammatory diseases (9). Adoptive transfer of Tregs from wild-type littermate into *sf* mice prevents development of the disease. Although there is no doubt that Tregs are generated within the thymus during normal T cell development, the peripheral conversion of CD4⁺CD25⁻ T cells into regulatory T cells and their Ag-specific expansion has been recently demonstrated (10, 11). Such Tregs are distinct from the *in vitro* -induced “adaptive” regulatory T cells, that mainly include Tr1 and Th3 cells (1, 12, 13). Tr1 cells are *Foxp3*⁻ (14) and differ from Tregs by their pattern of cytokine production (IL10 and/or TGF-β, respectively) and their mode of suppression (*in vitro* contact-independent inhibitory function). An important question is, which of the endogenous receptors and/or cytokines convert extrathymic naive *Foxp3*⁻ CD4⁺CD25⁻ T cells into Tregs expressing *Foxp3*. Recent reports indicate that minute Ag dose turns on *Foxp3* in murine naive CD4⁺CD25⁻ T cells and converts them into regulatory T cells.

TGF- β and IL-2 favor their peripheral conversion (15-17). Similarly, TGF- β induces human CD28⁻ and TCR-stimulated CD4⁺CD25⁻ T cells to acquire the function and phenotype of Tregs (18). In fact, TGF- β plays a critical role in the development, function and survival of Tregs (19-21).

Thrombospondin-1 (TSP) is a potent anti-inflammatory molecule, which is rapidly and transiently released at high concentrations in injured and damaged tissues even in the absence of pathogen (22, 23). TSP, predominantly secreted by platelets and APC, inhibits angiogenesis, tumor cell growth and promotes apoptosis (24). Notably, TSP is composed of several structural domains that specifically interact with a range of cellular receptors differentially expressed by a variety of cells (24), which could explain its broad spectrum of biological activities. For instance, TSP exerts both stimulatory and inhibitory effects on T cells via two TSP receptors, i.e. $\alpha 4\beta 1$ and CD47 respectively. However, intact TSP is predominantly an inhibitor of TCR signal transduction (25) and IL-12 responsiveness of naïve and adult T cells (26, 27). Most relevant to the present study, TSP is the main activator of TGF- β (28). As such, TGF- β and TSP null mice display a similar phenotype, persistent inflammation in multiple organs (28). Thus, TSP displays at least two essential properties required to dampen inflammation. It inhibits pro-inflammatory cytokine secretion by APC (29) and facilitates the removal of apoptotic cells by phagocytes (30).

We previously reported that CD47 ligation induces naïve T cell anergy (31). We here provide evidence that interaction between CD47 on activated CD4⁺CD25⁻ human T cells and CD47-specific TSP peptide promoted the generation of CD4⁺*Foxp3*⁺T cells that suppressed the proliferation and cytokine production of autologous Th0, Th1 and Th2 cells via a contact-dependent mechanism. The induction of extra-thymic regulatory T cells in response to TSP represents a third mechanism whereby TSP may interfere with the

inflammatory process, thus identifying CD47/TSP as potential targets for the development of anti-inflammatory drugs.

Materials and Methods

Reagents.

Anti-CD3 mAb (UCHT-1) was provided by Dr C. Hivroz (Institut Curie, Paris, France). The CD32/B7.1 double-transfected mouse L fibroblasts have been previously described (31). The 4N1K peptide (KRFYVVMWWKK) corresponding to the C-terminal domain of TSP that selectively binds CD47 and the mutant 4NGG peptide (KRFYGGMWKK) were obtained from Genosys (The Woodlands, TX). 4N1K sequence is highly conserved in all TSP family members (32). CD47 mAb, (clone B6H12, mouse IgG1, Biosource, Montreal, Quebec, Canada) was used in soluble form. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Human soluble TGF- β RII was obtained from R&D Systems (Mineapolis, MN).

Cell preparation and culture conditions.

The procedure of blood collection from human volunteers has been reviewed and approved by CHUM ethic and research committees. Umbilical cord blood mononuclear cells (CBMC) and PBMC from normal healthy volunteers were isolated by density gradient centrifugation of heparinized blood using Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Naive CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were selected from CBMC by depletion of CD8⁺ cells (Easysep kit, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) followed by negative selection using CD25 microbeads (Miltneyi-Biotec). For adult naïve CD45RA⁺CD4⁺CD25⁻ T cells, we performed an additional depletion using CD45RO

microbeads. Memory CD4⁺ T cells were obtained by CD8 depletion (Stem cell technologies) followed by negative selection with CD25 and CD45RA microbeads. Purity was determined to be greater than 97 % CD4⁺CD25⁻ by FACS analysis.

The differentiation of naïve T cells into Th0, Th1, Th2 cells was performed as previously described (31). Briefly, CBMC were cultured with PHA (1µg/ml) in neutral conditions or in the presence of IL-12 (60pM) and anti-IL-4 mAb (1µg/ml) or a combination of IL-4 (20ng/ml) and anti-IL-12 (5µg/ml) respectively together with soluble CD47mAb (10µg/ml) and soluble 4N1K or 4NGG (50µg/ml). After 3 days, cells (more than 98% CD3 positive cells) were washed and expanded for 9-12 days in cultured medium supplemented with IL-2. To assess cell division during expansion in IL-2, cells were labeled with CFSE at the end of the primary cultures. Cells were then washed and restimulated at 2×10^5 cells/ml with anti-CD3 (200ng/ml) immobilized on mitomycin C - treated double CD32/B7.1 L-transfectants (2×10^5 cells/ml). Purified naïve CD4⁺CD25⁻ T cells were isolated from CBMC and primed with anti-CD3 (1 µg/ml) in the presence of IL-1 (10 ng/ml) and TNF- α (25 ng/ml). After 3 days, cells were expanded in medium supplemented with IL-2 and restimulated as described above. Cell proliferation was determined by adding 1µCi ³H thymidine (Amersham) during 6h of 2 days culture. IFN- γ and IL-10 were measured by ELISA after 48h restimulation as described (31). For TGF- β detection, T cells were restimulated for 72h in synthetic HB101 serum-free medium (Irvine Scientific, Somagen, Canada).

Memory CD4⁺CD25⁻ T cells (0.5×10^6 cells/ml) were activated with plate-bound anti-CD3 mAb (10 µg/ml) alone or with soluble anti-CD28 (0.5 µg/ml) (BD Pharmingen) in the presence or absence of CD47 mAb (10 µg/ml) in 96-well flat-bottom microplates. After 4 days priming, cells were washed and expanded (1×10^6 cells/ml) in 24-well plate

for 7 days in the presence of anti-CD3 mAb (0.1 $\mu\text{g/ml}$) immobilized on CD32 L-transfectants (8×10^4 cells/ml) and IL-2 (200 IU/ml). At day 4, 1 ml of complete medium supplemented with IL-2 (400 IU/ml) was added to the culture. T cells were collected and re-stimulated weekly. After three rounds of expansion, memory T cells were rested for 48 hours in complete medium with IL-2 before examining their regulatory activity.

Suppression assays

Tas (1×10^5 cells/ml) generated from CBMC, CD25⁻CBMC and umbilical naïve CD4⁺CD25⁻ T cells were cocultured with autologous Th0, Th1 or Th2 cells at 1:1 ratio unless otherwise indicated. Cultures were stimulated for 48 to 72h with anti-CD3 (50 ng/ml) immobilised on mitomycin C treated double CD32/B7.1 L-transfectants fibroblasts ($1-2 \times 10^5$ cells/ml). To determine their mode of suppression, Tas and Th0 or Th1 were physically separated using Transwell culture system (BD, Bioscience). In some experiments, the regulatory function of Tas was assessed as follows: freshly isolated purified CD4⁺ responder T cells ($1 \times 10^5/\text{ml}$) were CFSE labelled and co-cultured with autologous unlabelled purified CD4⁺ T cells or allogeneic expanded naïve or memory regulatory T cells at 3/1 ratio.

Flow cytometry analysis

Cells were stained with FITC-, PE-, PerCP-conjugated CD4, CD25, CD28 mAb, Granzyme A, Fas, FasL, biotinylated CD47, OX40- conjugated mAbs followed by APC-streptavidin (B.D Bioscience, Mountain View, CA), APC-Granzyme B (Caltag, Burlingame, CA), PE-coupled GITR mAb, PE-TGF- β chicken Ab (R&D Systems, Minneapolis, USA) or isotype-matched control Abs (B.D Bioscience). Cells were

analyzed using a FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). For intracytoplasmic staining, cells were fixed with 1% PFA for 10 min at room temperature, washed and stained in permeabilizing buffer (PBS containing 0.03% saponin) with PE-conjugated CTLA-4 (B.D Bioscience). To detect intracytoplasmic Foxp3 expression, cells were first fixed and then stained with PE-anti-human Foxp3 mAb (e-biosciences, San Diego, USA) in permabilizing buffer for 30 minutes at 4⁰ C.

Foxp3 mRNA analysis.

RNA was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) and 1µg of each sample was reversed transcribed using SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, USA). For real-time quantitative PCR (TaqManTM), message levels were quantified using the ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). The quantitative PCR reaction was performed using TaqMan universal PCR master Mix (PE Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Relative expression of each sample was determined by normalizing expression of each target to GAPDH, and then comparing this value to the normalized expression in a reference sample to calculate a fold-change value. The values for samples were calculated by ddCT method. *Foxp3* quantitative analysis was performed using Assay on Demand and GAPDH using pre-developed TaqMan assay reagents target kits (Applied Biosystems).

Results

Induction of human regulatory T cells by CD47/TSP interaction.

Our initial studies indicated that CD47 ligation on naïve T cells promotes the development of anergic T cells that produce very low amounts of cytokines including IL-

2, IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ (31). We here show that the newly generated T cells, hereafter named Tas (for T anergic/suppressor cells), displayed regulatory activity (Fig 1). We started with a well-established model known to induce Th0, Th1 and Th2 cells from cord blood mononuclear cells (CBMC), an abundant source of unmanipulated naïve T cells. CBMC were stimulated with phytohemagglutinin (PHA) in neutral conditions in the absence or presence of irrelevant control (Th0) or CD47 mAb (Tas); after 3 days, more than 98% of the cells in culture were CD3⁺ T cells (31). The cultured T cells were CFSE-labeled, expanded in IL-2 and cell division was examined at day 5 (Fig 1A). Both CD47 mAb-treated CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Tas) underwent less cell division than Th0 cells. In fact, Tas expanded 4 times less and displayed significant lower proliferative response than Th0 to CD3/CD28 co-stimulation (Fig 1B), indicating that CD47 ligation induced a general T cell hypo-responsiveness even after two signals delivery. Tas secreted less IL-10 but similar amounts of TGF- β as compared to Th0 (Fig 1C). They suppressed in a dose-dependent manner the proliferation and production of IFN- γ by autologous Th0 in response to low and high CD3 stimulation (Fig 1D to F). The mean % reduction in Th0 proliferation and IFN- γ production in presence of Tas in five experiments was 65% and 73%, respectively.

TSP, the natural ligand of CD47 is a multifunctional molecule containing several structurally and functionally distinct domains (24). Since T cells express a second TSP receptor, $\alpha 4\beta 1$, we studied the 4N1K peptide that corresponds to the C-terminal domain of TSP and selectively binds CD47 as ligand. CBMC were stimulated with PHA in the presence of 4N1K (Tas) or irrelevant control peptide 4NNG (Th0), washed and expanded with IL-2. CD47/4N1K interactions on primary naive cells promoted the generation of regulatory T cells (Th0 + Tas). The 4NNG-treated cells lacked suppressive function

(2xTh0 cells) (Fig 1G). These data strongly suggested that CD47 mAb, as previously reported, exert an agonistic activity mimicking the natural CD47 ligand, TSP.

Contact-dependent and TGF- β -independent regulatory function of Tas.

Effector T cells are refractory to the suppressive activity of Tregs in the presence of IL-4 (33). We here showed that Tas inhibited IL-4 and IFN- γ production as well as cell proliferation of autologous Th2 and Th1 cells, respectively (Fig 2A and B). We next attempted to explore the mechanisms implicated in Tas regulatory function and found that the suppression of autologous T cells was contact-dependent (Fig 2B). Accordingly, Tas did not suppress the proliferation and cytokine production when separated from their targets by a semi-permeable membrane.

Murine Tregs regulatory function is contact-dependent and exogenous IL-2 abrogates the suppression of proliferation but not cytokine production of T effector cells in a co-cultures system (34). IL-2 circumvented Tas inhibition of Th0 cell proliferation and IFN- γ production. However, IL-2 strongly augmented IFN- γ production and Th0 + Tas cells still produced significantly less IFN- γ than Th0 cells (Fig 2C).

Some studies report that Tregs exert their suppressive function through endogenous TGF- β , expressed as a membrane-bound or secreted molecule. Also, TSP is the main activator of TGF- β through its type1 repeat and not its C-terminal domain (28). We here showed that Th0 and Tas produced similar amounts of TGF- β (Fig 1C). It was still relevant to examine whether the CD47-induced regulatory function was mediated by active TGF- β . The inhibitory function of Tas was not overcome by soluble TGF- β IIR pointing out to a TGF- β -independent mode of suppression (Fig 2D). Our unpublished observations indicated that Tas regulatory function was not altered by the addition of IL-1

or IL-6, known to abrogate the suppressive function of murine Tregs (35) and that neutralization of TGF- β and IL-10 in the induction phase (CBMC primary cultures) did not preclude suppressive function of the expanded Tas. Thus, the development of Tas following CD47/4N1K did not require the presence of the TGF- β and IL-10, known to convert naïve T cells into adaptive Tregs and/or Tr1.

Activated phenotype and Foxp3 expression by Tas.

We next examined the phenotype of Tas and compared it to that of Th0 cells. As expected from activated T cells, CD4⁺ Th0 cells expressed the three conventional markers of Tregs, i.e. GITR, CTLA-4, OX40 (Fig 3A and C). However, the expression of these three molecules was significantly up-regulated in CD4⁺ Tas. Tas did not express significant amounts of membrane TGF- β , Latency-associated peptide of TGF- β (LAP) nor TSP (not shown), further corroborating with their TGF- β -independent suppressive function. They expressed similar quantities of CD25, CD28 and CD47 to Th0 cells. Since the suppression of Th0 by Tas was contact-dependent, we examined the expression of mediators of cytotoxicity. CD4⁺Tas expressed similar amounts of Fas and Granzyme A to Th0 and no significant amount of FasL and Granzyme B (Fig 3B).

Foxp3 is considered to be the hallmark of Tregs and we found an increased proportion of CD4⁺CD25⁺*Foxp3*⁺ cells in Tas when compared to Th0 (Fig 3D). In keeping with recent observations, Th0 were comprised of a mixture of CD4⁺CD25⁺*Foxp3*⁻ effectors and CD4⁺CD25⁺*Foxp3*⁺ T cells (11). We confirmed the upregulation of *Foxp3* expression by quantifying mRNA in Th0 and Tas using real-time PCR (Fig 3D). Tas displayed a threefold increase in *Foxp3* mRNA when compared to Th0. Also, *Foxp3*

mRNA expression was higher in freshly isolated and highly purified $CD4^+CD25^+$ than $CD4^+CD25^-$ cord blood T cells confirming that *Foxp3* was indeed expressed in naive $CD4^+CD25^+$ T cells in humans (36, 37).

Conversion of naive $CD4^+CD25^-$ naive and memory T into regulatory T cells by CD47 ligation.

Thus, one could argue that CD47 ligation exclusively expanded the proliferation of pre-existing naive $CD4^+CD25^+$ Tregs present in CBMC. As a first approach, we used CBMC depleted in $CD25^+$ cells (CBMC $CD25^-$) and showed that, in the absence of naive $CD4^+CD25^+$ Tregs, CD47 ligation promoted the development of regulatory T cells (Fig 4A). These data suggest that induction of Tregs occurred by engaging CD47 on $CD45RA^+CD25^-$ T cells and did not require the presence of naive $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs in the starting cultures. However, we did not exclude the possibility that CD47/TSP interactions might as well favor the expansion of thymus-derived Tregs.

So far, we showed that ligation of the TSP receptor on unfractionated CBMC promoted the generation of regulatory T cells enriched in $GITR^+OX40^+CTLA-4^+CD4^+$ T cells and $CD4^+Foxp3^+$ T cells. We also observed an increased proportion of Fas^+ $GranzymeA^+GranzymeB^+CD8^+$ T cells in the CD47 mAb-treated cell preparations (Fig 3B). In fact, the CD47-induced enriched Treg population displayed no cytolytic function on autologous target cells or K562 leukemic cell lines (data not shown) while the $CD4^+$ T cells isolated at the end of Treg expansion in IL-2 (the proportion ranges from 28 to 70% in different blood samples), displayed a similar suppressive function to the non-separated

Tas cell preparation (Fig 4B). Notwithstanding, these data did not rule out a requirement for CD8⁺ T cells at the initial phase of CD4⁺ Tas induction.

We therefore determined whether direct CD47 engagement on purified naïve CD4⁺CD25⁻ T cells converted them into regulatory T cells. Indeed, TSP inhibits DC maturation and T cell activation and thus may exert its effect either on DC and/or on T cells to induce CBMC-derived Tas (25, 38). To this end, purified CD45RA⁺CD4⁺CD25⁻ T cells, that did not express *Foxp3* mRNA (Fig 3D), were stimulated with anti-CD3 in the presence of CD47 mAb or 4N1K peptide. Naïve T cells absolutely require a co-stimulatory signal for their initial activation but CD28 costimulation prevents CD47-induced anergy in naïve T cells(31). We thus supplemented the CD3-activated naïve T cells with IL1-β and TNF-α (39), a context mimicking inflammatory conditions whereby TSP is abundantly produced *in vivo*. CD47 ligation on activated purified naïve CD4⁺CD25⁻T cells promoted the development of Tas that suppressed IFN-γ production of autologous Th0 cells and expressed increased amounts of *Foxp3* when compared to Th0 generated in the presence of control mAb or 4NNG peptide (Fig 4C). To ascertain the suppressive function of Tas on the target cells, we independently investigated the proliferation of the latter, using CFSE-labeled and flow cytometry. Tas generated from adult naïve CD4⁺CD25⁻T cells significantly inhibited cell division of allogeneic adult CD4⁺T cells as measured by CFSE dilution (Fig 4D). Finally, CD47 ligation induced adult CD3-stimulated CD4⁺CD25⁻ memory T to become suppressor cells (Fig 4E). However, in this particular case, memory T cells required repetitive stimulation with anti-CD3 and IL-2 to become efficient regulatory T cells. Again, Tas suppressive function was contact-dependent under these experimental conditions (data not shown). In humans and

mice (11, 40), CD28 allows the peripheral conversion of CD4⁺CD25⁻T cells into regulatory T cells. Here we confirmed these observations (Fig 4E, right panel). However, CD28 co-stimulation at priming impaired CD47-induced T_{as} development from memory T cells, in agreement with the impairment of anergy induction in naïve T cells (31).

Taken together, our data demonstrate that interaction between a CD47-specific TSP peptide and CD47 on human naïve (cord blood or adult) and memory CD4⁺CD25⁻T cells promoted the generation of regulatory T cells that were enriched in CD4⁺*Foxp3*⁺ and exerted their suppressive function in a contact-dependent manner.

Discussion

Our present findings identified TSP, a protein rapidly and transiently expressed at high levels in inflamed and damaged tissues, as an inducer of human peripheral regulatory T cells. The latter were hypo-responsive to CD3 and CD28 co-stimulation, produced small quantities of cytokines and suppressed the proliferation and cytokine production by autologous Th0, Th1 and Th2 cells in a contact-dependent manner. These adaptive Tregs expressed an activated phenotype as well as increased amounts of *Foxp3*. As such, the CD47-induced Tregs resemble naturally occurring thymus-derived Tregs. However, T_{as} exhibited distinct features: they expressed similar amount of CD25 to Th0, did not display granzyme B expression nor a cytolytic function. The induction of adaptive Tregs by TSP during an inflammatory process is reminiscent of recent findings showing that CD46 ligation by the C3b complement fragment induces the development of cytotoxic Tr1. The latter express substantial amounts of granzyme B (41, 42). Also, Tr1/IL-10-induced Tregs lack *Foxp3* expression and do not require cell-cell contact to exert their regulatory function *in vitro* (14, 43). T_{as} thus differed from CD46 mAb- or IL-10-induced Tregs by

phenotype, cytokine profile and mode of suppression (13, 44). TSP is produced by immature and mature DC (29). Immature DC are described as tolerogenic (45) in that they induce T cells that secrete large quantities of IL-10 and suppress the proliferation of autologous freshly isolated PBMC in a contact-dependent manner (44). Interestingly, prostaglandin E₂ (PGE₂) is a potent inducer of TSP in DC (29) and induces *Foxp3* on human CD4⁺ T cells that display contact-independent regulatory function (46).

We here provided evidence that CD47 ligation converted naive or memory CD4⁺CD25⁻T cells into CD4⁺*Foxp3*⁺ T cells. CD4⁺CD25⁺*Foxp3*⁺ regulatory T cells are thymus-derived and now designated “endogenous Tregs” or “natural Tregs,” but increasing evidence in mice and humans indicate that CD4⁺CD25⁺*Foxp3*-expressing T cells may be very efficiently induced outside the thymus. The induction of peripheral adaptive Tregs is often proven to be TGF-β- mediated (15, 18, 47). In that regard, *Foxp3*⁺Tregs are rapidly induced following blood-stage infection with malaria sporozoite and their presence is associated with a burst of TGF-β production, decreased pro-inflammatory cytokine production and antigen-specific immune responses (48). Since TSP is an important activator of TGF-β, it was relevant to demonstrate that TSP (i.e. 4N1K peptide) might promote the generation of CD4⁺ regulatory T cells via its direct interaction with CD47 and Tsp suppressive function was TGF-β-independent.

Selective expression of the *Foxp3* gene in naturally occurring Tregs during thymic development is not sufficient to protect otherwise *Foxp3* null mice from developing disease (9, 49). This suggests that continued peripheral expression of *Foxp3* is required to control disease. Again, TGF-β participates to the maintenance of peripheral *Foxp3* expression (21) and the present results suggest that intact TSP may directly or indirectly contribute to this process *in vivo*. Nevertheless, while *Foxp3* expression is definitely

required to confer suppressive activity in murine Tregs (7), it may not be sufficient for the function of human Tregs isolated from healthy donors or patients suffering from multiple sclerosis or autoimmune polyglandular syndrome type II (50, 51). The latter express similar amounts of *Foxp3*, CTLA-4 and TGF- β to Tregs from control donors.

TSP is endowed with potent anti-inflammatory activities at steady state and under inflammatory conditions. *In vivo*, using a cell-based gene therapy in a mouse model of rheumatoid arthritis, TSP acts by suppressing the IL-1 β and enhancing the TGF- β production (52). We here propose that TSP that is produced in the LN (mainly by mDC) may convert naïve CD4⁺CD25⁻T cells into regulatory T cells that negatively control the inflammatory processes either in lymphoid organs and/or in sites of inflammation. Increased recruitment of naturally occurring Tregs combined with peripheral conversion of naive T cells appear to occur *in situ* when exacerbated inflammation takes place, for instance in joints of rheumatoid arthritis patients (53). However, the molecules involved in Tas migration to tissues remain to be determined. The CD103 Ag, predominantly expressed by CD25⁻ and CD25⁺ murine Tregs with suppressive properties (54), is induced by TGF- β (55) and involved in the retention of Tregs to the inflammatory sites (56). CCR4 and CCR8 are also expressed on human Tregs (57). Our unpublished observations indicate that Tas, like freshly isolated human Tregs (58), do not express significant levels of CD103 and displayed similar amounts of CCR7, CCR4 and CCR8 to Th0. Finally, TSP, also secreted at peripheral sites in response to inflammation, might further dampen the inflammatory process by down-regulating DC maturation via at least three receptors: CD47, CD51 and CD36 (38) as well as facilitating the engulfment of damaged tissues and cells.

Therefore it can be hypothesized that TSP, akin to TGF- β and IL-10, when released in the context of an inflammatory response, promotes the generation of peripheral regulatory T cells that keep in check the inflammatory process and avoid collateral damage induced by self or foreign Ags. After renal allograft, TSP, TGF- β and *Foxp3* mRNA are increased (23, 59). Surprisingly, the latter are significantly correlated with acute rejection and high levels of *Foxp3* transcripts predict an acute rejection reversal. Finally, *ex vivo* induction and expansion of human suppressor T cells by CD47 mAb, as recently proposed for CD45RO/RB mAb (60), may open avenues to design strategies for the treatment of graft rejection, inflammatory and autoimmune diseases.

Figures and Figure legends

Figure 1. Induction of T anergic/suppressor cells Tas by CD47/TSP interactions.

CBMC were stimulated with PHA (1 μ g/ml) in the presence of anti-CD47 or control mAb (each at 10 μ g/ml) for 3 days and expanded in IL-2. **(A)** Cells were labeled with CFSE after priming, expanded in IL-2 for 5 days and then stained with CD4 mAb before FACS analysis. **(B-C)** Cells were collected at day 9, washed and restimulated in HB101 serum-free medium for 3 days with anti-CD3 mAb (200 ng/ml); the IL10 and TGF- β production was detected by ELISA in the same cell preparation. Data are the mean \pm SD of 9 experiments. **(D-G)** Regulatory activity of Tas. **(D and E)** Target cells (Th0) and Tas were cultured alone (1×10^5) or together at 1:1 ratio and stimulated with graded concentrations of anti-CD3 mAb (50 (dashed column), 100 (open column), 200 (black column) ng/ml). **(E)** Graded numbers of Tas or Th0 were added to 2×10^5 /ml Th0 cells. Shown is one representative experiment out of five. **(F)** CD47mAb-induced Tas suppressed the IFN- γ production in Th0. Data represent the mean \pm SEM of 5 experiments. **(G)** 4N1K (TSP peptide selectively binding CD47)-induced Tas suppressed the IFN- γ production in 4NNG (irrelevant control peptide)-induced Th0. Peptides were used at 50 μ g/ml. Panels B, C and F: * $p < 0.05$, paired two-tailed Student's t test.

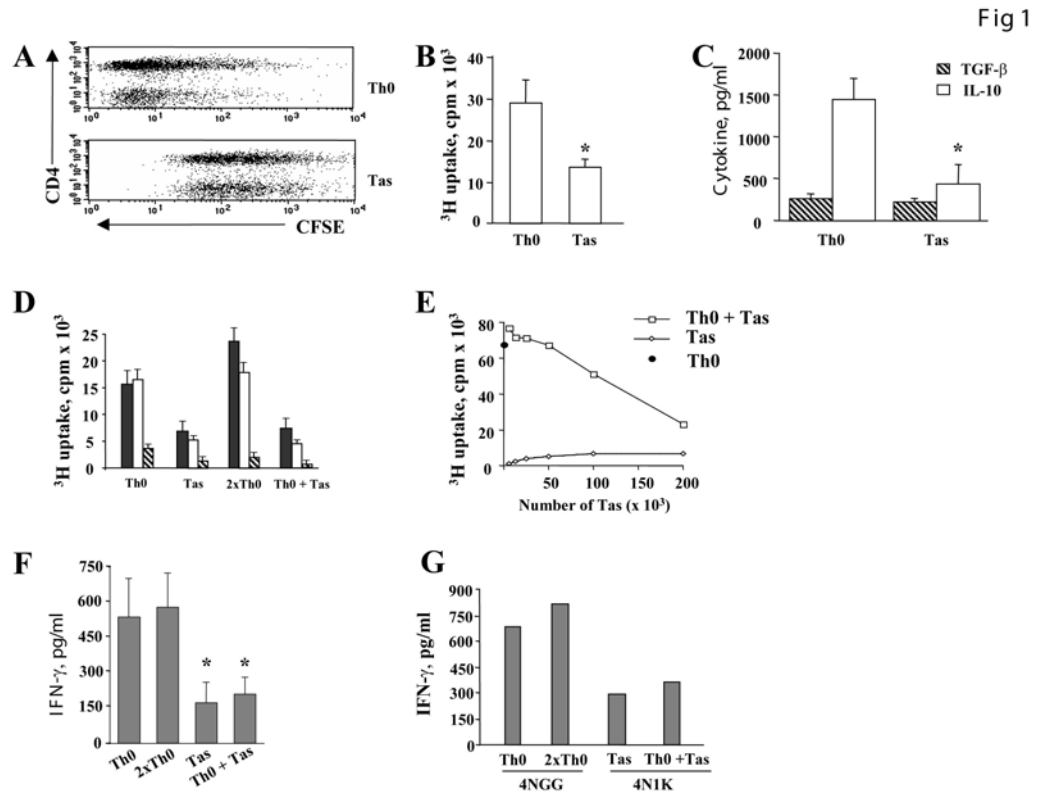


Figure 2. Contact-dependent but TGF- β -independent Tas regulatory function and role of IL-2.

(A) Tas suppressed the proliferation and the production of IL-4 of Th2 cells. **(B)** The suppressive activity of Tas on the proliferation and cytokine production on Th0 and Th1 was contact-dependent; Th0 // TAS or Th1// TAS referred to cocultures where the cells were physically separated in a transwell system. **(C)** IL-2 (100 u/ml) added during cocultures of Tas and Th0 circumvented the inhibition of proliferation but not IFN- γ production by Tas. Data represent mean \pm SEM of five experiments. * $p < 0.05$, Student' t test. **(D)** Tas regulatory activity was not overcome by TGF- β neutralization using soluble-TGF- β RII at 125 μ g/ml. Panels A, B and D, one representative experiment out of 4.

Fig 2

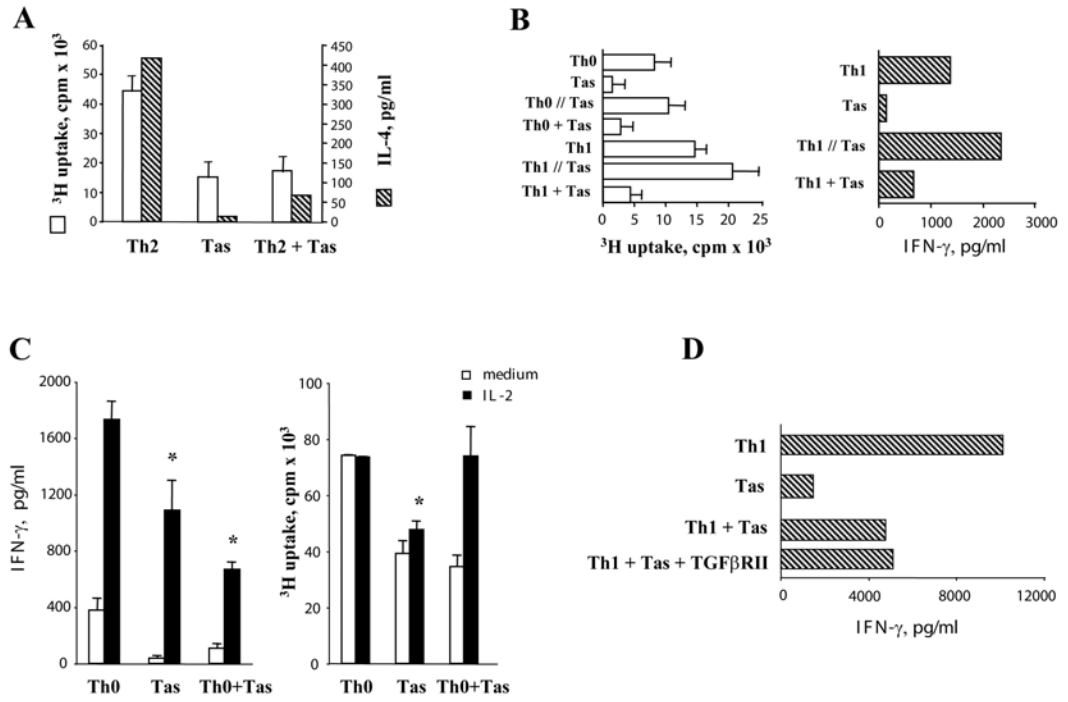


Figure 3. Activated phenotype of Tas and expression of *Foxp3*.

Panels **A-D**. Th0 and Tas were stained for FACS analysis after 9 days of expansion in IL-2. Two-color analysis for the expression of OX40, GITR, CTLA-4, TGF- β , CD25, CD28, and CD47 (**A**) and of FAS, FAS-L, Granzyme A and Granzyme B (**B**) on CD4⁺ cells. Panel (**C**) refers to quadruple labeling with antibodies to CD4, OX40, GITR, and CTLA-4. Shown is the analysis of double positive cells after gating on CD4⁺ T cells. Panel (**D**) refers to *Foxp3* expression analyzed by flow cytometry (left panel) and real-time PCR (right panel). Th0 and Tas were labeled with antibodies to CD4, CD25 (surface staining), then permeabilized, fixed and stained for *Foxp3* (intracellular staining). Shown is the analysis of double positive cells after gating on CD4⁺ T cells. *Foxp3* mRNA was quantified in freshly isolated purified CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺ CD25⁻ umbilical cord blood T cells as well as in Th0 and Tas. (**Panel A-D**) Each single dot plot (double, triple or quadruple staining) is representative of one experiment out of 3. The quadrant labels showed the proportion of single or double positive cells.

Figure 3.

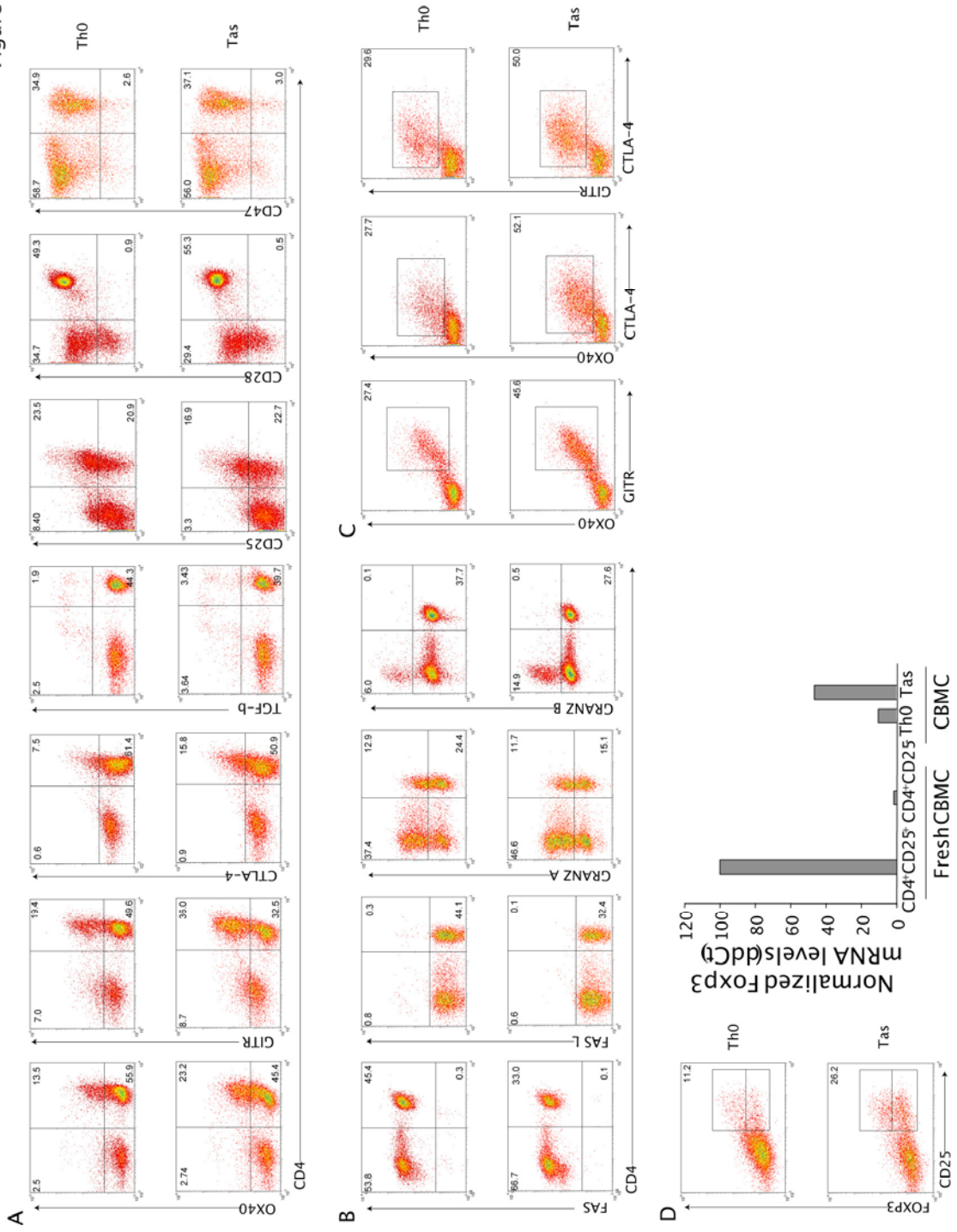
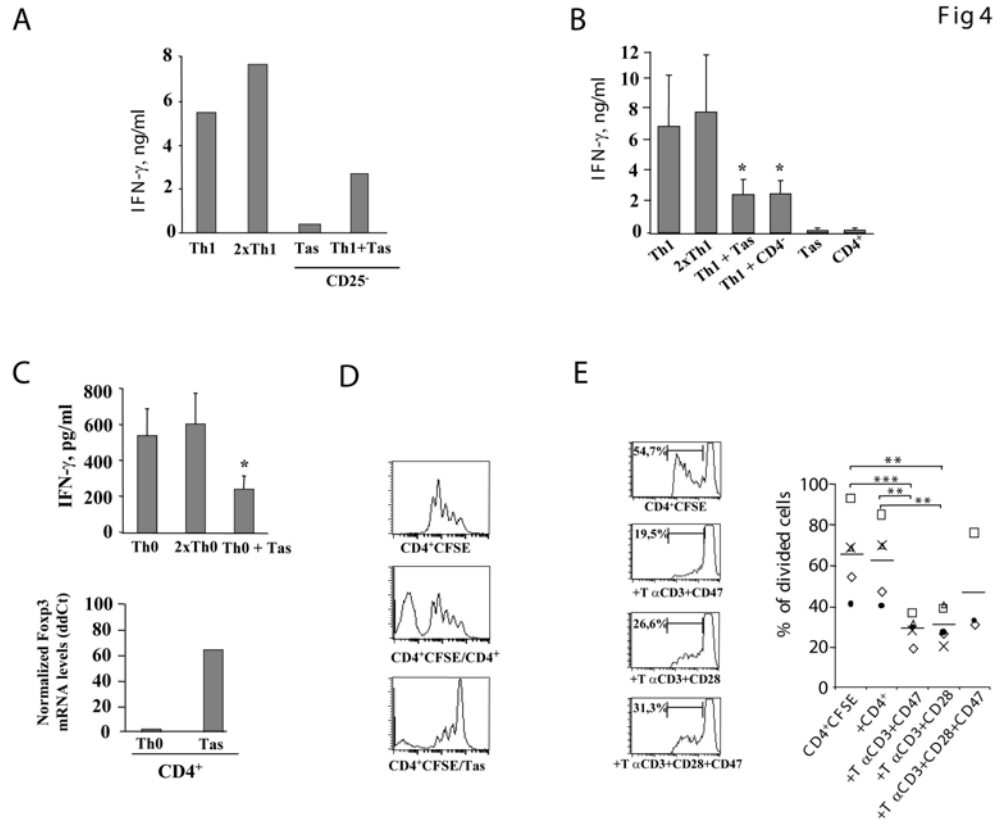


Figure 4. Ligation of TSP receptor directly converts CD4⁺CD25⁻ naïve and memory T cells into *Foxp3*⁺ regulatory T cells.

(A) Tas were obtained from CBMC depleted of CD25⁺ cells (CD25⁻) and stimulated with PHA (1µg/ml) in the presence of anti-CD47 or control mAb (each at 10µg/ml) for 3 days and expanded in IL-2. Tas suppressed the IFN-γ production in Th1. Shown is one representative experiment out of 2 (B) Tas and Th0 cells were obtained as described above except that CD4⁺ T cells isolated at the end of the expansion of in IL-2 (CD4⁺) and compared to Tas. Cells (Tas and CD4⁺) were assessed for their suppressive activity on autologous Th1 cells. Data represent the mean ± SEM of 5 experiments. *p<0.05, Student' t test. (C) Highly purified naïve CD4⁺ CD25⁻ T cells isolated form cord blood were stimulated with IL-1 (10ng/ml), TNF-α (25ng/ml), anti-CD3 (1µg/ml) with or without CD47 mAb (10µg/ml) or 4N1K (50µg/ml) and expanded for 6 days in IL2. Cells were assessed for their suppressive activity on autologous Th0 cells. Data represent the mean ± SEM of 5 experiments, *p<0.05, Student' t test (top panel); Real-Time quantitative PCR analysis of *Foxp3* mRNA in Th0 and Tas. One representative experiment out of 3 is shown (bottom panel). (D) Highly purified naïve CD4⁺ CD25⁻ T cells isolated from adult blood Tas were stimulated as in panel C. Tas were cocultured with freshly isolated CFSE-labeled allogeneic adult CD4⁺ T cells (bottom panel), unlabeled adult CD4⁺ T cells were used as controls (middle panel). (E) Adult memory CD4⁺CD25⁻ T cells were activated on plate-bound anti-CD3 with soluble anti-CD47, anti-CD28 or both mAbs, followed by 3 rounds of expansion and 48 hours rest in medium supplemented with IL-2. Data (gated on CFSE-labeled cells) show the proliferation of CFSE-labeled freshly isolated CD4⁺ T cells co-cultured with memory CD4⁺ T cells activated under three different conditions at 3/1

ratio. Shown is the FACS analysis of one representative experiment out of five (% of divided cells; left panel). Four separate experiments represented by different symbols (right panel). One-way variance analysis test (ANOVA); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



References

1. Bluestone, J. A., and A. K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3:253-7.
2. Shevach, E. M. 2002. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400.
3. Levings, M. K., R. Sangregorio, and M. G. Roncarolo. 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *Journal of Experimental Medicine* 193:1295-302.
4. Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks. 2002. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420:502-7.
5. Walker, L. S., A. Chodos, M. Eggena, H. Dooms, and A. K. Abbas. 2003. Antigen-dependent Proliferation of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells In Vivo. *J Exp Med* 198:249-58.
6. Wang, H. Y., D. A. Lee, G. Peng, Z. Guo, Y. Li, Y. Kiniwa, E. M. Shevach, and R. F. Wang. 2004. Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 20:107-18.
7. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-61.
8. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-6.
9. Ramsdell, F., and S. F. Ziegler. 2003. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 15:718-24.
10. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756-63.
11. Walker, M. R., D. J. Kasprovicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner, and S. F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest* 112:1437-43.
12. Barrat, F. J., D. J. Cua, A. Boonstra, D. F. Richards, C. Crain, H. F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R. L. Coffman, C. M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In Vitro Generation of Interleukin 10-producing Regulatory CD4⁺ T Cells Is Induced by Immunosuppressive Drugs and Inhibited by T Helper Type 1 (Th1)- and Th2-inducing Cytokines. *J. Exp. Med.* 195:603-16.
13. Battaglia, M., and M. G. Roncarolo. 2004. The role of cytokines (and not only) in inducing and expanding T regulatory type 1 cells. *Transplantation* 77:S16-8.
14. Vieira, P. L., J. R. Christensen, S. Minaee, E. J. O'Neill, F. J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D. C. Wraith, and A. O'Garra. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5986-93.
15. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*.
16. Knoechel, B., J. Lohr, E. Kahn, J. A. Bluestone, and A. K. Abbas. 2005. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med* 202:1375-86.
17. Zhang, H., K. S. Chua, M. Guimond, V. Kapoor, M. V. Brown, T. A. Fleisher, L. M. Long, D. Bernstein, B. J. Hill, D. C. Douek, J. A. Berzofsky, C. S. Carter, E. J. Read, L. J. Helman, and C. L. Mackall. 2005. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med* 11:1238-43.
18. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺

- Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-86.
19. Peng, Y., Y. Laouar, M. O. Li, E. A. Green, and R. A. Flavell. 2004. TGF- β regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4572-7.
 20. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell Contact-dependent Immunosuppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-bound Transforming Growth Factor β . *J. Exp. Med.* 194:629-44.
 21. Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1061-7.
 22. Raugi, G. J., J. E. Olerud, and A. M. Gown. 1987. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol* 89:551-4.
 23. Baboolal, K., G. A. Jones, A. Janezic, D. R. Griffiths, and W. A. Jurewicz. 2002. Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int* 61:686-96.
 24. Bornstein, P. 2001. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 107:929-34.
 25. Li, Z., M. J. Calzada, J. M. Sipes, J. A. Cashel, H. C. Krutzsch, D. S. Annis, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2002. Interactions of thrombospondins with α 4 β 1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol* 157:509-19.
 26. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Bidirectional Negative Regulation of Human T and Dendritic Cells by CD47 and Its Cognate Receptor Signal-Regulator Protein- α : Down-Regulation of IL-12 Responsiveness and Inhibition of Dendritic Cell Activation. *J Immunol* 167:2547-5354.
 27. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *Journal of Immunology* 165:4624-31.
 28. Crawford, S. E., V. Stellmach, J. E. Murphy-Ullrich, S. M. 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* 93:1159-70.
 29. Doyen, V., M. Rubio, D. Braun, T. Nakajima, J. Abe, H. Saito, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2003. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med* 198:1277-83.
 30. Bratton, D. L., and P. M. Henson. 2005. Autoimmunity and apoptosis: refusing to go quietly. *Nat Med* 11:26-7.
 31. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *J Immunol* 167:2459-68.
 32. Brown, E. J., and W. A. Frazier. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology*. 11:130-5.
 33. Pace, L., S. Rizzo, C. Palombi, F. Brombacher, and G. Doria. 2006. Cutting Edge: IL-4-Induced Protection of CD4+CD25- Th Cells from CD4+CD25+ Regulatory T Cell-Mediated Suppression. *J Immunol* 176:3900-4.
 34. Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519-23.
 35. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033-6.
 36. Ng, W. F., P. J. Duggan, F. Ponchel, G. Matarese, G. Lombardi, A. D. Edwards, J. D. Isaacs, and R. I. Lechler. 2001. Human CD4(+)/CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98:2736-44.

37. Godfrey, W. R., D. J. Spoden, Y. G. Ge, S. R. Baker, B. Liu, B. L. Levine, C. H. June, B. R. Blazar, and S. B. Porter. 2005. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105:750-8.
38. 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* 164:2193-9.
39. Wu, C. Y., C. Demeure, M. Kiniwa, M. Gately, and G. Delespesse. 1993. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol* 151:1938-49.
40. Liang, S., P. Alard, Y. Zhao, S. Parnell, S. L. Clark, and M. M. Kosiewicz. 2005. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med* 201:127-37.
41. Kemper, C., A. C. Chan, J. M. Green, K. A. Brett, K. M. Murphy, and J. P. Atkinson. 2003. Activation of human CD4(+) cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421:388-92.
42. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601.
43. Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, and M. G. Roncarolo. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105:1162-9.
44. Jonuleit, H., and E. Schmitt. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171:6323-7.
45. Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
46. Baratelli, F., Y. Lin, L. Zhu, S. C. Yang, N. Heuze-Vourc'h, G. Zeng, K. Reckamp, M. Dohadwala, S. Sharma, and S. M. Dubinett. 2005. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* 175:1483-90.
47. Fantini, M. C., C. Becker, I. Tubbe, A. Nikolaev, H. A. Lehr, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2006. TGF- β induced Foxp3+ regulatory T cells suppress Th1-mediated experimental colitis. *Gut* 55:671-80.
48. Walther, M., J. E. Tongren, L. Andrews, D. Korbel, E. King, H. Fletcher, R. F. Andersen, P. Bejon, F. Thompson, S. J. Dunachie, F. Edele, J. B. de Souza, R. E. Sinden, S. C. Gilbert, E. M. Riley, and A. V. Hill. 2005. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23:287-96.
49. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-42.
50. Kriegel, M. A., T. Lohmann, C. Gabler, N. Blank, J. R. Kalden, and H. M. Lorenz. 2004. Defective Suppressor Function of Human CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Autoimmune Polyglandular Syndrome Type II. *J Exp Med* 199:1285-91.
51. Allan, S. E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P. C. Orban, S. F. Ziegler, M. G. Roncarolo, and M. K. Levings. 2005. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4 Tregs. *J Clin Invest* 115:3276-84.
52. I-Ming Jou, A.-L. S. S.-Y. C. C.-R. W. D.-B. S. C.-S. T. C.-L. W. 2005. Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 52:339-44.
53. de Kleer, I. M., L. R. Wedderburn, L. S. Taams, A. Patel, H. Varsani, M. Klein, W. de Jager, G. Pugayung, F. Giannoni, G. Rijkers, S. Albani, W. Kuis, and B. Prakken. 2004. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 172:6435-43.
54. Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C. A. Schmidt, R. Brauer,

- J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 199:303-13.
55. Rao, P. E., A. L. Petrone, and P. D. Ponath. 2005. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol* 174:1446-55.
56. Suffia, I., S. K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of Leishmania major infection. *J Immunol* 174:5444-55.
57. Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia, and D. D'Ambrosio. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194:847-53.
58. Stassen, M., S. Fondel, T. Bopp, C. Richter, C. Muller, J. Kubach, C. Becker, J. Knop, A. H. Enk, S. Schmitt, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2004. Human CD25⁺ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins α 4 β 7 or α 4 β 1 confer distinct suppressive properties upon CD4⁺ T helper cells. *Eur J Immunol* 34:1303-11.
59. Muthukumar, T., D. Dadhania, R. Ding, C. Snopkowski, R. Naqvi, J. B. Lee, C. Hartono, B. Li, V. K. Sharma, S. V. Seshan, S. Kapur, W. W. Hancock, J. E. Schwartz, and M. Suthanthiran. 2005. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 353:2342-51.
60. Gregori, S., P. Mangia, R. Bacchetta, E. Tresoldi, F. Kolbinger, C. Traversari, J. M. Carballido, J. E. de Vries, U. Korthauer, and M. G. Roncarolo. 2005. An anti-CD45RO/RB monoclonal antibody modulates T cell responses via induction of apoptosis and generation of regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1293-305.

2. Article II

Résumé Article II

L'expression de CD47 sur les cellules T est un rétrocontrôle négatif de la réponse immunitaire de type 1

Les cellules dendritiques et un environnement de cytokines spécifique induisent le développement Th1. Toutefois la régulation de la différenciation Th1 par les molécules membranaires demeure mal définie. Nous rapportons que l'expression de CD47 par les cellules CD4⁺ T sert de mécanisme de rétrocontrôle pour réguler négativement *in vivo* la réponse immunitaire cellulaire et humorale de type 1. Les souris BALB/c (CD47^{+/+}) au profil sécrétoire de cytokines Th2, présentaient un biais de sécrétion d'anticorps de type Th1 à l'état de base et après immunisation avec un antigène soluble lorsque le gène codant pour la molécule CD47 était invalidé (CD47^{-/-}). Les souris CD47^{-/-} présentaient une réaction d'hypersensibilité cutanée exacerbée et prolongée, médiée par les cellules T. Après leur transfert adoptif dans une souris CD47^{-/-} naïve, un jour avant l'immunisation avec un antigène soluble, les cellules T transgéniques CD47^{-/-} (Tg), comparées aux cellules CD4⁺CD47^{+/+} (Tg), présentaient une réponse immunitaire T spécifique de l'antigène biaisée vers Th1 et caractérisée par un ratio de cytokines IFN- γ :IL-4 élevé. Toutefois, l'absence sélective de CD47 sur les DCs entraînait une augmentation de synthèse de l'IL-12p70. Les cellules T CD47^{-/-}Tg produisaient plus d'IFN- γ et avaient une expression de T-bet plus élevée comparativement aux cellules T Tg CD47^{+/+} en réponse à une stimulation par les DCs chargées avec le peptide de l'OVA. CD47, comme élément de l'environnement de l'hôte, n'a pas une contribution majeure dans le biais Th1. Nous avons caractérisé la molécule CD47 sur la cellule T comme un régulateur négatif de

réponse immunitaire de type 1, qui permet de limiter d'éventuels dommages collatéraux, afin de maximiser la protection et minimiser l'atteinte de l'hôte.

Ma contribution représente 70% du travail expérimental.

**CD47 expression on T cell is a self control negative regulator of type 1
immune response**

The Journal of Immunology, 2008, 180, 8073-8082

Salim Bouguermouh¹, Vu Quang Van¹, Julie Martel¹, Patrick Gautier¹, Manuel Rubio¹
and Marika Sarfati¹.

¹Immunoregulation, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Research Center,
Hospital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Marika Sarfati, Immunoregulation
Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame (Pavillon
Mailloux, M4211K), 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada.
E-mail address: m.sarfati@umontreal.ca

Running title: CD47 negatively controls Th1 response *in vivo*

Abstract

The cytokine milieu and dendritic cells direct Th1 development. Yet, the control of Th1 polarization by T cell surface molecules remains ill defined. We here report that CD47 expression on T cells serves as a self-control mechanism to negatively regulate type-1 cellular and humoral immune responses *in vivo*. Th2-prone BALB/c mice that lack CD47 (CD47^{-/-}) displayed a Th1-biased antibody profile at steady state and following immunization with soluble Ag. CD47^{-/-} mice mounted a T cell-mediated exacerbated and sustained contact hypersensitivity (CHS) response. After their adoptive transfer to naïve CD47-deficient mice one day prior immunization with soluble Ag, CD47^{-/-} as compared to CD47^{+/+}CD4⁺ transgenic (Tg) T cells promoted the deviation of Ag-specific T cell responses towards Th1 that were characterized by a high IFN- γ /IL-4 cytokine ratio. Although selective CD47 deficiency on DCs led to increase in IL-12p70 production, CD47^{-/-}Tg T cells produced more IFN- γ and displayed higher T-bet expression than CD47^{+/+}Tg T cells in response to OVA-loaded CD47^{-/-} DCs. CD47 as part of the host environment has no major contribution to the Th1 polarization responses. We thus identify the CD47 molecule as a T cell negative regulator of type 1 responses that may limit unwanted collateral damage to maximize protection and minimize host injury.

INTRODUCTION

In adaptive immunity, CD4⁺ T cells differentiate into T helper 1 (Th1) and Th2 cells in response to antigenic stimulation (1-4). Th1 cells produce mainly IL-2, IFN- γ , tumor necrosis factor- α (TNF- α) and (TNF- β), elicit delayed-type hypersensitivity responses and participate in cellular immune responses against intracellular pathogens. Th1 cells are also involved in transplant rejection, and protection from neoplasms (5). Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, mediate IgG₁ and IgE production, eosinophilic inflammation and are important for elimination of certain extracellular microbes and parasites (6). Overactivated Th1 responses cause organ-specific autoimmune diseases, such as type I diabetes. Thus, elucidation of the molecular mechanisms controlling Th1 effectors has both biological and clinical importance.

Several factors, that include costimulatory molecules, the extracellular cytokine environment, the nature of the APCs and the method of Ag delivery may influence the outcome of naïve T cell polarization (3, 7, 8). CD4⁺ T cell differentiation is regulated by multiple transcription factors, though T-bet and GATA-3 are considered as primary regulators of Th1 and Th2 development, respectively (9). T-bet is a Th1-specific transcription factor activated by IFN- γ signaling via STAT1 (10). T-bet induces Runx3 and both transcription factors are required for maximal production of IFN- γ , silencing of the gene encoding for IL-4 and up-regulating IL-12R β 2 to reinforce Th1 development (11). Regulatory feedback mechanisms are taking place in the course of a microbial aggression to dampen Th1 responses and limit the damage to the host while maintaining an effector response. WSX-1 (IL-27 receptor) down regulates protective Th1 cell responses against *Toxoplasma gondii*. (12). Similarly, expression of the branching β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) N-linked glycans increases after T cell

activation and selectively inhibits Th1 cell differentiation. (13). Other regulatory pathways include the generation of Th1 cells expressing T-bet and producing regulatory Il-10 that serves as antagonist of T cell mediated immune responses to intracellular protozoan infection (14, 15). Despite of the progress in the molecular understanding of Th development, whether surface molecules negatively control Th1-mediated immune responses remains ill defined. Galectin-9/Tim-3, expressed on repeatedly activated Th1 effectors, represents such a pathway that evolved to ensure the termination of undesired Th1 responses (16, 17).

CD47, considered as a marker of self on hematopoietic cells, has been shown to trigger a wide variety of cellular functions. Biological consequences of CD47 ligation vary according to the mode of CD47 engagement (soluble versus immobilized ligand), its association with different molecules *in cis* or *in trans* and its localization on the cell surface (18-21). Although CD47 ligation appears to costimulate T cell proliferation (22), induce their arrest and spreading on inflamed vascular endothelium (23), several lines of evidence suggest that CD47 expressed on T cells primarily functions as an inhibitory molecule. First, CD47 inhibits early T cell activation (24) and allogenic mixed leukocyte reaction (25). Second, CD47 ligation by CD47 mAb or its natural ligand thrombospondin (TSP) in primary cultures of human cord blood mononuclear cells induces a state of T cell unresponsiveness characterized by reduced cell proliferation and cytokine expression and favors the conversion of naïve and memory CD4⁺CD25⁻ T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells (26, 27). Because CD47 ligation impairs human naïve Th1 development *in vitro* with no immune deviation towards Th2 (28), we thought to evaluate whether CD47 contributes to these developmental changes of CD4⁺ T cells *in vivo*. To address the question as whether Ag-specific Th1 immune responses is controlled by CD47, we used an adoptive

transfer model system of DO11.10 TCR transgenic (Tg) mice specific for OVA that were backcrossed onto CD47^{-/-} BALB/c background, yielding CD47^{-/-}Tg mice and showed that CD47^{-/-}Tg T cell polarization was biased toward Th1 at single cell level as assessed *in vivo* and *in vitro*. The enhanced Th1 response was associated with an increase expression of T-bet transcription factor in CD47^{-/-}Tg T cells. Finally, CD47-deficient mice displayed a biased Th1 antibody profile and an exacerbated T-cell mediated contact hypersensitivity responses.

These results provide evidence *in vivo* that CD47 is a T cell surface inhibitory molecule that may have evolved to downgrade excessive or unwanted type 1 effector responses for the maintenance of homeostasis.

Materials and Methods

Mice

The CD47 (Integrin-Associated Protein, IAP) null IAP^{+/-} 129sv/eg mice were backcrossed into BALB/c for 16 to 18th-generation and were a generous gift from Dr P.A. Oldenburg. Mice expressing the DO11.10 TCR transgene, which is specific for the peptide residues 323–339 of chicken OVA in the context of I-Ad (BALB/c, CD47^{+/+}Tg) were purchased from Charles River and backcrossed into CD47^{-/-} mice (CD47^{-/-}Tg). All eight- to 12-week-old mice were housed in our breeding colony and care facilities under SPF conditions. All experimental protocols were approved by the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de Montréal (CRCHUM) and Canadian Council on Animal Care.

Culture medium, Antibodies and Reagents

Mouse cells were cultured in complete RPMI-1640 medium (Wisent Inc., St.-Bruno, Quebec, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum, Penicillin (500 U/ml), Streptomycin (500 µg/ml), HEPES buffer (10 mM), and 2-ME (1 mM), (GIBCO-BRL, Grand Island, NY). OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide was purchased from Peptides International (Louisville, Kentucky, USA), OVA protein and LPS (E.Coli) were obtained from Sigma-Aldrich. Recombinant mouse cytokines IL-2, IL-4, IL-12 and recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were from PeproTech (Rocky, Hill, NJ). Mitomycin-C was purchased from EMD Chemicals. Soluble CD40 Ligand was a gift from Amgen (Seattle, USA). The following clones were purchased from ATCC and purified in our laboratory: 145-2C11 (anti-CD3); GK1.5 (anti-CD4); R46A2 (anti-IFN-γ); 11B11 (anti-IL-4); (C15.6) anti-IL-12 and N418 (anti-CD11c). PE or APC conjugated anti-mouse KJ1.26 to identify DO11.10 T cell, were purchased from Caltag (Burlingame, CA). HM40-3 and 3/23 (anti-CD40); APC or PE-conjugated anti-mouse CD4, PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD3e, PE-labeled anti-mouse CD8 and biotinylated anti-CD4 (GK1.5) from BD Biosciences (Mississauga, ON, CA). Incomplete and complete Freund's adjuvant (IFA and CFA) was from MP Biomedicals (Solon, OH, U.S.A), Alum from Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL. U.S.A.). CFSE and PKH-26 red fluorescent cell linker were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA).

Adoptive Transfer

Single cell suspensions were prepared from spleens and lymph nodes harvested from naïve CD47^{+/+} or CD47^{-/-}Tg mice. CD4⁺ T cells were purified by positive selection using immunomagnetic beads (Easy Sep, StemCell Technologies Inc, Vancouver, BC, CA). Purity was greater than 98% as determined by flow cytometry. Syngeneic CD47^{+/+} and

CD47^{-/-} naïve recipients were injected intravenously i.v. with 3×10^6 CFSE-labeled CD47^{+/+} and CD47^{-/-}Tg T cells respectively. One day later, the mice were immunized subcutaneously s.c. in the footpad with 50 µg of OVA peptide dissolved in 20 µl of PBS and emulsified in IFA. The draining LN (popliteal) were extracted 7 days after immunization to assess cell proliferation (CFSE dilution). Popliteal LN were minced in 3 ml RPMI with EDTA and passed through a 70-µm nylon cell strainer (BD Biosciences). LN cells were restimulated with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide *in vitro*. Proliferative responses were measured by culturing 2×10^6 total LN cells with 0–10 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide for 4 days. Cells were pulsed with 1 µCi of ³[H]thymidine (Amersham Bioscience, GE Healthcare, UK) for the last 12-h and then harvested for liquid scintillation counting. The number of KJ1.26⁺CD4⁺ T cells for each group of recipients was determined by FACS analysis, and proliferation was normalized to 10^4 KJ1.26⁺CD4⁺ input. Culture supernatants were collected on day 4. Data represent the mean ± SD of quadruplicates for each peptide concentration.

In some experiments, CD47^{-/-} or CD47^{+/+} BALB/c mice were adoptively transferred with 10×10^6 CD47^{+/+}Tg T cells and immunized one day later s.c. with 0.25×10^6 activated OVA-pulsed CD47^{+/+} bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). 3 days later, T-cell specific responses were examined in the draining LN after 72-h *in vitro* restimulation with OVA peptide. For competitive migration, CFSE-labeled CD47^{-/-}Tg T cells and PKH-26 red fluorescent cell linker labeled CD47^{+/+}Tg T cells were adoptively transferred at the same time at a 1:1 ratio into CD47^{+/+} or CD47^{-/-} BALB/c recipients. On day 1, mice were left untreated, (non inflammatory) or immunized in the footpad with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide (inflammatory conditions). The draining LN were recovered at day 7. CFSE and PKH-26 positive cells were retraced after gating on KJ1.26⁺CD4⁺ T cells.

In vivo immunization of unmanipulated mice.**Antibody response**

Total and OVA-specific Ig serum level was quantified by ELISA in unmanipulated CD47^{+/+} and CD47^{-/-} deficient mice at steady state and after immunization. For primary and secondary responses, 50 µg of OVA protein, in CFA or Alum, had been injected intra-peritoneal i.p. at day 0 and day 35 respectively. The IgG1 and IgG2b OVA-specific antibody response was quantified by ELISA in collected serum 35 days after first immunization (primary response) and 8 days after boost (secondary response).

In vitro Antibody production

For *in vitro* Ig production, B cells were obtained from CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice spleens by CD43-depletion (EasySep) and stimulated for 7 days in complete RPMI-1640 medium by LPS (10 µg/ml) or IL-4 (20 ng/ml) and soluble CD40 Ligand (CD40L) (1 µg/ml) or IL-4 and anti-CD40 mAb. Total IgG1 and IgG2a production was quantified in the culture supernatant by ELISA.

In vitro IFN-γ production

Balb/c or CD47^{-/-} mice were immunized s.c. with 25 µg of OVA protein and 1 µg of LPS (*E.Coli*) in IFA. On day 7, the popliteal draining LN were recovered Total LN cells were CFSE labeled and 10⁶ cells were stimulated with OVA protein (2 mg/ml) in 96-flat bottom well plates for 48-72 hours. Golgi Stop was added for the last 6-h. The cells were stained with CD4 mAb and fixed in 2% paraformaldehyde and permeabilised with 0.5% saponin (BD Bioscience) before staining with APC-labeled antibodies to IFN-γ (BD Bioscience) in the presence of Fc Blocker (Clone 24G2, BD).

Contact hypersensitivity response

Mice were painted on the shaved abdomens with 20 μ l of 0.5% and 0.2% DNFB dissolved in acetone/olive oil (4:1) on days 0 and 5 respectively. On day 19, mice were challenged with 20 μ l of 0.2% DNFB on each side of the right ear. The left ear was painted with an identical amount of vehicle and used as control. Ear thickness was measured at four locations with a micro gauge meter (Mitutoyo, Tokyo, Japan) 24-h after elicitation. Hapten-specific ear swelling was calculated as follows $T-T_0$, where T_0 and T represent the values of ear thickness before and after the challenge, respectively. After 38 days, some mice were further boosted with 0.5% DNFB on the shaved abdomen. One day later, cells were recovered from draining LN of DNFB-sensitized $CD47^{-/-}$ and $CD47^{+/+}$ mice and 3×10^6 purified $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells using anti-CD4 and anti-CD8 PE-labeled mouse mAb and immunomagnetic beads (EasySep). T cells were passively transferred in naïve $CD47^{-/-}$ recipients. The ear was challenged with 0.5% DNFB 18-h after T cells transfer and CHS response was measured on the next day. Results are expressed as the mean ear swelling (μ m).

Preparation of BMDCs

Bone marrow-derived DCs (BMDCs) were generated as described previously (29). GM-CSF (5 ng/ml) was added for 10-14 days to 1×10^6 cells to induce DC differentiation. The culture medium was renewed every 3 days. Cell purity was >98% $CD11c^+$ cells. In some experiments, BMDCs were activated overnight with 1 μ g/ml of LPS and 1 μ g/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide (Peptide International).

In vitro Th differentiation / activation

A Th1/Th2 differentiation

Isolated CD47^{+/+} or CD47^{-/-}CD4⁺ T cells (1×10^6 /ml) were cocultured with mitomycin-C-treated CD47^{+/+} T-cell-depleted splenocytes (APCs) (2×10^6 /ml). Cells were stimulated 3 days in complete RPMI-1640 medium, by graded concentrations of anti-CD3 (1-10 μ g/ml). For Th1/Th2 differentiation, CD47^{+/+} or CD47^{-/-}CD4⁺ T cells (5×10^4 /ml) were stimulated with soluble anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of CD11c⁺-purified splenic DCs (25×10^3 /ml) and IL-12 (10 ng/ml) and anti-IL4 (10 μ g/ml) (Th1 condition) or IL-4 (20 ng/ml) and anti-IFN- γ (10 μ g/ml) (Th2 condition). After 7 days T cells were restimulated for 2 days with plastic-coated anti-CD3 (1 μ g/ml) and cytokine production was measured in the culture supernatant by ELISA. CD11c⁺ cells were purified from splenocytes by positive selection using (N418) anti-CD11c-biotinylated mAb and immunomagnetic beads (EasySep).

B. For primary and secondary Ag-specific responses

For primary responses, 2×10^5 Tg T cells were cultured in 96-flat bottom well plates with 2×10^6 mitomycin-C-treated APCs or 1×10^5 Tg T were cultured in 96-round bottom well plates with 5×10^4 BMDCs for 4 days in the presence of 0-10 μ g/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide. For secondary response, CD4⁺ T cells primed with OVA peptide (10 μ g/ml) were rested overnight with 50 U/ml of IL-2, then restimulated in vitro under the same conditions as in the primary response. To measure cell proliferation, cells were pulsed with 1 μ Ci of ³[H]thymidine on day 4 (primary response) and day 3 (secondary response) for 12-hr and then harvested for liquid scintillation counting. Data reflect the mean \pm SD of quadruplicates for each peptide concentration. Culture supernatants were collected on day 3-4, and cytokine levels were determined by ELISA.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

ELISA kits (BD Pharmingen) were used according to the manufacturers' protocols (IL-4, IL-10, IL-12p70 and IFN- γ). Assays were done in quadruplicate. Error bars in ELISA figures indicate mean \pm SEM.

Intracellular cytokine staining

Cytokine production was analyzed after stimulating 2×10^6 draining LN cells with OVA peptide (10 μ g/ml) in 24-well plates, either for 6-h with Golgi Stop or until day 4, in the presence of Golgi Stop (BD Biosciences PharMingen) the last 6-h. The cells were fixed in 2% paraformaldehyde and permeabilised with 0.5% saponin (BD Bioscience) before staining with APC-labeled antibodies to IFN- γ and PE-labeled antibodies to IL-4 (all from BD Bioscience) in the presence of Fc Blocker (Clone 24G2, BD). All samples were washed with PBS with 1% bovine serum albumin (Wisent Inc.) and 0.01% sodium azide (Fisher Scientific Inc) and analyzed on a Becton Dickinson FACS Calibur (BD Bioscience) machine and Cell Quest software.

Western blot

T cells were lysed in ice-cold lysis buffer, containing $1 \times$ TNE buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 0.1% IGEPAL CA-630; 2 mM EDTA, pH 8.0) and 10 μ g per ml each of the protease inhibitors leupeptin, aprotinin, N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, and phenylmethylsulfonyl fluoride, as well as the phosphatase inhibitors sodium fluoride (50 mM) and sodium orthovanadate (1 mM). Lysates were left on ice for 10 min and centrifuged for 10 min at 13 000 g in a microcentrifuge at 4° C to remove nuclei membranes. Proteins were separated on 8.5% SDS–polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% non-fat dried milk in TBS-T (1% Tween 20) and incubated with antibody against mouse T-bet (4B10, Santa Cruz

Biotechnology) diluted in TBS-T and 5% BSA, followed by goat anti-mouse IgG antibody (H+L) conjugated to HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc). Immunolabeling was detected using an enhanced chemiluminescence detection system (GE, Healthcare). For normalization, anti- β -Actin mAb (Sigma-Aldrich) was used as a control.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad InStat program.

Results

I. The lack of CD47 on T cells enhances *in vitro* Th1 differentiation.

CD47 ligation decreases IL-12 responsiveness by neonatal and adult human CD4⁺ T cells and impairs their *in vitro* development into Th1 effectors (28, 30). Here, we examined whether the absence of CD47 on murine CD4⁺ T cells affects their *in vitro* capacity to produce IFN- γ in neutral conditions. Polyclonal activation of purified CD4⁺ T cells isolated from CD47^{-/-} mice induced large amounts of IFN- γ when compared to CD47^{+/+}CD4⁺ T cells. In fact, lack of CD47 significantly lowered the threshold of TCR cell activation for IFN- γ production. CD47^{-/-}CD4⁺ T cells stimulated by anti-CD3 (1 μ g/ml) secreted similar quantities of IFN- γ as CD47^{+/+}CD4⁺ T cells activated by anti-CD3 (10 μ g/ml). Under the same conditions, cell proliferation and IL-4 production was comparable in CD47^{-/-} and CD47^{+/+} T cells (Figure 1A). We next examined whether the increased IFN- γ production seen in CD47^{-/-} T cells was directly related to an altered CD3 ϵ expression and found that the density of CD3 ϵ was unchanged in both group of mice (Figure 1B). We next showed that CD4⁺ T cells deviated their cytokine profile toward Th1 under polarizing conditions. CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 in the presence of APC and anti-IL4 plus IL-12 (Th1) or anti- IFN- γ plus IL-4 (Th2) for 7 days and then re-

stimulated with anti-CD3. The Th1-induced bias seen in CD47^{-/-} CD4⁺ T was reflected by a high IFN- γ /IL-4 versus low IL-4/IFN- γ ratio in Th1 and Th2 polarizing conditions, respectively (Figure 1C). Notably, CD47^{-/-}CD4⁺ T cells produced significantly more IFN- γ as compared to CD47^{+/+}CD4⁺ T cells and IL-4 production was not influenced by CD47 ablation (not shown). These *in vitro* data indicate that CD47 on mouse CD4⁺ T cells negatively regulates the generation of Th1 effectors, confirming results obtained with human naïve T cells.

II. CD47 deficiency in BALB/c mice drives Th1 polarization *in vivo*.

To directly assess the *in vivo* role of CD47 in Th1 differentiation in response to soluble Ag, DO11.10 T-cell receptor transgenic (Tg) mice which is specific for chicken ovalbumin (OVA) peptide (amino acids 323-329) presented on the MHC class II molecule I-A^d were backcrossed to CD47^{-/-} BALB/c mice to generate CD47^{-/-}Tg mice. We first examined the cell proliferation and cytokine profile of CFSE-labeled CD47^{-/-} and CD47^{+/+}Tg T cells that were passively transferred into naive CD47^{-/-} or BALB/c hosts respectively, one day prior their s.c. immunization with OVA peptide in incomplete Freund adjuvant (IFA) (Figure 2). After 7 days, draining lymph nodes (LN) were collected and the proportion of clonotypic CD4⁺ T cells, hereafter referred as CD47^{+/+} and CD47^{-/-}Tg T cells, that underwent cell division (CFSE dilution) was comparable in the two hosts (mean \pm SEM of eight mice from eight separate experiments, 81.5% \pm 3.3 and 76.0% \pm 4.9 for CD47^{+/+} and CD47^{-/-}Tg T cells, respectively, $p > 0.05$) (Figure 2A, left panels). By contrast, CD47^{-/-}Tg T cells transferred into CD47^{-/-} mice produced significantly more IFN- γ on a per cell basis as compared to CD47^{+/+}Tg T cells in CD47^{+/+} mice. Notably, the frequency of IFN- γ -producing cells among CD47^{-/-}Tg T cells was increased when assessed

at the end of the 7 days *in vivo* priming (Figure 2A, right panels) and after 4 days *in vitro* secondary stimulation with OVA peptide (Figure 2 C). The cytokine production was mainly restricted to T cells that divided in response to Ag stimulation. As for the *ex vivo* cell proliferation, the extent of Tg T cell proliferation after *in vitro* restimulation was comparable regardless of the presence of CD47 on T cells and the peptide concentration. In contrast to *in vitro* polyclonal activation of purified CD4⁺ T cells, IFN- γ secretion was increased and IL-4 secretion was reduced in CD47^{-/-} LN cells after *in vivo* immunization with soluble Ag (Figure 2B). Collectively, these data support the conclusion that CD47 deficiency in Th2-prone BALB/c mice alters Th1/Th2 balance in favor of Th1 subset.

III. Absence of CD47 on CD4⁺ T cells favors *in vivo* Th1 responses and T-bet expression.

We next thought to delineate whether Th1-induced bias was caused simply by the lack of CD47 on Tg T cells or more generally by CD47 deficiency in the host. Indeed, CD47 is expressed on all hematopoietic and non hematopoietic cells. To directly address this question, it is desirable to compare Th profile of CD47^{-/-}Tg T cells to that of CD47^{+/+}Tg T cells in a CD47^{+/+} host. However, this is not feasible because CD47 is considered as a marker of self on live cells and as such, several studies report the immediate clearance of CD47-deficient cells in wild-type hosts as a result of the lack of an inhibitory signal delivered through SIRP- α (19). To ascertain these observations, CFSE-labeled CD47^{-/-} and PKH26-labeled CD47^{+/+}Tg T cells were co-injected i.v. at 1:1 ratio in the two types of hosts and retraced after 7 days in the draining LN. One day after adoptive T cell transfer, mice were either left untreated (non inflammatory conditions) or immunized s.c. with OVA peptide in IFA (inflammatory conditions). As clearly depicted in Figure 3A, CD47^{-/-}

Tg T cells were readily eliminated in CD47^{+/+} recipients under both conditions, confirming and extending published reports (31, 32). In contrast to their clearance from BALB/c host, CD47^{-/-}Tg T cells survived and divided as well as CD47^{+/+}Tg T cells in a CD47^{-/-} recipient.

We first evaluated the role of CD47 as part of the environment in the deviation toward Th1. CD47^{+/+}Tg T cells were adoptively transferred into a CD47^{-/-} or CD47^{+/+} host one day prior s.c. immunization with OVA-loaded bone marrow-derived CD47^{+/+} DCs (Figure 3B). After 3 days, we collected the draining LN and found a comparable level of Tg T cell proliferation and IFN- γ secretion in the two recipients. These results strongly suggest that absence of CD47 in the host has a minor contribution to the quality of the Ag-specific CD47^{+/+} T cell response to CD47^{+/+} APC, not ruling out a potential facilitating role for CD47-deficient APC on T cell responses. Because of the *in vivo* elimination of CD47^{-/-} APC from the CD47^{+/+} host, we next performed *in vitro* coculture experiments to assess the impact of CD47 ablation on DC on T cell responses (Figure 4A). CD47^{-/-} APC were superior to CD47^{+/+} in eliciting IFN- γ production by CD47^{+/+} or CD47^{-/-}Tg T cells (Figure 4A). Note that CD47^{-/-} APC produced more IL12p70 and equal amounts of IL-10 than CD47^{+/+} APC. Nonetheless, CD47 ablation on CD4⁺ T cells led to increase IFN- γ secretion in the presence of either APC. These data point towards a relative contribution of DC-derived IL-12 to the Th1 bias seen in CD47^{-/-} mice (Figure 4B).

T-bet expression is known as a Th1 lineage commitment transcription factor. IFN- γ transactivates T-bet in Ag-activated T cells (33). We thus examined whether the increased IFN- γ production in CD47^{-/-}Tg T cells was correlated with an enhancement in T-bet expression. *In vitro* activated CD47^{-/-}Tg T cells in the presence of OVA-loaded CD47^{-/-} APC expressed more T-bet (Figure 4C) as compared to CD47^{+/+}Tg T cells. Increased T-

bet expression and IFN- γ production was still observed after IL-12 neutralization in primary cultures (Figure 4D and data not shown) suggesting that the Th1 bias of CD47^{-/-} mice was not strictly dependent on paracrine IL-12/IFN- γ production.

Finally, to directly examine the function of CD47 *in vivo* on T cells, CD47^{-/-} recipients were immunized with OVA in IFA s.c. one day after adoptive transfer of Tg T cells expressing or not CD47 (Figure 5). Both types of Tg T cells were recovered in comparable number after transfer in a CD47^{-/-} host ($6.4 \times 10^5 \pm 1.4$ and $6.9 \times 10^5 \pm 1.4$ for CD47^{+/+} and CD47^{-/-}Tg T cells respectively, mean \pm SEM of seven mice from separate experiments). Our data revealed that CD47^{-/-}Tg T cells deviated their response toward Th1 as compared to CD47^{+/+}Tg T cells. Indeed, we found a significant increase in the frequency of IFN- γ producing cells and a slight decrease in the proportion of IL-4 positive cells among CD47^{-/-}Tg T cells as compared to CD47^{+/+}Tg T cells (Figure 5A and B). This was reflected by an augmented IFN- γ /IL-4 ratio (Figure 5C), demonstrating that CD47 on T cells negatively regulates IFN- γ and Th1 development in CD47^{-/-} mice. The absence of CD47 in the environment altered the CD47^{+/+}Tg T cell proliferation without reducing the proportion of IFN- γ positive cells, which in fact remained as low in CD47^{-/-} ($6.33\% \pm 1.5$) and CD47^{+/+} ($6.35\% \pm 2.2$) hosts. Furthermore, we noticed a reduction in T cell recovery in CD47-deficient mice. As previously reported (29), this might result from the defective CD47^{-/-} DC migration across lymphatic vessels and a subsequent impaired T cell priming. Collectively these results demonstrated that CD47 expression on CD4⁺ T cell negatively regulates IFN- γ production and T-bet expression as well as *in vivo* Th1 development in response to soluble Ag. CD47 expression on APC influences the Th1/Th2 balance *in vivo*.

IV. CD47 deficiency promotes a Th1-biased antibody profile

We next thought to evaluate whether the humoral immune responses were biased toward Th1 in CD47-deficient mice. We examined the serum antibody isotypes in unmanipulated CD47^{-/-} mice and observed a prominent increase in Ig isotypes associated with a Th1 phenotype, IgG2a and IgG2b, with no significant effect on IgG1 serum levels, which was associated to the Th2 profile (Figure 6A). The strong Th1 antibody isotype profile observed in CD47^{-/-} mice at steady-state was maintained after primary and secondary antigenic challenge. Indeed, upon immunization with OVA in complete Freund's adjuvant (CFA), IgG2a OVA-specific antibodies were at least 10 fold higher in CD47^{-/-} mice when compared to BALB/c mice (Figure 6B). Moreover, CD47^{-/-} mice still showed a strong Th1 bias when using alum, a Th2 adjuvant. In contrast, the IgG1 Ag-specific primary response was not significantly modified in the CD47^{-/-} mice at 35 days post-immunization. Thus *in vivo*, in the absence of CD47, primary immune responses to soluble Ag are strongly biased towards a Th1 phenotype, with a slight delay in Th2 antibody isotype production. Upon secondary challenge in IFA, not only were OVA-specific IgG2a antibodies increased but IgG1 antibodies now showed a significant decrease (Figure 6C). Therefore, using CFA followed by IFA as an adjuvant, the Th1 antibody response was enhanced while Th2 was abated. Similarly, with alum, the Th1 secondary antigenic response was enhanced, as observed by an increase in OVA-specific IgG2a antibodies (Figure 6C). In contrast, the Th2 antibody response was not reduced as alum drives strong Th2 responses.

We next examined whether the Th1 Ab response in non manipulated CD47^{-/-} mice was caused by the Th1-biased cytokine profile (enhanced IFN- γ production) and/or attributed to a B-cell intrinsic defect. To this end, Balb/c and CD47 deficient mice were immunized s.c. with OVA protein in IFA plus LPS and Ag-specific T cell response was examined in

the draining LN. The frequency of proliferating IFN- γ producing CD4⁺ T cells was significantly increased in CD47^{-/-} when compared to CD47^{+/+} mice (Figure 7A). However, we found no significant difference in the quality and the quantity of IgG1 and IgG2a produced *in vitro* by LPS, IL-4 and CD40-activated purified B cells expressing or lacking CD47 (Figure. 7B).

Taken together, CD47 ablation in a Th2-prone BALB/c background is sufficient to promote a Th1 biased cellular and humoral response both at steady state and following *in vivo* immunization with soluble Ag.

V. CD47 deficiency exacerbates contact hypersensitivity response

It is generally believed that CD8⁺ T cells play a role in contact hypersensitivity response (CHS) with a significant contribution of CD4⁺ T cells and IFN- γ . CHS are mediated by hapten-specific T cells generated in response to a chemical skin irritant exposure such as DNFB. We therefore assessed the development of CHS in CD47^{-/-} mice. BALB/c and CD47^{-/-} mice were sensitized with DNFB at day 0 with a boost at day 5 and next challenged on the ear on day 19. As depicted in Figure 8A, the ear swelling response was significantly increased in CD47^{-/-} as compared to BALB/c mice. The enhancement was more prominent after 24-h challenge but still present at 48-h. In the next series of experiments, BALB/c and CD47^{-/-} mice were hyperimmunized and 18-h after the last DNFB immunization, sensitized T cells were purified from draining LN and passively transferred i.v. into naïve CD47^{-/-} mice that were challenged with DNFB on the ear the next day (Figure 8B). Ear swelling was measured from day one after DNFB challenge. We here showed that purified CD47^{-/-} T cells from hyper-immunized mice were capable of transferring exacerbated CHS to CD47^{-/-} mice, demonstrating that CD47^{-/-} T cells

mediated the sustained local inflammatory process. However, our unpublished observations indicated that CHS was exclusively observed after transfer of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (1/1 ratio) mixture and not using purified CD4⁺ T cells alone.

Taken all, our data demonstrated that CD47 negatively regulates *in vivo* type 1 cellular immune responses and thus may serve to limit unwanted inflammatory reactions.

Discussion

Type 1 immune responses and the effector protein IFN- γ play a critical role in the control of inflammatory process, the protection against pathogens and tumors (4, 5). Here, we demonstrated that CD47 negatively regulated type 1 humoral and cellular immune responses *in vivo*. By ablating CD47 in mice, we found that Th2-prone BALB/c mice developed a Th1-biased cytokine and Ab profile at steady state and after immunization. More specifically, the CD47^{-/-}Tg T cells were poised to deviate toward Th1 phenotype in response to soluble Ag in primary and recall responses *in vitro* and *in vivo*. Thus, our results identify the T cell surface CD47 molecule as a self-control negative regulator of Th1 responses.

Th1 versus Th2 polarization and helper function for Ab production is dictated by rather complex interactions. DCs that have been activated by pattern recognition receptors (PRRs) instruct naïve T cell differentiation into Th1 effectors (34). A selective combination of two Toll-like receptor (TLR) signals synergizes for the production of biological IL-12 by DCs and strongly favors Th1 response (35). Similarly, a cooperative stimulation between Nod-like receptor (Nod1) and TLR is essential for successful elicitation of adjuvant-induced adaptive cellular and humoral immune responses (36). CD47^{-/-} mice immunized with soluble Ag in CFA or alum mounted a Th1-biased cellular

and humoral response. IFN- γ production was increased in the draining LN and serum Ab profile showed elevated IgG2a and IgG2b levels after immunization with soluble OVA. How this conforms with the generalized (IgG1 and IgG2) blunted immune response to particulate Ag reported in CD47^{-/-} Th1-prone C57BL/6 mice is unclear (37). The present study provided evidence that CD47^{-/-}BALB/c not only displayed a Th1-biased Ab profile but also developed an exacerbated type 1-mediated CHS response to DNFB. Our data revealed that CD47^{-/-}T from DNFB-hyperimmunized mice transferred the enhanced CHS response to naïve CD47^{-/-} mice when compared to CD47^{+/+}T cells. Also, CD4⁺Tg T cells lacking CD47 upregulated their T-bet expression. Hence, T-bet transgenic mice develop contact dermatitis mediated by IFN- γ produced by type 1 cytotoxic T and CD4⁺ Th cells (38). Activated NK cells produce large amounts of IFN- γ , potentiate Th1 priming and also participate to the CHS reaction (39, 40). Our unpublished data showed that CD47^{-/-} mice displayed a higher proportion of NK cells when compared to BALB/c and the CD47-deficient NK contribution to the Th1-biased phenotype and CHS response remains to be determined. Epidermal and dermal DCs negatively control the induction of CHS and the absence of Langerhans cells even augments CHS (41). In fact, lack of CD47 expression on myeloid DCs negatively regulates their transendothelial migration. As a consequence, the number of skin-derived DCs is reduced in the LN at steady state and after FITC sensitization and the splenic marginal zone is quasi-depleted of CD4⁺DCs (29). Of interest, IFN- γ negatively regulates DC migration (42).

Taken all, the Th1-bias reported in the present study combined to the defective skin derived-DC migration in CD47^{-/-} mice may contribute to the exacerbated CHS response observed in CD47^{-/-} mice. Our present data are in apparent contradiction with the decreased DNFB response observed in CD47^{-/-}C57BL/6 mice (37). However, our results

concluded with the prolonged inflammatory response to oxazolone reported in the latter strain of mice (43). Local deficiency in T cell apoptosis in CD47^{-/-} mice provides an additional mechanism for the augmented CHS response (44). Hence, CD47 ligation by TSP or a CD47 mAb induces caspase-independent cell death in human primary B and T cells and CD47^{-/-} T cells are resistant to FAS-mediated apoptosis (20, 44, 45).

IL-12 is a dominant player to drive Th1 polarization. The TSP/CD47 pathway is an autocrine negative regulator of IL-12 secretion in human DCs and impairs Th1 development (46). Likewise, bone marrow-derived CD47^{-/-}DCs secreted more IL-12p75 than wild type DCs and facilitated *in vitro* IFN- γ production by CD47^{+/+} and CD47^{-/-}Tg T cells. However, enhanced T-Bet expression may still be observed in CD47^{-/-}CD4⁺ T cells in the presence of neutralizing anti-IL12 mAb suggesting a minor contribution of paracrine IL-12. *In vivo*, Ag-pulsed DEC205⁺CD8⁺DCs, which are the main source of IL-12, induce the development of Th1 whereas CD4⁺ myeloid DCs drive Th2 when injected into animals (47). The fine tune of the Th1 response may be regulated by signals other than IL-12 delivered by DCs to T cells. Among others, expression of CD70 on DEC205⁺CD8⁺DCs and delta4 Notch-like ligand on CD4⁺DCs promote IL-12-independent Th1 response *in vivo* (48, 49). SIRP family members, that include SIRP- α and γ , represent the other CD47 binding partners that are selectively expressed by myeloid and T cells, respectively and negatively regulate the IL-12 response (30, 50). SIRP- α /CD47 interactions *in trans* impair IL-12 but not IL-2 T cell responsiveness (30). Thus, both T cells and DCs coexpress CD47 and its two ligands (SIRP and TSP) (50). The respective and predominant contribution of CD47/TSP versus CD47/SIRP interactions through competition for CD47 access *in cis* and its potential impact on Th1 driven responses definitely need to be addressed.

A strong TCR signal ensures a robust IFN- γ response by purified T cells, which in turn promotes IL-12R β 2 expression (51). We here showed that absence of CD47 on CD4⁺ T cells lowered the threshold of CD3 activation for IFN- γ secretion but no alteration in CD3 ϵ expression was found in CD47^{-/-} mice (52).

Interestingly, low quantities of nitric oxide (NO) are reported to promote Th1 differentiation by upregulating IL-12R β 2 expression via increase in cGMP (53) and TSP/CD47 interactions on vascular endothelial cells impair the NO response by inhibiting cGMP synthesis (54). This suggests that interference with NO pathway may represent another potential mechanism for CD47 to alter Th1 response. Notably, endogenous TSP is rapidly expressed on T cell surface following CD3 stimulation, provided T cells established a contact with the extracellular matrix protein fibronectin (55).

Despite their Th1 bias, CD47-deficient mice did not develop spontaneously autoimmune diseases. Paradoxically, enhanced IFN- γ does not necessarily translate into an inflammatory or autoimmune phenotype (56, 57). IFN- γ is reported to induce Treg development and oppose to the development of the newly described pro-inflammatory Th17 subset (58, 59). However, T-bet^{-/-} mice, lacking Th1 effectors, are resistant to the development of experimental auto-immune encephalomyelitis despite of the presence of Th17 producers, underlying the potential benefit of interrupting a Th1 response (60).

Nonetheless, IFN- γ plays a critical role in the protective response against intracellular pathogens that include parasites, *mycobacteria*, *salmonella* and *listeria* (5, 10, 61). Whether CD47 decreases pathogen-driven Th1 responses remains to be evaluated. In that regard, a CD47-like protein (M128L) serves as a potent immunomodulatory virulence factor expressed by myxoma virus, to provide the virus with a selective advantage *in vivo*.

This likely correlates to the ability of M128L to inhibit myeloid-lineage cell activation (62).

We here propose that CD47 is a T cell negative sensor that may serve to dampen unchecked pro-inflammatory Th1 responses. Thus, manipulating CD47 signalling pathway may reduce the intensity of undesired collateral tissue damage to maximize protection and minimize host injury.

Acknowledgments

We thank S. Lesage for comments and suggestions. This work was supported by grant from the Canadian Institute for Health and Research (CIHR Grant, MOP-53152). S.B. and V.Q.V are recipients of the Canadian Institutes for health Research / Canada Graduate Scholarships Doctoral Award.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

Figure 1. CD47 on T cells negatively regulates Th1 development *in vitro*.

(A) CD47^{+/+} or CD47^{-/-}CD4⁺ T cells (1 x 10⁶/ml) were stimulated with graded concentrations of anti-CD3 mAb in the presence of mitomycin-C-treated T-cell-depleted splenocytes (APCs) (2 x 10⁶/ml) for 3 days. Proliferation was measured by ³[H] Thymidine incorporation for the last 6-h of the culture period and IFN- γ and IL-4 production was detected by ELISA (Student paired t test, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001 n=5 independent experiments). (B) Flow cytometric analysis of TCR/CD3 (CD3 ϵ) on CD47^{+/+} and CD47^{-/-}CD4⁺ T cells. Representative result from six mice. (C) CD47^{+/+} or CD47^{-/-}CD4⁺ T cells (5 x 10⁴/ml) were primed with soluble anti-CD3 mAb (1 μ g/ml) in the presence of CD11c⁺-purified splenic DCs (25 x 10³/ml) for 7 days in Th1 [IL-12 (10 ng/ml) and anti-IL-4 (10 μ g/ml) mAb] or in Th2 [IL-4 (20 ng/ml) and anti-IFN- γ (10 μ g/ml) mAb] polarizing conditions. Cells were washed and restimulated with plastic-coated anti-CD3 mAb (1 μ g/ml) for 2 days. IFN- γ and IL-4 were measured by ELISA at the end of the restimulation (Mann-Whitney Test, **: p < 0.01 n=5 independent experiments).

Figure. 1

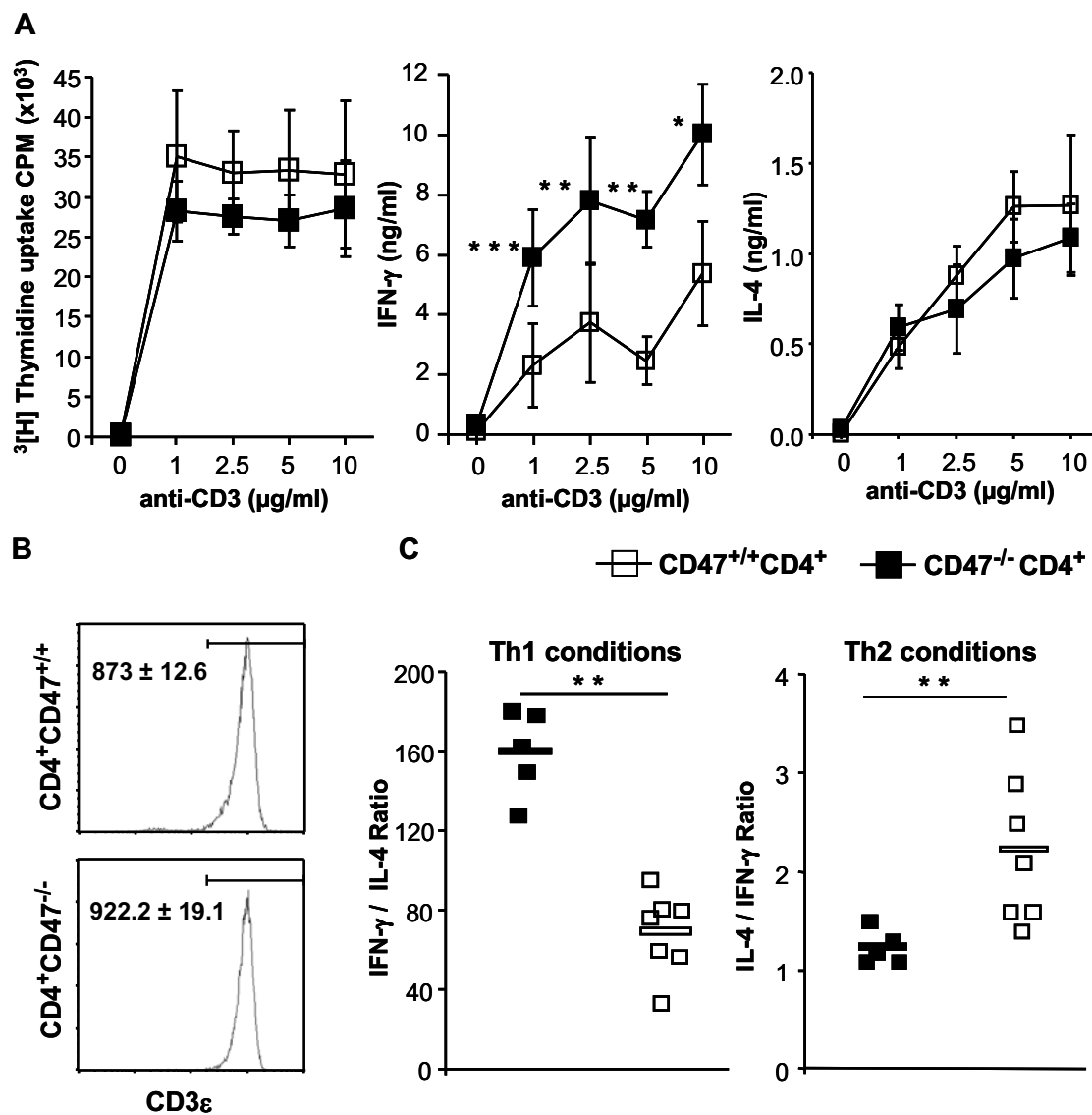


Figure 2. CD47 deficiency favors Th1 differentiation *in-vivo*.

CFSE-labelled CD47^{+/+} and CD47^{-/-}Tg T cells were adoptively transferred to CD47^{+/+} or CD47^{-/-} naïve mice, respectively, one day prior s.c. immunization with 50 µg of OVA peptide in IFA. On day 7, the draining LN were recovered: **(A)** CFSE dilution profiles of responding Tg T cells after gating on clonotypic KJ1.26⁺CD4⁺ T cells (left and middle panels). IFN-γ and IL-4 production among KJ1.26⁺CD4⁺ T cell was analyzed by intracellular cytokine staining following OVA peptide stimulation for 6-h in the presence of Golgi Stop (right panel). Data are representative of three to six mice per group. Numbers indicate the percentage of positive cells in each quadrant and the mean fluorescence intensity. **(B)** *In vitro* recall responses to OVA of CD47^{-/-} or CD47^{+/+}Tg T cells. LN cells (2 x 10⁶/ml) were cultured with increasing concentrations of OVA peptide. Cell proliferation, IFN-γ and IL-4 secretion were measured after 72-h. Data represent the mean ± SEM of 5 to 8 individually analyzed LN from separate mice. **(C)** Intracellular cytokine production gated on KJ1.26⁺CD4⁺ T cells. Draining LN cells were stimulated with OVA (10 µg/ml) for 4 days and Golgi Stop was added for the last 6-h. Number indicate percentage of cytokine-producing KJ1.26⁺CD4⁺ T cells and mean fluorescence intensity. One representative experiment out of three mice per group.

Figure 2

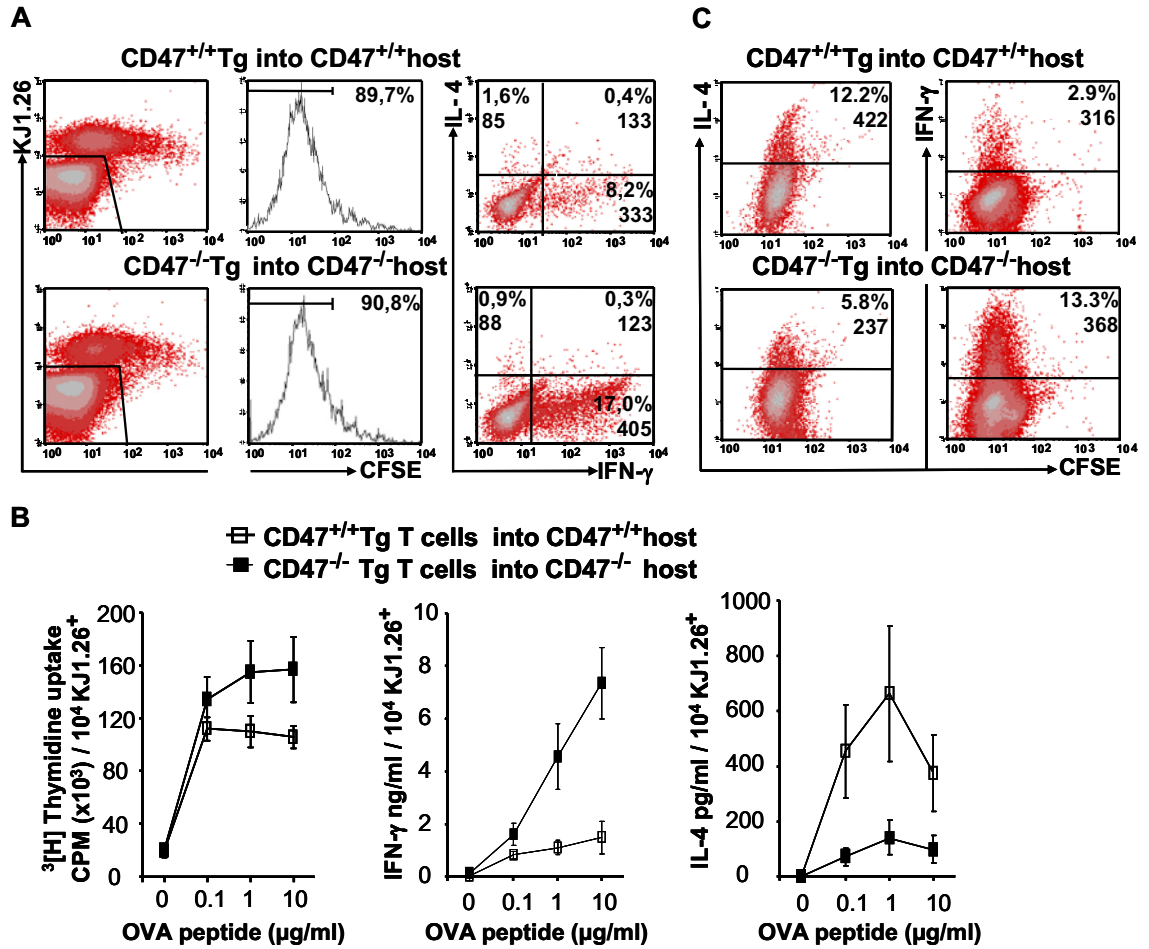
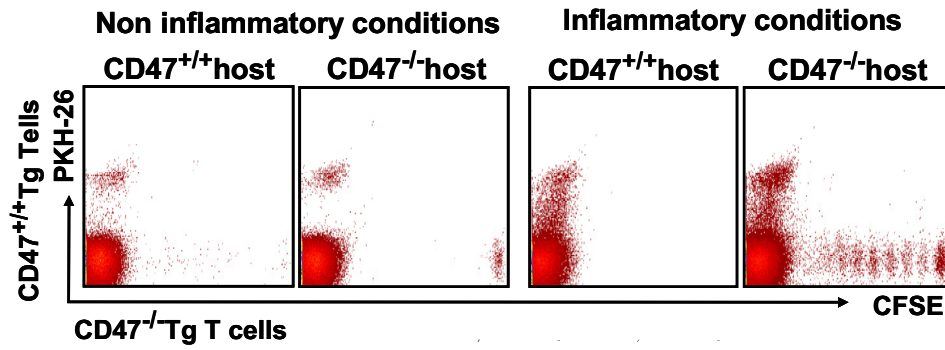


Figure 3. Impact of CD47-deficient environment on *in vivo* CD4⁺Tg T cell responses

(A) CFSE-labelled CD47^{-/-}Tg T cells were eliminated from the draining LN of CD47^{+/+} recipients in homeostatic and inflammatory conditions. CFSE-labelled CD47^{-/-}Tg T cells and PKH 26-labeled CD47^{+/+}Tg T cells were co-injected at a 1:1 ratio into naïve CD47^{+/+} or CD47^{-/-} BALB/c recipients. On day 1, some mice were immunised s.c. with OVA peptide in IFA (inflammatory condition). Shown are CFSE and PKH-26 profiles on gated clonotypic KJ1.26⁺CD4⁺ T cells. Data are representative of at least 2 mice per group (B) CD47^{+/+}Tg T cells were passively transferred into CD47^{+/+} or CD47^{-/-} syngeneic recipients. One day later, mice were immunized s.c. with 0.25 x 10⁶ activated OVA-pulsed CD47^{+/+} BMDCs. After 72-h, the draining LN were extracted and LN cells were stimulated with 10 µg/ml OVA peptide. ³[H] Thymidine incorporation and IFN-γ production were measured on day 3. Data represent mean ± SEM of three to five individually analysed LN from separate mice.

Figure 3

A



B

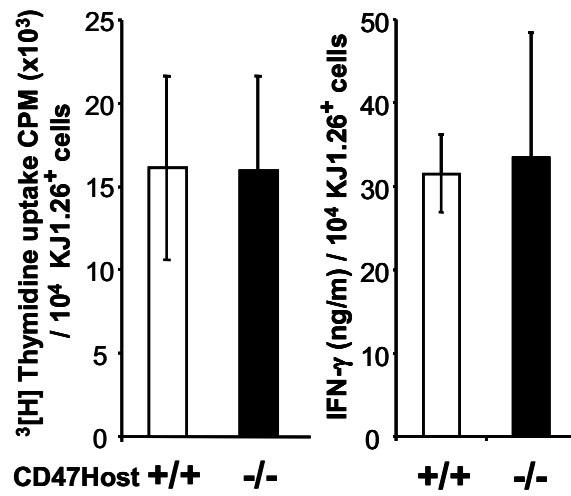


Figure 4. CD47 deficiency on DC and T cells enhances IL-12, IFN- γ and T-bet expression.

(A) Purified CD47^{+/+} or CD47^{-/-}Tg T (1 x 10⁵/ml) were cocultured for 3-4 days with CD47^{+/+} or CD47^{-/-}BMDCs (5 x 10⁴/ml) loaded with increasing concentrations of OVA peptide. Cells were restimulated with mitomycin-C-treated APC with increasing dose of OVA peptide. IFN- γ secretion was detected at the end of a 3 days culture by ELISA. One representative experiment out of three. (B) 0.5 x 10⁶ CD47^{-/-} or CD47^{+/+} BMDC were stimulated with lipopolysaccharide LPS (1 μ g/ml) and IFN- γ (20 ng/ml). Supernatants were harvested at 24h, and assayed for IL-12p70 and IL-10 by ELISA. The error bars represent standard deviations of SEM of 5 five independent experiments. (C) Naïve CD47^{+/+} or CD47^{-/-}Tg T cells were stimulated with OVA peptide (10 μ g/ml) in the presence of CD47^{-/-} mitomycin-C-treated T-cell depleted splenocytes (APC) for 5 days. Cell lysates were analysed by Western-blot for T-bet expression. As positive control, CD47^{+/+}Tg T cells were activated in Th1 polarizing conditions. One representative experiment out of three. (D) Naïve CD47^{+/+} or CD47^{-/-}Tg T cells were primed *in vitro* with CD47^{-/-} mitomycin-C-treated (APC) with OVA peptide (10 μ g/ml), in the presence or absence neutralizing antibodies to IL-12. After 4 days priming, CD4⁺ T cells were collected and expanded in IL-2 for another 3 days. CD4⁺ T cells were then restimulated 6 hour with PMA and ionomycin and T-Bet expression was determined by intracellular staining (4B10, Santa Cruz Biotechnology). One representative experiment out of two.

Figure 4

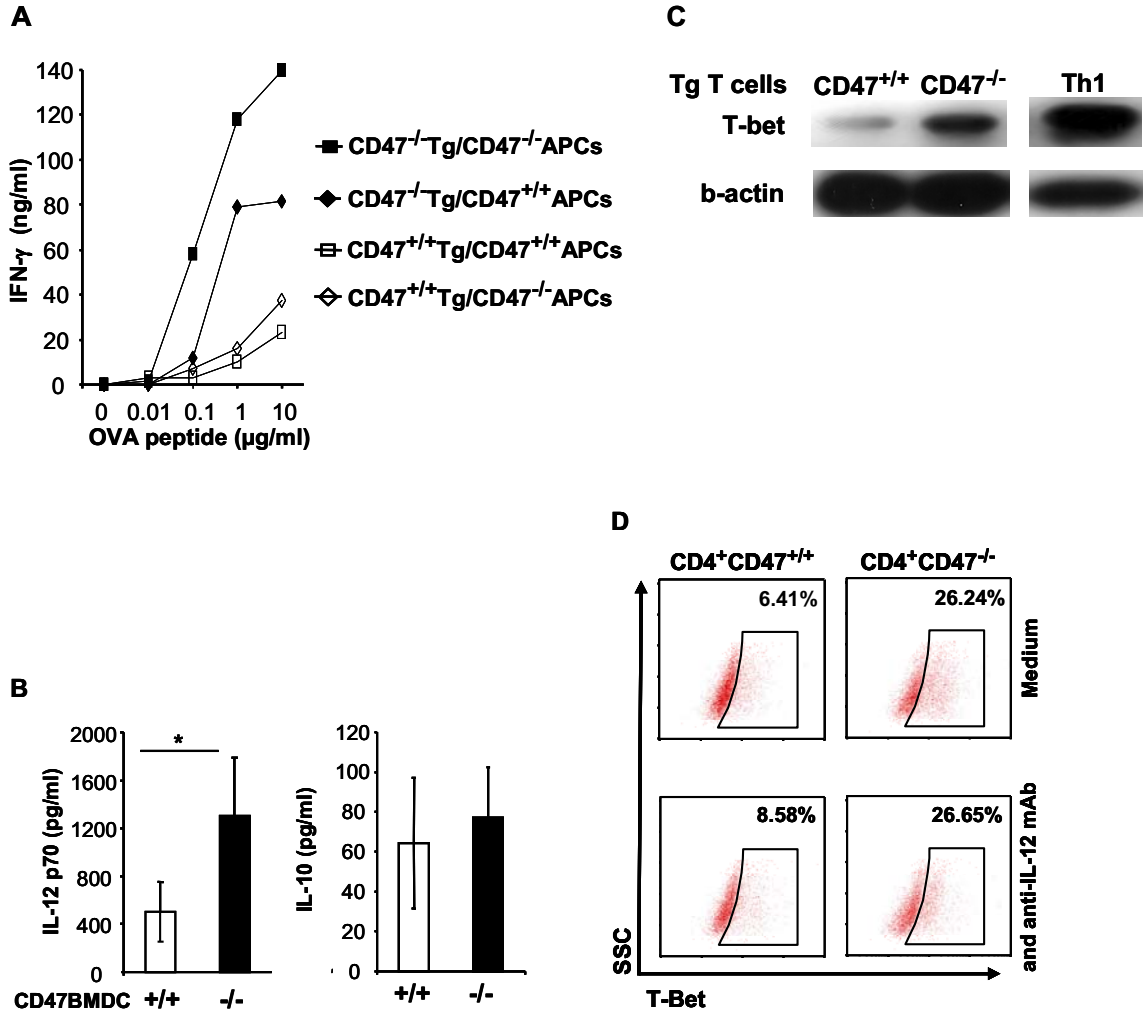
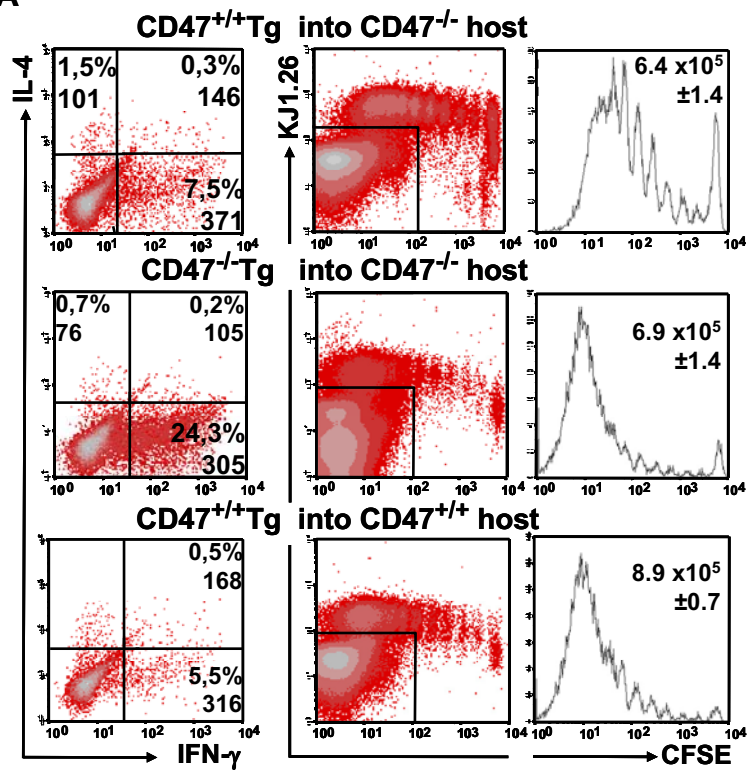


Figure 5. Absence of CD47 on CD4⁺ T cells favours Th1 polarization *in vivo*.

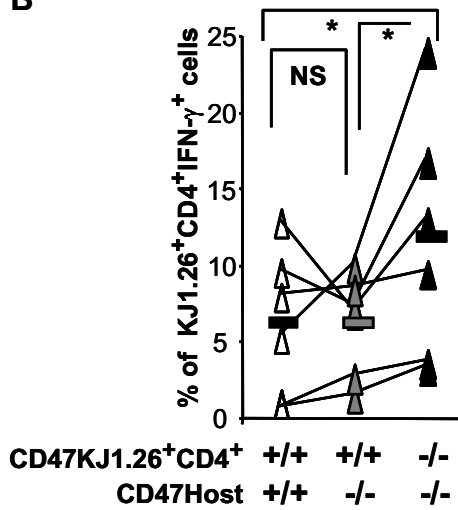
(A) CFSE-labelled CD4⁺Tg T cells lacking or not CD47 were adoptively transferred into naive CD47^{-/-} or CD47^{+/+} hosts. At day 1, mice were immunised s.c. with OVA peptide in IFA. After 7 days, draining LN were recovered, and cell proliferation was assessed by CFSE dilution profiles (gated on CD4⁺ and KJ1.26⁺ T cells) and numbers indicate the total cell recovery (middle and right panel). LN were stimulated with OVA peptide for 6-h in the presence of Golgi Stop. Shown are the frequencies of IFN- γ and IL-4 producing cells and mean fluorescence intensity among KJ1.26⁺CD4⁺ T cells (left panel). Data are representative of three mice per group. (B, C) Shown are the proportion of KJ1.26⁺IFN- γ ⁺CD4⁺ T cells (B) and the IFN- γ /IL-4 ratio in draining LN (C). Each individually analyzed LN is represented by a single dot for separate experiment. The average value for each group is represented by a horizontal bar. (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, *: p< 0.05).

Figure 5

A



B



C

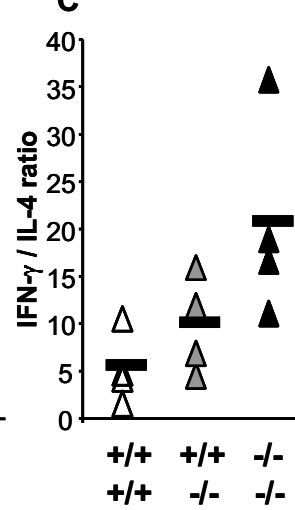


Figure 6. Th1-biased antibody profile in CD47^{-/-} mice

(A) CD47^{-/-} mice showed enhanced secretion of IgG2a and IgG2b Ab at steady state and upon immunisation. Immunoglobulin isotype from the sera of 6 to 9 week-old female mice were quantified by ELISA. Of note, similar data was obtained with male mice. (B) Female mice were immunised i.p. with 50 µg ovalbumin either in complete Freund's adjuvant (CFA, favour Th1/Th2 mixed response) or in alum (Th2 response). 35 days after the injection, the mice were bled and OVA-specific antibodies were quantified by ELISA (C). The mice were rechallenged i.p. on day 35 with 50 µg OVA, either in alum or for CFA previously immunised mice, in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Seven days after the second injection, the mice were bled and OVA-specific antibodies were quantified by ELISA. ***: p <0.001; **: p <0.01.

Figure 6

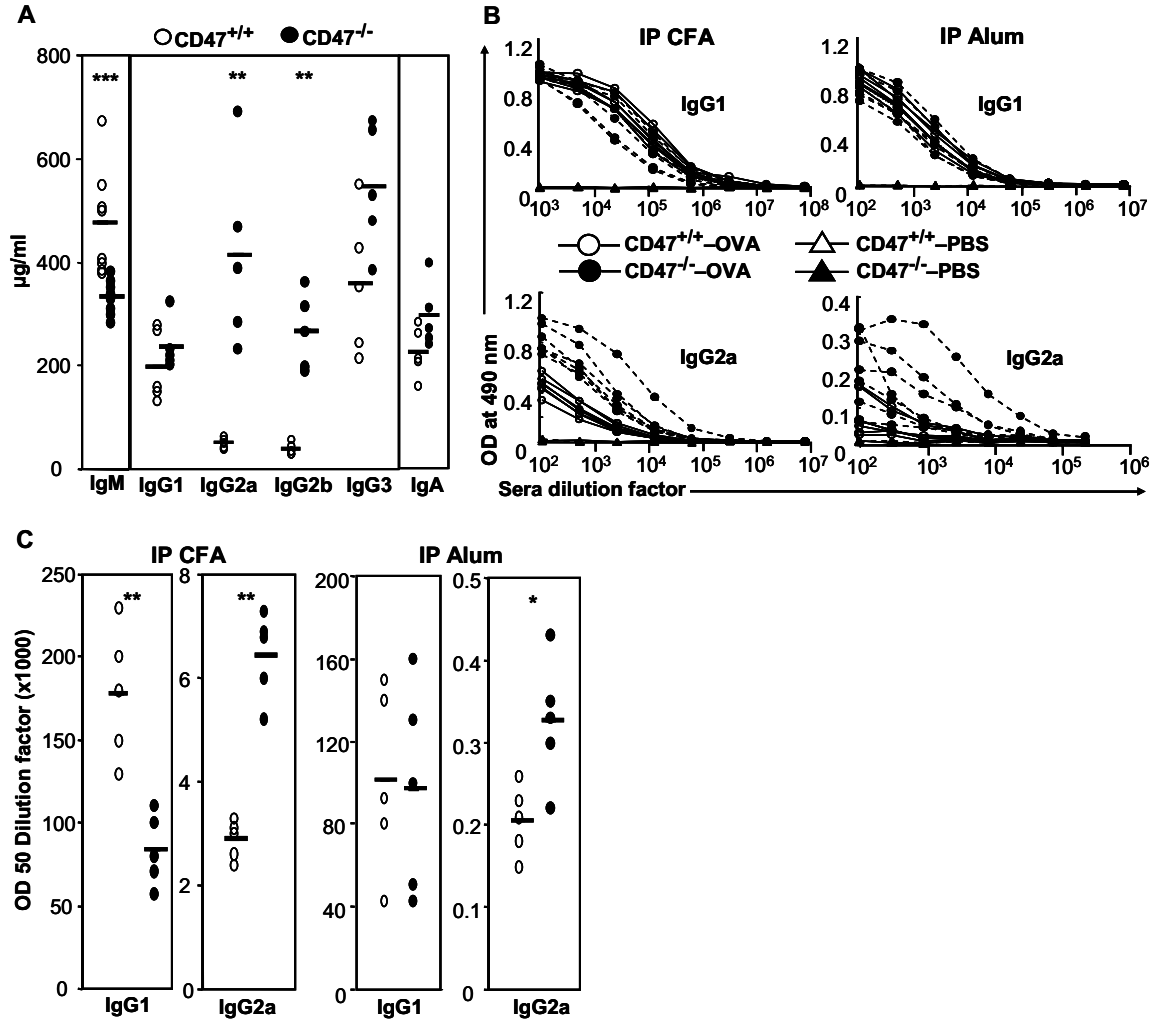


Figure 7. Enhanced Ag-specific Th1 responses with no B cell-intrinsic defect in non transgenic CD47^{-/-} mice

(A) Intracellular IFN- γ production gated on CFSE⁺CD4⁺ T cells. Balb/c or CD47^{-/-} mice were immunized s.c. with 25 μ g of OVA protein and 1 μ g of LPS (*E.Coli*) in IFA. On day 7, the draining LN cells were labeled with CFSE and stimulated with OVA protein (2 mg/ml) for 48-72h. Golgi Stop was added for the last 6-h. Histograms indicate a percentage of CFSE⁺IFN- γ -producing CD4⁺ T cells. Data represent mean \pm SEM of seven to eight individually analyzed LN from separate mice (Unpaired t test *: p < 0.05). **(B)** Absence of B cell-intrinsic defect in CD47 deficient mice. B cells were purified from spleen by anti-CD43 negative selection and cultured *in vitro* for 5 to 7 days with LPS (10 μ g/ml), or IL-4 (20 ng/ml) plus either CD40L (1 μ g/ml) or anti-CD40 mAb (1 μ g/ml). Antibody production was measured by ELISA. Data represent mean \pm SD of four mice per group.

Figure 7

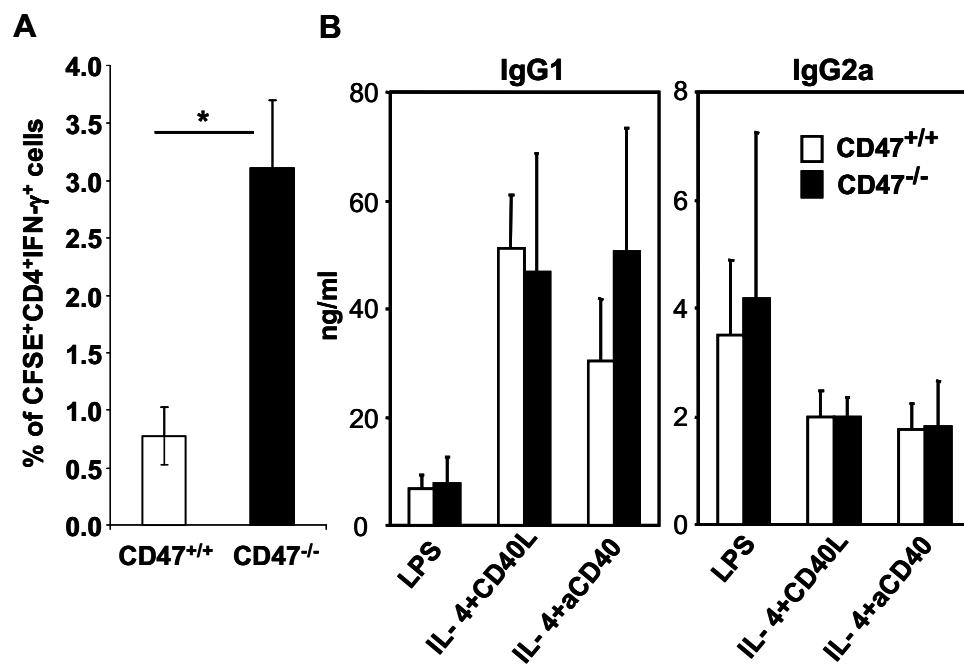
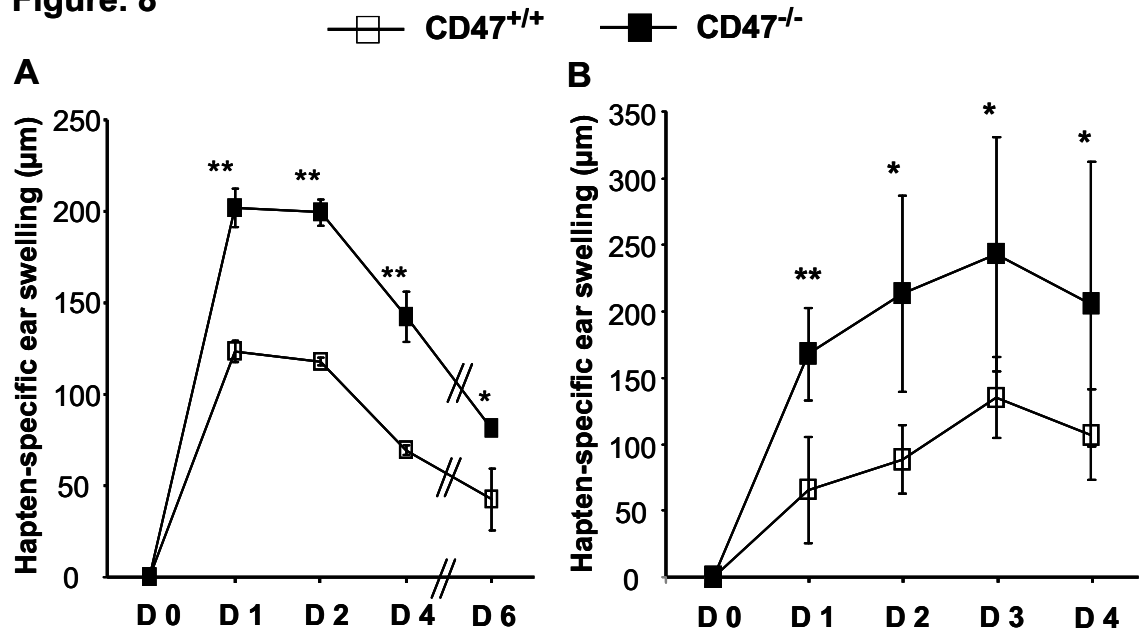


Figure 8. Exacerbated DNFB-induced CHS response in CD47^{-/-} mice.

(A) Mice were sensitized by painting the shaved abdomen with 0.5% DNFB and boosted 5 days later. On day 19, the right ear was challenged with 0.2 % DNFB and the left ear was painted with vehicle (acetone). Ear thickness was measured 24-h to later. Results are expressed as the mean \pm SEM ear swelling (μm). (B) CHS response after the T cell adoptive transfer. Mice were immunized and challenged as in A. On day 38, hyper immunised CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice were boosted with 0.5% DNFB on the shaved abdomen. On day 40, T cells were recovered from draining LN and 3×10^6 cells were passively transferred in naïve CD47^{-/-} recipients. Ear challenge with 0.5% DNFB was performed 18-h after adoptive T cell transfer and the CHS response was measured on the next day. Panel A and B results are expressed as the mean \pm SEM of ear swelling (μm). Hapten-specific ear swelling was calculated as follows: [treated ear thickness – control ear thickness] – background swelling. (Paired t test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, $n =$ at least 6 mice per group). Data are one representative experiment of two.

Figure. 8



References

1. Mosmann, T., H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin, and R. Coffman. 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.
2. Abbas, A., K. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793.
3. O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-283.
4. Murphy, K. M., W. Ouyang, J. D. Farrar, J. Yang, S. Ranganath, H. Asnagli, M. Afkarian, and T. L. Murphy. 2000. Signaling and transcription in T helper development. *Annual review of immunology* 18:451-494.
5. Berenson, L. S., N. Ota, and K. M. Murphy. 2004. Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved. *Immunological reviews* 202:157-174.
6. Ansel, K. M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao. 2006. Regulation of Th2 differentiation and *Il4* locus accessibility. *Annual review of immunology* 24:607-656.
7. Imanishi, T., H. Hara, S. Suzuki, N. Suzuki, S. Akira, and T. Saito. 2007. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* 178:6715-6719.
8. de Jong, E. C., H. H. Smits, and M. L. Kapsenberg. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer seminars in immunopathology* 26:289-307.
9. Glimcher, L. H., and K. M. Murphy. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes & development* 14:1693-1711.
10. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology* 21:713-758.
11. Djuretic, I. M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao, and K. M. Ansel. 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate *Ifng* and silence *Il4* in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8:145-153.
12. Villarino, A., L. Hibbert, L. Lieberman, E. Wilson, T. Mak, H. Yoshida, R. A. Kastelein, C. Saris, and C. A. Hunter. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19:645-655.
13. Morgan, R., G. Gao, J. Pawling, J. W. Dennis, M. Demetriou, and B. Li. 2004. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol* 173:7200-7208.
14. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks. 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 204:285-297.
15. Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, T. A. Wynn, M. Kamanaka, R. A. Flavell, and A. Sher. 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-)

Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of experimental medicine* 204:273-283.

16. Sabatos, C. A., S. Chakravarti, E. Cha, A. Schubart, A. Sanchez-Fueyo, X. X. Zheng, A. J. Coyle, T. B. Strom, G. J. Freeman, and V. K. Kuchroo. 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 4:1102-1110.
17. Zhu, C., A. C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S. J. Khoury, X. X. Zheng, T. B. Strom, and V. K. Kuchroo. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6:1245-1252.
18. Brown, E. J., and W. A. Frazier. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in cell biology* 11:130-135.
19. Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, Y. F. Fang, C. F. Lagenaur, H. D. Gresham, and F. P. Lindberg. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science (New York, N.Y)* 288:2051-2054.
20. 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. *Nature medicine* 5:1277-1284.
21. Motegi, S., H. Okazawa, H. Ohnishi, R. Sato, Y. Kaneko, H. Kobayashi, K. Tomizawa, T. Ito, N. Honma, H. J. Buhring, O. Ishikawa, and T. Matozaki. 2003. Role of the CD47-SHPS-1 system in regulation of cell migration. *The EMBO journal* 22:2634-2644.
22. 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. *The Journal of experimental medicine* 185:1-11.
23. Ticchioni, M., V. Raimondi, L. Lamy, J. Wijdenes, F. P. Lindberg, E. J. Brown, and A. Bernard. 2001. Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow. *Faseb J* 15:341-350.
24. Li, Z., L. He, K. Wilson, and D. Roberts. 2001. Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation. *J Immunol* 166:2427-2436.
25. Waclavicek, M., O. Majdic, T. Stulnig, M. Berger, T. Baumruker, W. Knapp, and W. F. Pickl. 1997. T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4. *J Immunol* 159:5345-5354.
26. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *J Immunol* 167:2459-2468.
27. Grimbert, P., S. Bouguermouh, N. Baba, T. Nakajima, Z. Allakhverdi, D. Braun, H. Saito, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2006. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *J Immunol* 177:3534-3541.

28. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 165:4624-4631.
29. Van, V. Q., S. Lesage, S. Bouguermouh, P. Gautier, M. Rubio, M. Levesque, S. Nguyen, L. Galibert, and M. Sarfati. 2006. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *The EMBO journal* 25:5560-5568.
30. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol* 167:2547-2554.
31. Gardai, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak, and P. M. Henson. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.
32. Blazar, B. R., F. P. Lindberg, E. Ingulli, A. Panoskaltsis-Mortari, P.-A. Oldenborg, K. Iizuka, W. M. Yokoyama, and P. A. Taylor. 2001. CD47 (Integrin-associated Protein) Engagement of Dendritic Cell and Macrophage Counterreceptors Is Required to Prevent the Clearance of Donor Lymphohematopoietic Cells. 541-550.
33. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.
34. Sporri, R., and C. Reis e Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 6:163-170.
35. Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertonni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6:769-776.
36. Fritz, J. H., L. Le Bourhis, G. Sellge, J. G. Magalhaes, H. Fsihi, T. A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R. L. Ferrero, S. E. Girardin, and D. J. Philpott. 2007. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 26:445-459.
37. Hagnerud, S., P. P. Manna, M. Cella, A. Stenberg, W. A. Frazier, M. Colonna, and P. A. Oldenborg. 2006. Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. *J Immunol* 176:5772-5778.
38. Ishizaki, K., A. Yamada, K. Yoh, T. Nakano, H. Shimohata, A. Maeda, Y. Fujioka, N. Morito, Y. Kawachi, K. Shibuya, F. Otsuka, A. Shibuya, and S. Takahashi. 2007. Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol* 178:605-612.

39. Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265.
40. O'Leary, J. G., M. Goodarzi, D. L. Drayton, and U. H. von Andrian. 2006. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7:507-516.
41. Kaplan, D. H., M. C. Jenison, S. Saeland, W. D. Shlomchik, and M. J. Shlomchik. 2005. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23:611-620.
42. Wu, X., W. Hou, S. Sun, E. Bi, Y. Wang, M. Shi, J. Zang, C. Dong, and B. Sun. 2006. Novel function of IFN- γ : negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming. *J Immunol* 177:934-943.
43. Lamy, L., A. Foussat, E. J. Brown, P. Bornstein, M. Ticchioni, and A. Bernard. 2007. Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation. *J Immunol* 178:5930-5939.
44. Manna, P. P., J. Dimitry, P. A. Oldenborg, and W. A. Frazier. 2005. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 280:29637-29644.
45. Mateo, V., E. J. Brown, G. Biron, M. Rubio, A. Fischer, F. L. Deist, and M. Sarfati. 2002. Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization. *Blood* 100:2882-2890.
46. Doyen, V., M. Rubio, D. Braun, T. Nakajima, J. Abe, H. Saito, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2003. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *The Journal of experimental medicine* 198:1277-1283.
47. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 189:587-592.
48. Soares, H., H. Waechter, N. Glaichenhaus, E. Mougneau, H. Yagita, O. Mizenina, D. Dudziak, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2007. A subset of dendritic cells induces CD4 $^+$ T cells to produce IFN- γ by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *The Journal of experimental medicine* 204:1095-1106.
49. Skokos, D., and M. C. Nussenzweig. 2007. CD8 $^+$ DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS. 1525-1531.
50. Barclay, A. N., and M. H. Brown. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 6:457-464.
51. Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *The Journal of experimental medicine* 185:817-824.

52. Krymskaya, L., W. H. Lee, L. Zhong, and C. P. Liu. 2005. Polarized development of memory cell-like IFN-gamma-producing cells in the absence of TCR zeta-chain. *J Immunol* 174:1188-1195.
53. Niedbala, W., X. Q. Wei, C. Campbell, D. Thomson, M. Komai-Koma, and F. Y. Liew. 2002. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:16186-16191.
54. Isenberg, J. S., L. A. Ridnour, J. Dimitry, W. A. Frazier, D. A. Wink, and D. D. Roberts. 2006. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *The Journal of biological chemistry* 281:26069-26080.
55. Li, S. S., Z. Liu, M. Uzunel, and K. G. Sundqvist. 2006. Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion. *Blood* 108:3112-3120.
56. Feuerer, M., K. Eulenburg, C. Loddenkemper, A. Hamann, and J. Huehn. 2006. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol* 176:2857-2863.
57. Zhang, J. 2007. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *The Journal of clinical investigation* 117:871-873.
58. Wang, Z., J. Hong, W. Sun, G. Xu, N. Li, X. Chen, A. Liu, L. Xu, B. Sun, and J. Z. Zhang. 2006. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. *The Journal of clinical investigation* 116:2434-2441.
59. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
60. Gocke, A. R., P. D. Cravens, L. H. Ben, R. Z. Hussain, S. C. Northrop, M. K. Racke, and A. E. Lovett-Racke. 2007. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol* 178:1341-1348.
61. Lammas, D. A., J. L. Casanova, and D. S. Kumararatne. 2000. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-gamma (IFN-gamma) pathway. *Clinical and experimental immunology* 121:417-425.
62. Cameron, C. M., J. W. Barrett, M. Mann, A. Lucas, and G. McFadden. 2005. Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the downregulation of macrophage activation in vivo. *Virology* 337:55-67.

3. Article III

Résumé Article III

La costimulation via CD28 inhibe le développement Th17

Les cellules Th17 participent à la défense de l'hôte contre les pathogènes et à la pathogénèse des maladies auto-immunitaires. La costimulation médiée par CD28/B7 est impliquée dans l'induction et l'évolution de maladies auto-immunitaires, mais son rôle dans le contrôle du développement Th17 reste à clarifier. Nous rapportons qu'un mAc soluble anti-CD28 inhibe la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves activées avec de l'anti-CD3 en cellules T productrices d'IL-17 en conditions polarisantes Th17. La costimulation par CD28 réduisait la fréquence des cellules qui proliféreraient et produisaient l'IL-17. Nous avons montré que la suppression induite par l'engagement du CD28 était médiée par la production de l'IL-2 et de l'IFN- γ . L'inhibition du développement Th17 était corrélée à une diminution plutôt qu'une augmentation du pourcentage de cellules T CD4⁺Foxp3⁺ régulatrices. Lorsque mise en présence de cellules CD4⁺ naïves, les cellules dendritiques matures (DCs) étaient moins efficaces que les DCs immatures dans leur aptitude à favoriser la différenciation Th17, alors que le CTLA4-Ig, une molécule bloquant l'interaction entre CD28/B7 et CTLA4/B7, facilitait la différenciation des cellules murines et humaines en Th17 *in vitro*. Cette étude identifie l'importance de la costimulation par B7 dans la régulation négative du développement Th17. Ces résultats inattendus nous appellent à la prudence lors du développement de visant à interférer avec la voie de signalisation CD28/B7, dans la perspective de traiter les maladies auto-immunes humaines.

Ma contribution représente 90% du travail expérimental.

CD28 Co-Stimulation Down Regulates Th17 Development

PLoS One. 2009; 4(3): e5087. Epub 2009 Mar 31.

Salim Bouguermouh*, Geneviève Fortin*, Nobuyasu Baba*, Manuel Rubio* and Marika Sarfati*.

Immunoregulation laboratory, CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, Montreal, QC, H2L 4M1, Canada.*

Running title: CD28 co-stimulation down regulates Th17 development.

Address correspondence and reprint requests:

Dr. Marika Sarfati,

Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM)

Hôpital Notre-Dame, Immunoregulation Laboratory, (Pavillon Mailloux, M4211K)

1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada.

Phone: 1-514-890-8000 Ext. 26701

Fax: 1-514-412-7652

E-mail address: m.sarfati@umontreal.ca

This work was supported by grant from the Canadian Institute for Health and Research (CIHR Grant, MOP-53152). S.B. is a recipient of the Canadian Institutes for Health Research/Canada Graduate Scholarships Doctoral Award.

Abstract

Th17 cells are implicated in host defence and autoimmune diseases. CD28/B7 co-stimulation is involved in the induction and progression of autoimmune diseases, but its role in controlling murine Th17 cell fate remains to be clarified. We here report that soluble anti-CD28 mAb suppressed the differentiation of anti-CD3-stimulated naïve CD4⁺ T cells into IL-17-producing cells. We provide evidence for an IL-2 and IFN- γ -dependent mechanism of CD28-mediated IL-17 suppression. While Th17 differentiation was enhanced in the presence of regulatory T cells. CD28 blockade of Th17 development was correlated with a decrease rather than an increase in the percentage of Foxp3⁺ T cells. In APC/T cell co-cultures, mature dendritic cells (DC) were less efficient than immature DC in their ability to support Th17 cell differentiation, while CTLA4-Ig, an agent blocking CD28/B7 and CTLA4/B7 interactions, facilitated both murine and human Th17 differentiation. This study identifies the importance of B7 costimulatory molecules in the negative regulation of Th17 development. These unexpected results caution targeting the CD28/B7 pathways in the treatment of human autoimmune diseases.

Introduction

Th17 cells play a central role in autoimmune inflammatory conditions such as multiple sclerosis (MS) [1], rheumatoid arthritis (RA) [2] and Crohn's disease [3]. Th17 cells are also involved in the protection against several pathogens including *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacteria tuberculosis* and *Candida albicans* [4]. These cells are characterised by the expression of the transcription factor ROR γ t and the production of the cytokines IL-17, IL-22, IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). The *in vitro* differentiation of the murine Th17 cell lineage depends on the synergy between transforming growth factor- β (TGF- β) and IL-6, combined with the neutralization of IFN- γ and IL-4. TNF- α and IL-1 β act as amplifiers, while IL-23 stabilizes the Th17 phenotype [5,6,7,8,9]. The combination of TGF- β and IL-21 constitutes an alternative pathway for Th17 development [10]. The activation and differentiation of CD4⁺ T helper lymphocytes into Th1 or Th2 cells requires both T cell receptor/MHC-peptide specific recognition and costimulatory signals. The best-defined costimulatory pathway involves the B7 family, where B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) molecules on antigen presenting cells interact with CD28 and CD152 (CTLA-4) on T cells [11,12,13]. However, the precise role of these co-stimulatory molecules in the regulation of Th17 development remains unclear. The rationale for assessing the role of CD28 signalling in Th17 differentiation stemmed from reports demonstrating that treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) with anti-CD80 or anti-CD86 Abs or multiple injections of CTLA4-Ig resulted in enhanced disease severity [14,15]. Additionally, B7 deficiency facilitates autoimmunity, and this, among other possible mechanisms, was attributed to a loss or inactivation of regulatory T cells [12,16].

Moreover, the development of diabetes in Non-obese Diabetic (NOD) mice is exacerbated by deletion of CD28 [17].

Finally, the clinical report of the development of ulcerative colitis during CTLA4-Ig (abatacept) therapy in a patient with RA reinforces our hypothesis that co-stimulatory molecules may regulate human Th17 development [18]. We here demonstrate that CD28 signalling suppresses Th17 differentiation, while CTLA4-Ig blockade promotes mouse and human Th17 polarization *in vitro*.

Materials and Methods

Mice

All 8- to 12-week-old BALB/c mice were housed in our breeding colony and animal care facility under specific pathogen-free conditions. All experimental protocols were approved by the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CRCHUM) and the Canadian Council on Animal Care.

Culture medium, Antibodies and Reagents

Mouse cells were cultured in complete RPMI-1640 medium (Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum, Penicillin (500 U/ml), Streptomycin (500 µg/ml), HEPES buffer (10 mM), and 2-ME (1 mM), (GIBCO-BRL). LPS (*E.Coli*) was obtained from Sigma-Aldrich. Recombinant mouse IL-1, IL-6 and Recombinant human TGF-β1 were purchased from R&D Systems. GM-CSF and anti-murine IL-2 were purchased from PeproTech. Mitomycin-C was purchased from EMD Chemicals. The following clones were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and purified in our laboratory: GK1.5 (anti-CD4, biotinylated); R46A2 (anti-IFN-γ); 11B11 (anti-IL-4), IM7.8.1 (anti-

CD44, biotinylated). Allophycocyanin, FITC or PerCP-conjugated anti-mouse CD4, Streptavidin-PerCP, allophycocyanin-conjugated anti-mouse IL-2, IFN- γ , anti-mouse CD28 and purified mouse CTLA4-Ig fusion protein were purchased from BD Biosciences PharMingen (Mississauga, ON, CA). PE- or allophycocyanin-conjugated anti-mouse IL-17A and anti-mouse CD3 were purchased from Biolegend. Recombinant murine IL-23 and anti-mouse Foxp3-PE staining kits were purchased from eBioscience. PE-conjugated anti-mouse CD62L was purchased from Caltag Laboratories.

Cell purification and *in vitro* generation of Th17 cells.

Total CD4⁺ T cells were purified from spleen and peripheral lymph nodes (LNs) by positive selection using immunomagnetic beads according to the manufacturer's protocol (EasySep Biotin Selection Kit, StemCell Technologies Inc, Vancouver, BC, CA). For some experiments, naïve CD4⁺ (CD4⁺CD62L^{high}CD44^{low}) and memory CD4⁺ (CD4⁺CD62^{low}) T cells were isolated from splenocytes by sorting using a Becton Dickinson FACS Aria (BD Bioscience). Cells (1×10^6 cells/ml) were activated with plate-bound anti-mouse CD3 (5 or 10 μ g/ml) in flat bottom 96-well plates in the presence of the Th17-promoting cytokine cocktail IL-1 α , IL-6, IL-23 (10 ng/ml) and TGF- β 1, (1 ng/ml) with or without anti-mouse CD28 mAb (2 μ g/ml). For some experiments, 10 μ g/ml of neutralizing anti-mouse antibody (anti-IL-2, anti-IFN- γ and anti-IL-4) were added to the cultures after 4-5 days. Recovery of viable cells was assessed by trypan blue exclusion. The cells were restimulated during 6 h with PMA/ionomycin. For Treg cell experiments, total CD4⁺ T cells, CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells were separated from spleen or peripheral LNs using the EasySep Negative Selection Mouse CD4⁺ T cell Enrichment Kit followed by the mouse CD25-Microbeads Kit (Miltenyi Biotec) according to the

manufacturer's protocols. CD4⁺CD25⁻ T cells (1×10^6 cells/ml) were cultured alone or in the presence of CD4⁺CD25⁺ T cells at two different CD4⁺CD25⁻/CD25⁺ ratios (1/1, 1/0.25) for 4-5 days and activated on anti-CD3 (10 µg/ml) coated plates under Th17 conditions in the presence or the absence of anti-mouse CD28 mAb.

Culture of CD4⁺ T cells with BMDC

Bone marrow-derived DC (BMDC) were generated as described previously [19]. In some experiments, BMDC were activated overnight with 1 µg/ml of LPS (mBMDC). CD4⁺ T cells (2.5×10^5 cells/ml) were purified from spleens as described and stimulated with soluble (2 µg/ml) or coated anti-CD3 (5 µg/ml) in the presence of immature (untreated) or mature (treated with LPS) mitomycin-C-treated BMDC at different CD4⁺/BMDC ratios (2/1, 1/1, 1/2). The cultures were supplemented with the Th17 promoting cytokine cocktail. In some experiments, mouse CTLA4-Ig (20 µg/ml) fusion protein was added to CD4⁺/mBMDC cultures.

Intracellular cytokine staining

For intracellular staining, cells were restimulated for 6 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (10 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) in the presence of brefeldin A (1 µg/ml) per 1×10^6 cells. Cells were stained in the presence of Fcγ Blocker (Clone 24G2) with FITC, PerCP or allophycocyanin-conjugated anti-CD4 antibodies, fixed and permeabilized (BD Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences PharMingen or eBioscience for Foxp3 staining). Cells were assessed for IL-17, IFN-γ, IL-2 and Foxp3 expression. Data were acquired on a Becton Dickinson FACS Calibur (BD Bioscience) and analyzed with Cell Quest software.

ELISA

The production of IL-17 and IFN- γ were measured with the IL-17 Duoset ELISA kit (R&D Systems) and the OptEIA Mouse IFN- γ ELISA set (BD PharMingen), respectively, according to the manufacturer's protocols.

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from cell cultures using the RNeasy mini kit (Qiagen, Mississauga, ON) and reverse-transcribed using the cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time PCR was performed using an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) (1 PCR cycle, 95°C, 10 minutes; 40 PCR cycles, 60°C, 1 minute, 95°C, 15 seconds). cDNA was amplified in a 10 μ L final reaction mix containing TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and corresponding TaqMan® Gene Expression Assays (Mm00444241_m1 (IL-22), Mm00439619_m1 (IL-17a), Hs99999901_s1 (Eukaryotic 18s rRNA), Applied Biosystems). Signals were analyzed by the ABI Prism Sequence Detection System software version 2.2 (Applied Biosystems). The comparative Ct method for relative quantification was used, whereby all threshold cycles (Ct) are first normalized to the expression of an endogenous control (18s rRNA). The normalized values were then divided by the average delta Ct value of anti-CD3-stimulated samples. Here, the cytokine expression is represented as a fold-change relative to CD3-stimulated cells \pm SEM.

Human DC/T co-cultures

Human PBMC were obtained from healthy volunteers in compliance with the Institutional (CRCHUM) Research Ethics Committee. Naïve CD4⁺ T were isolated from total PBMC

using the human CD4⁺ Naïve T cell Enrichment Kit (Stem Cell Technologies). The purity of adult human naïve CD4⁺ T cells was >99% CD4⁺CD45RA⁺ and comprised <0.5% single CD45RORA⁺ cells by flow cytometry analysis. Naïve CD4⁺ T cells were co-cultured for 5 days with mature monocyte-derived DCs at a DC/T ratio of 1/25 in Yssel's medium (Gemini Bio-product) supplemented with 2% human AB serum (Wisent) in the presence of 100 ng/ml of soluble anti-CD3 (OKT-3; Janssen-Ortho) with or without Human CTLA4-Ig fusion protein (5 µg/ml) (Abatacept, Oncia, Bristol-Myers Squibb Canada) for 5 days. Primed T cells were expanded for 5 days in the presence of IL-2 (20 U/ml, R&D Systems). T cells were restimulated for 6 h with PMA (5 ng/ml) and ionomycin (0.5 µg/ml) in the presence of monensin (3 µM). Intracytoplasmic staining was performed using BD Cytfix/Cytoperm and anti-IL-17-APC (R&D System). Culture supernatants were collected after re-stimulation and IL-17, IL-22 and IFN-γ were detected by ELISA (R&D Systems).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad InStat program.

Results

CD28 co-stimulation negatively regulates the development of naïve CD4⁺ (CD4⁺CD62L^{high}CD44^{low}) T cells into IL-17-producing T helper cells

We here hypothesised that the CD28/B7 co-stimulatory pathway controls Th17 development. We first examined the effect of anti-CD28 mAb on Th17 differentiation and cytokine mRNA expression. CD4⁺ T cells isolated from the spleen or peripheral LNs of wild-type BALB/c mice were activated on plate-bound anti-CD3 under Th17 polarizing

conditions in the presence or absence of soluble anti-CD28 mAb. After 4-5 days of primary culture, cells were re-stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin. As depicted in Fig. 1, anti-CD28 mAb strongly inhibited IL-17 production by anti-CD3 stimulated CD4⁺ T cells as determined by intracellular cytokine staining and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fig. 1, A-B and data not shown). Accordingly, anti-CD28 mAb diminished the proportion of IL-17-producing cells by 82.8% (mean inhibition \pm 8.1%, n=14). In contrast, IFN- γ production was significantly increased as reflected by a decreased IL-17/IFN- γ ratio after CD28 engagement (Fig. 1C). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis of mRNA revealed a reduction in IL-17 and IL-22 expression (Fig. 1D). Since CD4⁺ T cells are comprised of 90% naïve (CD4⁺CD62L^{high}CD44^{low}) and 10% of memory (CD4⁺CD62L^{low}) T cells, we next compared naïve and memory T cells for their ability to differentiate into Th17 in the presence or absence of CD28 mAb. We confirmed that CD28 engagement strongly inhibited naïve T cell differentiation into Th17 (Fig. 2A) However, *ex vivo* isolated memory T cells represented a minor source of IL-17 (less than 2% IL-17⁺CD4⁺ T cells) that was not modulated by CD28 mAb. Under Th17 polarizing conditions, memory T cells produced large amounts of IFN- γ when compared to naïve T cells.

We next verified whether CD28 engagement further regulates T cells that have been differentiated into Th17 with anti-CD3 in the absence of co-stimulation. To this end, CD4⁺ T cells activated during 4-5 days with coated anti-CD3 under Th17 conditions were restimulated with anti-CD3 and IL-23, in the presence or absence of CD28 mAb. Interestingly, we found that anti-CD28 mAb marginally enhanced IL-17 production upon re-stimulation, demonstrating that CD28 co-stimulation did not inhibit fully differentiated Th17 cells (Fig. 2B). As expected, anti-CD3-activated CD4⁺ T cells were not polarized

into Th17 cells in the absence of the pro-Th17 cocktail, but instead resulted in the development of IFN- γ -producing T cells, which was further augmented by CD28 co-stimulation (Fig. 2C). We conclude that CD28 mAb inhibits naïve CD4⁺ T cells polarization into Th17.

TCR avidity and CD28 co-stimulation regulates Th17 development

We next determined the EC₅₀ of anti-CD28 mAb (effective concentration of anti-CD28 mAb resulting in a 50% inhibition of IL-17 secretion) on Th17 differentiation by supplementing CD3-stimulated T cells with increasing doses of mAb. Suppression was observed with concentrations as low as 0.06 μ g/ml, Th17 development was almost entirely abrogated at 1 μ g/ml and the EC₅₀ of CD28 mAb was 0.1 μ g/ml (Fig. 3A, left). The enhancement in IFN- γ secreting CD4⁺ T cells was inversely correlated with the frequency of IL-17-producing cells (Fig. 3A, right). To examine whether impairment of IL-17 production with anti-CD28 mAb was dependent on the TCR-signalling intensity, CD4⁺ T cells were stimulated with titrated doses of anti-CD3 and a fixed amount of anti-CD28 mAb. As shown in Fig. 3B the percentage of CD4⁺ T cells producing IL-17 was significantly augmented with high doses of immobilized anti-CD3 mAb. Moreover, the strongest CD28 inhibitory signal for Th17 differentiation was delivered to T cells stimulated with high anti-CD3 concentration. This inhibition of Th17 differentiation could not be attributed to cell death, since cell viability was not decreased in CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD28 mAb, regardless of whether these were purified from the spleen or the LNs (Fig. 3C).

CD28 co-stimulation inhibits Th17 differentiation via IFN- γ and IL-2-dependent mechanisms.

CD28 signalling is reported to enhance cytokine production that includes IL-2, IL-4 and IFN- γ secretion in activated CD4⁺ T cells [20], we found that anti-CD28 mAb increased the proportion of IL-2 producing cells (Fig 4A) as well as IFN- γ -producing cells in CD3-stimulated CD4⁺ T cells (Fig. 1 and 3). Under Th17 polarizing conditions neutralization of IL-2 or IFN- γ but not IL-4 partially overcame CD28 blockade and lead to increased IL-17 production. Nonetheless, the frequency of IL-17⁺CD4⁺ T cells remained inferior to that generated in the absence of CD28 co-stimulation. However, treatment with both anti-IL-2 and anti-IFN- γ mAbs restored IL-17 production and thus completely abrogated the effect of CD28 engagement (Fig. 4B).

Since IL-2 partly mediated the inhibitory effect of anti-CD28 mAb on Th17 development, we postulated that the suppressive function of IL-2 operates through the expansion of Foxp3⁺ T cells. We here found that the percentage of Foxp3⁺CD4⁺ T cells was decreased rather than increased after CD28 signalling (Fig. 5A). We next directly addressed the contribution of Treg to the CD28-mediated suppression of Th17 differentiation by CD25⁺CD4⁺ T cell depletion and reconstitution experimental approaches (Fig. 5B). CD3-stimulated CD4⁺CD25⁻ T cells were impaired in their ability to differentiate into IL-17-producing T cells. Co-cultures of CD4⁺CD25⁻ T cells and Treg at different CD4⁺CD25⁻/CD25⁺ T cells ratio enhanced Th17 differentiation. CD28 mAb did not increase the frequency of IL-17⁺Foxp3⁺ or IL-17⁺Foxp3⁻ cells that were almost undetectable in CD25⁺ T cell-depleted polarised cultures (Fig. 5C).

Mature DC inefficiently support Th17 differentiation

The observations that Th17 differentiation can be suppressed by high levels of co-stimulation in an APC-free system led us to examine the ability of immature versus mature dendritic cells (DC) to drive Th17 development. Unstimulated (immature) or LPS-stimulated (mature) mitomycin C-treated bone marrow-derived DC (BMDC) were cocultured with CD4⁺ T cells under Th17 differentiation conditions. As shown in Fig. 6, the maturation status of the BMDC dictated the fate of Th polarization toward Th17. When CD4⁺ T cells were differentiated in the presence of mature BMDC expressing high levels of co-stimulatory molecules, we observed a significant decrease in the percentage of Th17 cells and, as expected, an opposing effect on IFN- γ producing cells (Fig. 6, A-C). Hence, immature BMDC induced higher frequencies of IL-17⁺CD4⁺ T cells when compared to their mature counterparts (Fig. 6D). Furthermore, increased CD4⁺ T cell proliferation was observed with mature BMDC under Th17 polarizing conditions containing TGF- β , suggesting that the inhibition of IL-17 secretion was unlikely related to a reduced expansion of CD4⁺ T cells (Fig. 6A).

CTLA4-Ig enhances Th-17 differentiation

To evaluate the role of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on Th17 differentiation, we used CTLA4-Ig, which interrupts the CD28/B7 pathway. CD4⁺ T cells were cocultured with graded numbers of mature-BMDC under Th17 polarizing conditions in the presence or absence of CTLA4-Ig. We found that CTLA4-Ig significantly augmented the frequency of IL-17⁺CD4⁺ T cells (Fig. 7, A and B). The proportion of IL-17-producing cells among CD4⁺ T cells cocultured with mature BMDCs at a 1/1 CD4⁺/DC ratio in the presence of CTLA4-Ig was similar to the percentage induced with half the number of DCs

and in the absence of CTLA4-Ig. Thus, lowering the mature DC/T cell ratio or interrupting B7 costimulatory pathways favoured Th17 differentiation.

Human monocytes and conventional DCs, but not monocytes-derived DC activated by microbial stimuli, efficiently induced Th-17 priming [21]. We therefore determined whether CTLA4-Ig enhanced human Th17 differentiation in APC/T cells cocultures. To this end, adult CD45RA⁺CD4⁺ T cells were cultured with mature monocyte-derived DC in the presence or absence of CTLA4-Ig but in the absence of exogenous cytokines or anti-IFN- γ mAb. Our data indicate that CTLA4-Ig significantly increased naïve CD4⁺ T cell differentiation into IL-17 and IL-22-producing cells, thereby confirming in human *in vitro* studies our observations in murine DC/CD4⁺ co-cultures (Fig. 7C).

Discussion

In this study, we provide strong evidence for an inhibitory role of CD28 in the development of IL-17-producing T helper cells with no modulation of IL-17 expression in memory CD4⁺ T cells and established Th17 cells. We here demonstrate *in vitro* that ligation of CD28 with a monoclonal antibody results in inhibition of Th17 differentiation whereas CTLA4-Ig blockade enhances it during APC/T cell interactions. The extent of suppression of Th17 differentiation was regulated by the strength of TCR and costimulatory signals.

We explored some of the cellular mechanisms whereby CD28 engagement inhibited Th17 differentiation. Although the importance of IL-6, TGF- β , IL-21 and IL-23 in Th17 development has been clearly established, less is known about physiological antagonists of Th17 responses. Th1 and Th2 cytokines negatively regulate the

differentiation of Th17 cells. The addition of IL-12, IFN- γ or IL-4 suppresses either IL-23 or TGF- β and IL-6-induced differentiation of Th17 cells [5,22,23]. CD28 signalling enhances IFN- γ and IL-2 secretion in activated CD4⁺ T cells [20]. In agreement with these observations, we found that the enhancement in IFN- γ and IL-2-secreting CD4⁺ T cells was inversely correlated with the frequency of IL-17-producing cells. IFN- γ neutralization partially overcame CD28-mediated Th17 suppression. When combined, anti-IL-2 and anti-IFN- γ mAbs abrogated the effect of CD28 engagement. IL-2 and IL-27 inhibit Th17 differentiation [24,25]. IL-27 can suppress the development of Th17 responses at least by inducing IL-10-producing cells [26]. The percentage of IL-10-secreting cells was low and not altered by CD28 co-stimulation (data not shown). IL-2 is a well-known T cell growth factor, yet, IL-2 deficiency is associated with severe multi-organ autoimmune disease characterised by the overproduction of IL-17 [24,27]. These observations lead to the findings that IL-2 inhibits Th17 differentiation and promotes Treg differentiation [28].

In addition to the thymus-derived naturally occurring regulatory T cells (nTreg), naïve T cells can acquire Foxp3 expression and differentiate into induced Treg cells (iTreg) in peripheral tissues. TGF- β induces Foxp3 expression and iTreg cell differentiation from CD4⁺CD25⁻ T cells *in vitro* and *in vivo* [29,30,31]. Co-stimulation through CD28 impairs TGF- β mediated induction of Foxp3 expression in naïve T cells [32]. Our data indicate that CD28 co-stimulation decreased the percentage of Foxp3⁺ T cells under Th17 conditions. We further show that Th17 differentiation was enhanced in the presence of Treg. Although Th17 and Treg differentiation are controlled by reciprocal molecular pathways, naïve T cells activated with TGF- β and IL-6 can differentiate into Th17 cells in the presence of nTreg [6,8,33]. Our results are consistent with reports showing that Treg

cells facilitate the differentiation of Th17 cells in a pro-inflammatory cytokine milieu [34]. Furthermore, regulatory T cells can be reprogrammed into Th17 cells [35]. T cells producing TGF- β that promote Th17 cell differentiation are absolutely required for the induction of EAE *in vivo* [36]. Therefore, during an extracellular pathogen-driven inflammation, TGF- β (Treg) suppresses Th1 and Th2 differentiation and IL-6 impairs effector T cell responsiveness to Treg, allowing *de novo* differentiation of protective IL-17-producing T cells from naïve precursors. At the same time, CD28 co-stimulation may somehow limit Th17 differentiation to attenuate tissue damage. Nonetheless, since CD28 engagement alters the Th17/Th1 ratio toward Th1, under some circumstances it may aggravate autoimmunity [37,38]. Taken together, in a Th17-promoting milieu, CD28 co-stimulation augments IFN- γ and IL-2 production and impairs Th17 polarization.

We next found that mature DCs were less efficient than immature DC at driving Th17 polarization and that CTLA4-Ig favoured Th17 differentiation. These data strongly suggest that B7.1 and B7.2 are involved in the regulation of Th17 differentiation but do not exclude the role of additional pairs of co-stimulatory/inhibitory molecules. Hence, other costimulatory molecules may override the absence of B7 co-stimulation for T cell activation and differentiation into Th17 cells [39]. In support of our *in vitro* observations, several studies have demonstrated that interfering with B7 co-stimulatory pathways may alter the development or the course Th17/Th1-associated autoimmune diseases *in vivo* [40]. Notably, B7.1/B7.2 deletion in SJL mice increases their susceptibility to EAE in contrast with the resistance to EAE observed in B7.1/B7.2^{-/-} C57BL/6 mice [41]. Suggesting that genetic background and B7 costimulatory molecules may dictate the outcome of the Th17 responses in absence of costimulation. In that regard, our

unpublished observations indicated that CD28 mAb significantly alter anti-CD3 stimulated CD4⁺ T cell differentiation into Th17 in BALB/c but not C57BL/6 mice (data not shown). In addition, while MOG induces EAE in wild type (CD28^{+/+}) C57BL/6 mice, it induces immune-mediated meningitis (EAM) in CD28^{-/-} C57BL/6 mice, which is characterized by an infiltrate within the leptomeninges composed primarily of polymorphonuclear neutrophils [42]. T cell-derived IL-17 mediates the stimulation of neutrophil mobilization [43]. Also, B7-2- deficient NOD mice spontaneously develop autoimmune peripheral polyneuropathy [44]. Furthermore, inhibition of IL-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with *Borrelia burgdorferi*, while CD28 deficiency exacerbates joint inflammation upon *Borrelia burgdorferi* infection, resulting in the development of chronic Lyme arthritis [45,46,47]. Finally, reduced co-stimulation in either B7.1 or B7.2-deficient recipients resulted in a dramatic acceleration of colitis induction following transfer of CD4⁺CD45RB^{high} cells [48,49]. Recently, the efficacy of CTLA4-Ig has been investigated in human clinical trials to prevent transplant rejection, and in the treatment of RA and psoriasis vulgaris [50]. We here showed that CTLA4-Ig significantly increased human naïve CD4⁺ T cell differentiation into IL-17 and IL-22-producing cells, thereby confirming in human *in vitro* studies our present observations in murine DC/CD4⁺ T cell co-cultures. These findings revealed the importance of B7.1 and B7.2 as negative regulators of human Th17 development. Considering human genetic variability, different individuals may have distinct requirements for costimulatory molecules to control Th17 development and the pathogenesis of autoimmune diseases. Thus, our data invoke caution when interfering with B7 co-stimulatory pathways for therapies, a concept largely debated in the literature [51,52].

In conclusion, we identified an unexpected role for the B7/CD28 pathway in the regulation of Th17-associated inflammatory responses. These *in vitro* observations should be taken into consideration for the management of patients under B7-based immunotherapy for the treatment of autoimmune diseases and other immune-mediated disorders.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Mohamed Oukka for critical review of the manuscript and helpful comments.

Figures and Figure Legends

Figure 1. CD28 co-stimulation inhibits *in vitro* generation of IL-17 producing CD4⁺ T cells.

Purified CD4⁺ T (1 x 10⁶) cells from spleen and LNs were stimulated with plate-bound anti-CD3 with or without anti-CD28 under pro-Th17 conditions for 4-5 days and restimulated for 6 h with PMA/Ionomycin in the presence of brefeldin A. (A) CD4⁺ T cells were stained intracellularly for IL-17 and IFN- γ . Numbers represent the percentage of events in each quadrant. (B) Cumulative data of the percentage of CD4⁺ IL-17 and IFN- γ positive T cells after restimulation as assessed by intracytoplasmic staining. Data represent the mean \pm SEM of at least ten independent experiments. (C) The ratio of the percentage of IL-17⁺ to IFN γ ⁺ cells among CD4⁺ T cells. (D) qRT-PCR analysis of IL-17 and IL-22 mRNA expression in purified CD4⁺ T cells cultured as described in A. Data are expressed as mean \pm SEM of four experiments. Data represent the mean \pm SD of two to four independent experiments. P values were calculated using the two-tailed, paired Student's *t* test, *, P < 0.05; ***, P < 0.001.

Figure 1

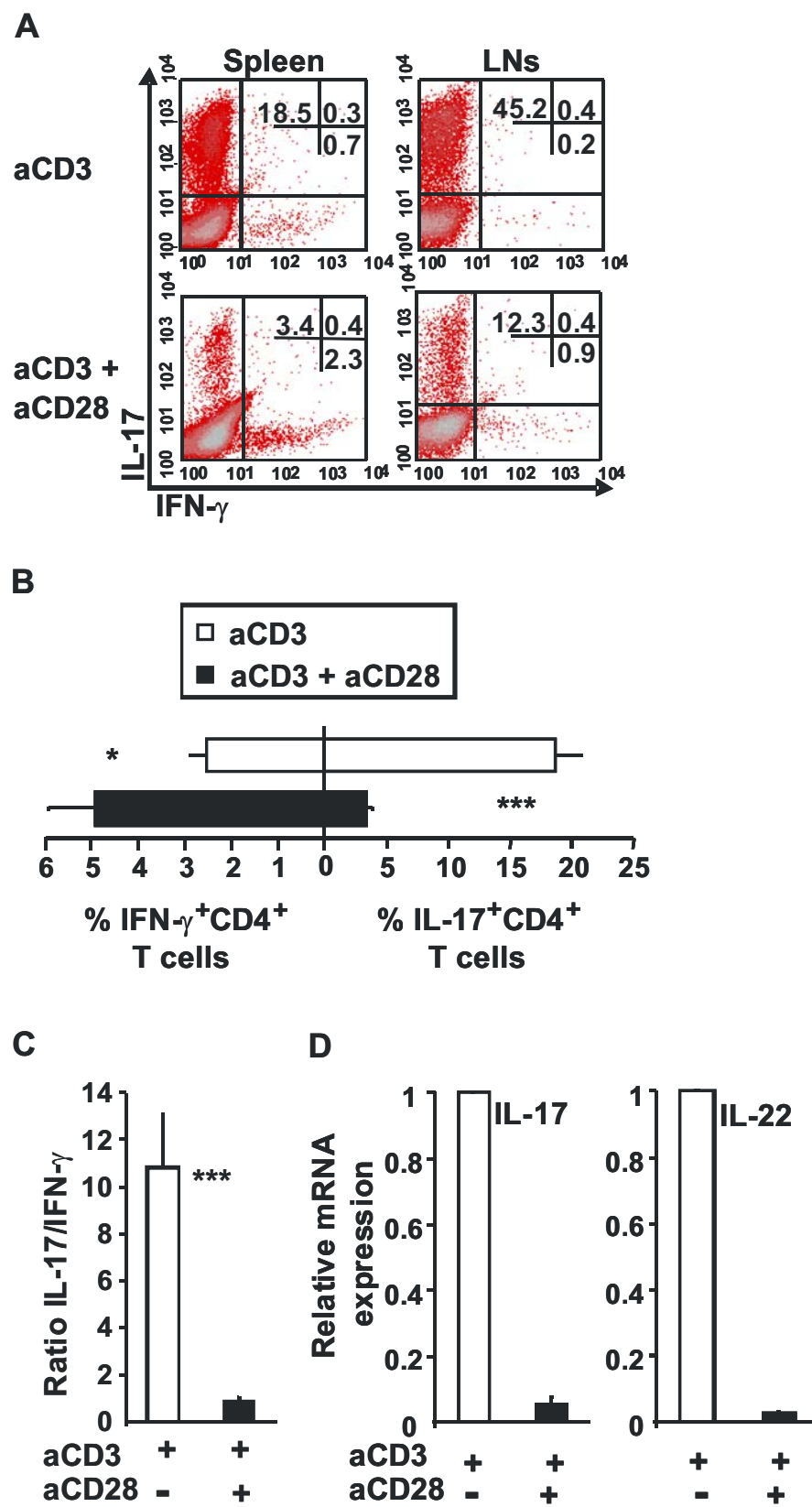


Figure 2. CD28 co-stimulation did not modulate memory Th17 cells.

(A) FACS sorted naïve CD4⁺ (CD4⁺CD62L^{high}CD44^{low}) and memory CD4⁺ (CD4⁺CD62L^{low}) T cells were cultured with anti-CD3 in the presence or absence of anti-CD28 mAb under pro-Th17 conditions for 4-5 days. (B) CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 under Th17 polarizing conditions for 4-5 days and restimulated with plate-bound anti-CD3 in the presence or absence of IL-23, and with or without anti-CD28 mAb for 2 days. (C) Purified CD4⁺ T cells were cultured with anti-CD3 in the presence or absence of anti-CD28 mAb without adding Th17 differentiation cytokines for 4-5 days.. (A-C) Cells were restimulated for 6 h with PMA/Ionomycin in the presence of brefeldin A. Naïve and memory CD4⁺ T cells were stained intracellularly for IL-17 and IFN- γ . Numbers represent the percentage of events in each quadrant. Data are the mean \pm SD of 2 independent experiments.

Figure 2

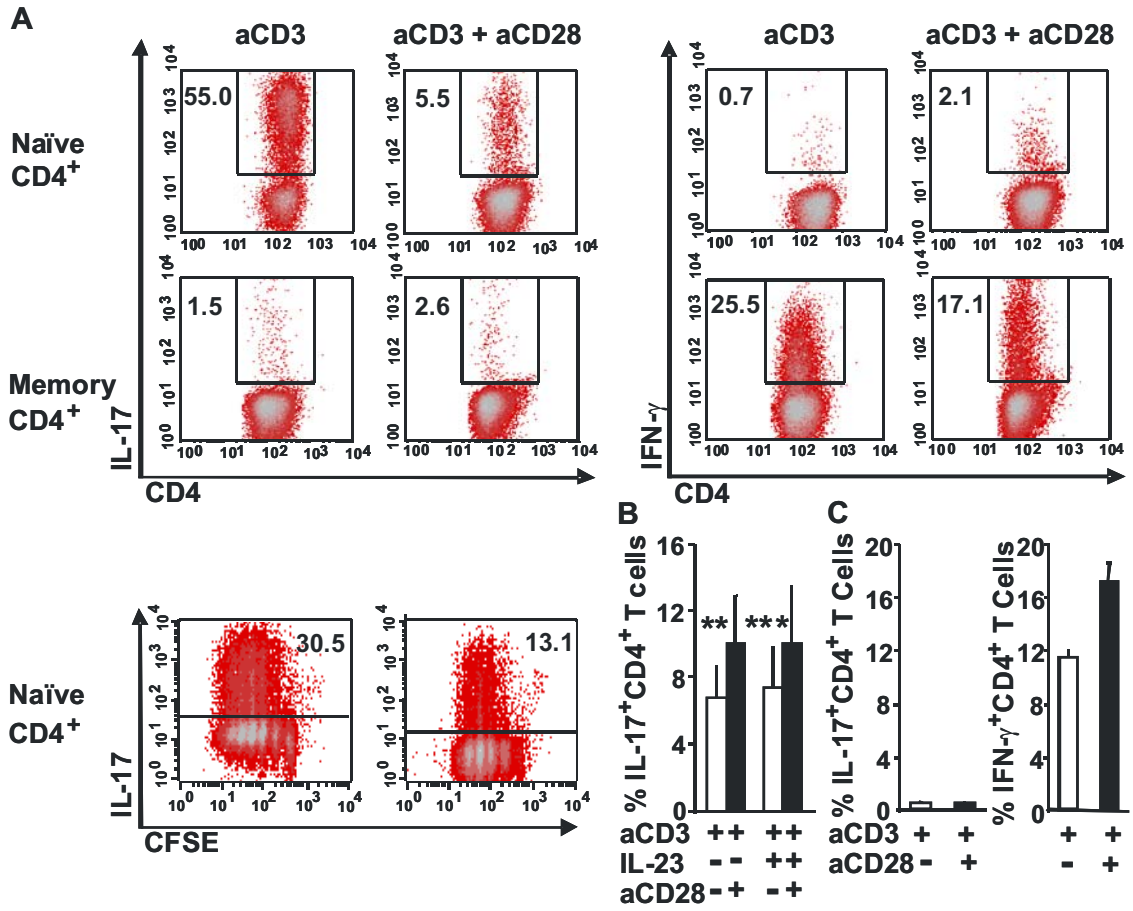


Figure 3. TCR avidity and CD28 co-stimulation signals regulate Th17 development.

(A) Purified CD4⁺ T were stimulated with plate-bound anti-CD3 (5 µg/ml) and titrated doses of soluble anti-CD28 mAb under Th17 polarizing conditions. Cells were stained intracellularly for IL-17 and IFN-γ expression. The data shown is one representative experiment out of two. (B) CD4⁺ T cells were stimulated with titrated doses of plate-bound anti-CD3 in the presence or absence of soluble anti-CD28 mAb (2 µg/ml). Data represent the mean ± SD of four independent experiments. (C) Cumulative data of viable CD4⁺ T cell recovery after stimulation with anti-CD3 (5µg/ml) +/- anti-CD28 mAb (2 µg/ml). Data are the mean ± SD of 3 (LNs) to 20 (spleen) independent experiments. P values were calculated using the two-tailed, paired Student's *t* test, *, P < 0.05; **, P < 0.01.

Figure 3

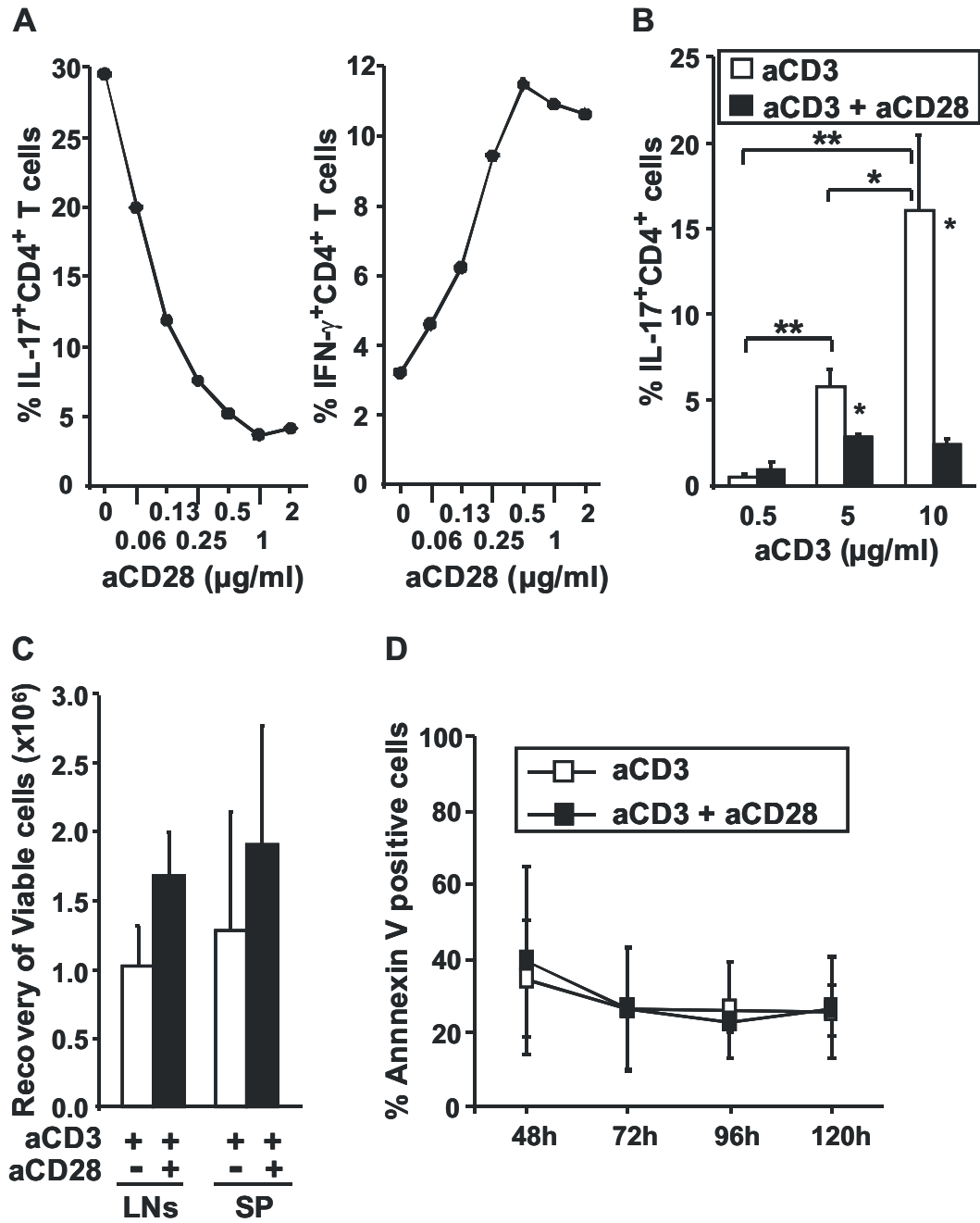


Figure 4. The CD28-driven inhibition of Th17 differentiation is mediated by IL-2 and IFN- γ production.

Purified CD4⁺ T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 in the presence or the absence of soluble anti-CD28 mAb under Th17 polarizing conditions. (A) The percentages of IL-2⁺CD4⁺ T cells from 7 independent experiments (mean \pm SEM). (B) CD4⁺ T cells were cultured in the presence or absence of anti-mouse IL-4, IFN- γ or IL-2 alone or in combination. The data shown are representative of 1 experiment out of 3 (dot plots, left panel). The cumulative data from 2-6 independent experiments are shown in the right panel. P values were calculated using the two-tailed, paired Student's *t* test, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Figure 4

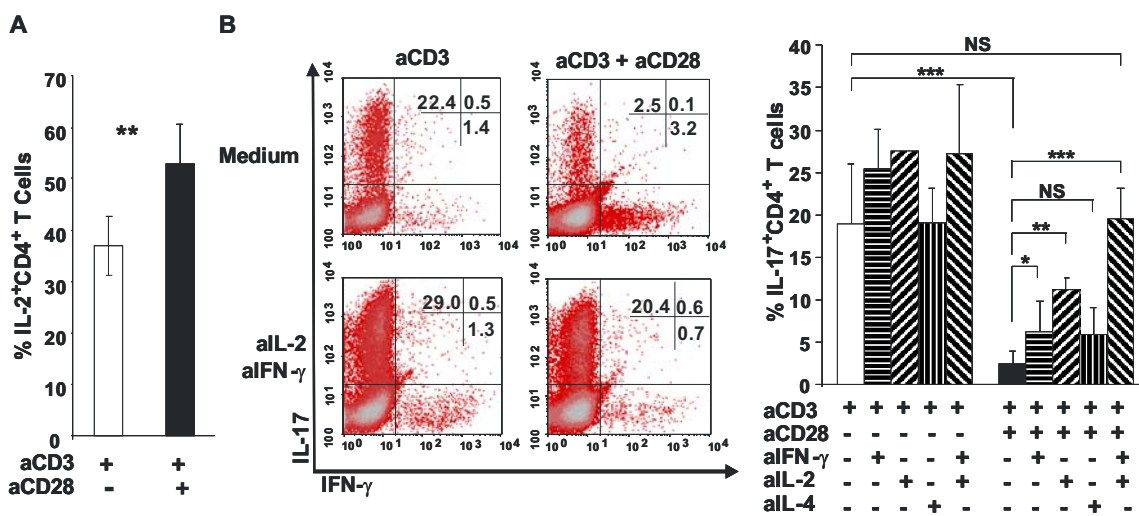
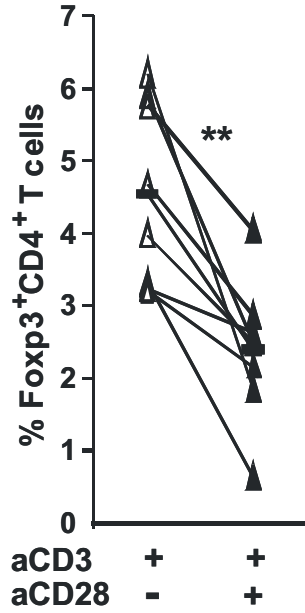


Figure 5. Inhibition of Th17 differentiation by anti-CD28 is not correlated with a expansion of Foxp3⁺ T cells.

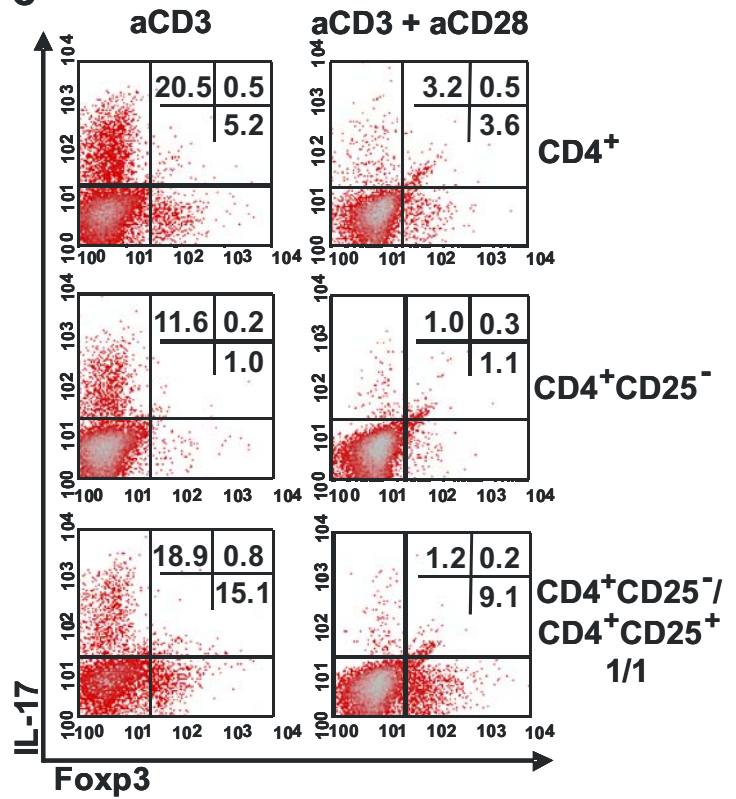
Purified CD4⁺ T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 in the presence or the absence of soluble anti-CD28 mAb under Th17 polarizing conditions. (A) The proportion of Foxp3⁺CD4⁺ T cells and IL-17⁺CD4⁺ T cells. Data from 8 independent experiments are shown. (B and C) CD4⁺, CD4⁺CD25⁻ T cells and CD4⁺CD25⁻ T plus CD4⁺CD25⁻ T cells (at 1/1, 1/0.25 CD25⁻/CD25⁺ T cell ratios) were stimulated as described. Numbers indicate the percentage of IL-17 and IFN- γ -expressing CD4⁺ T cells (B) and IL-17 and Foxp3-expressing cells (C). One of 2 representative experiments is shown. P values were calculated using the two-tailed, paired Student's *t* test, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Figure 5

A



C



B

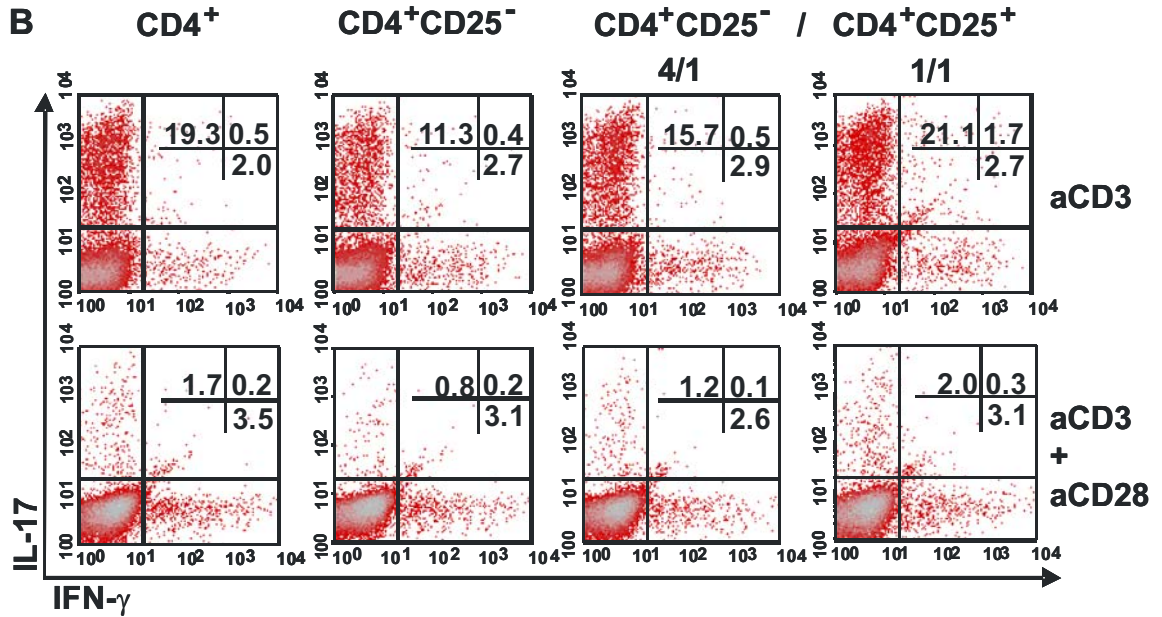


Figure 6. Mature BMDC inefficiently support Th17 differentiation.

CD4⁺ T cells were cultured with immature or mature BMDC at a 2/1 CD4⁺/BMDC ratio in the presence of anti-CD3 under Th17 conditions. (A) Cells were stained intracellularly for IL-17 and IFN- γ . Shown is one representative experiment out of 6 (B) The mean \pm SEM of 6 independent experiments. (C) The ratio of the percentage of IL-17⁺ to IFN γ ⁺ cells among CD4⁺ T cells. (D) CD4⁺ T cells (2.5×10^5 cells) were cultured with immature or mature BMDCs at three different CD4⁺/BMDC ratios (2/1; 1/1; 1/2) as described in A. Data represent the mean \pm SD of 4 independent experiments. P value were calculated using the two-tailed, paired Student's *t* test, *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

Figure 6

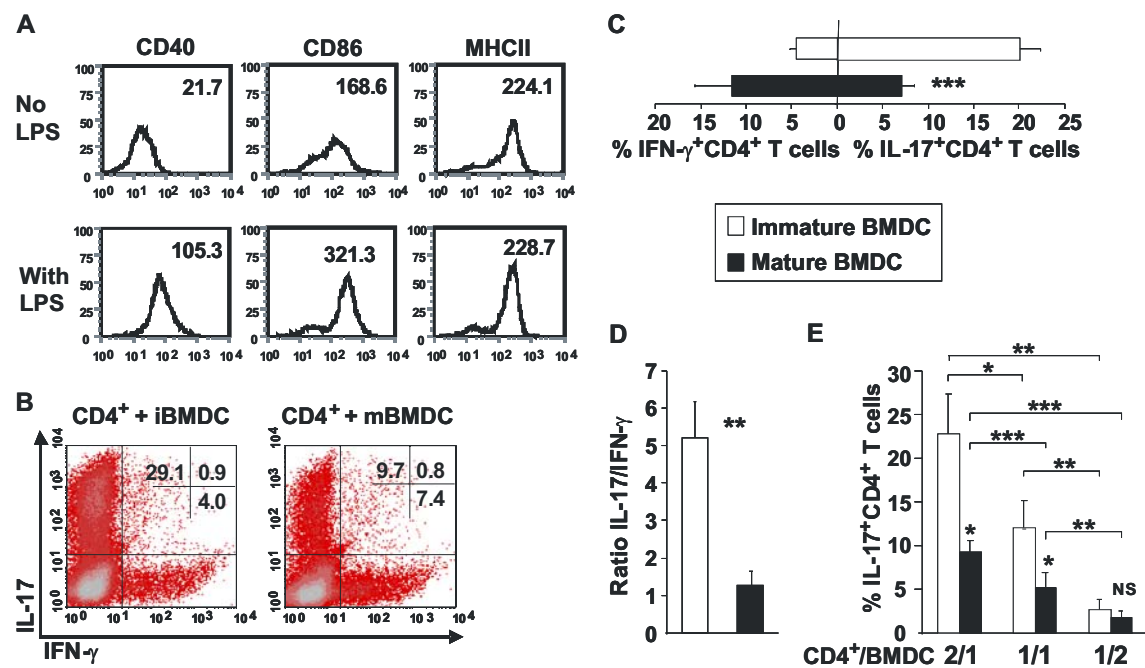
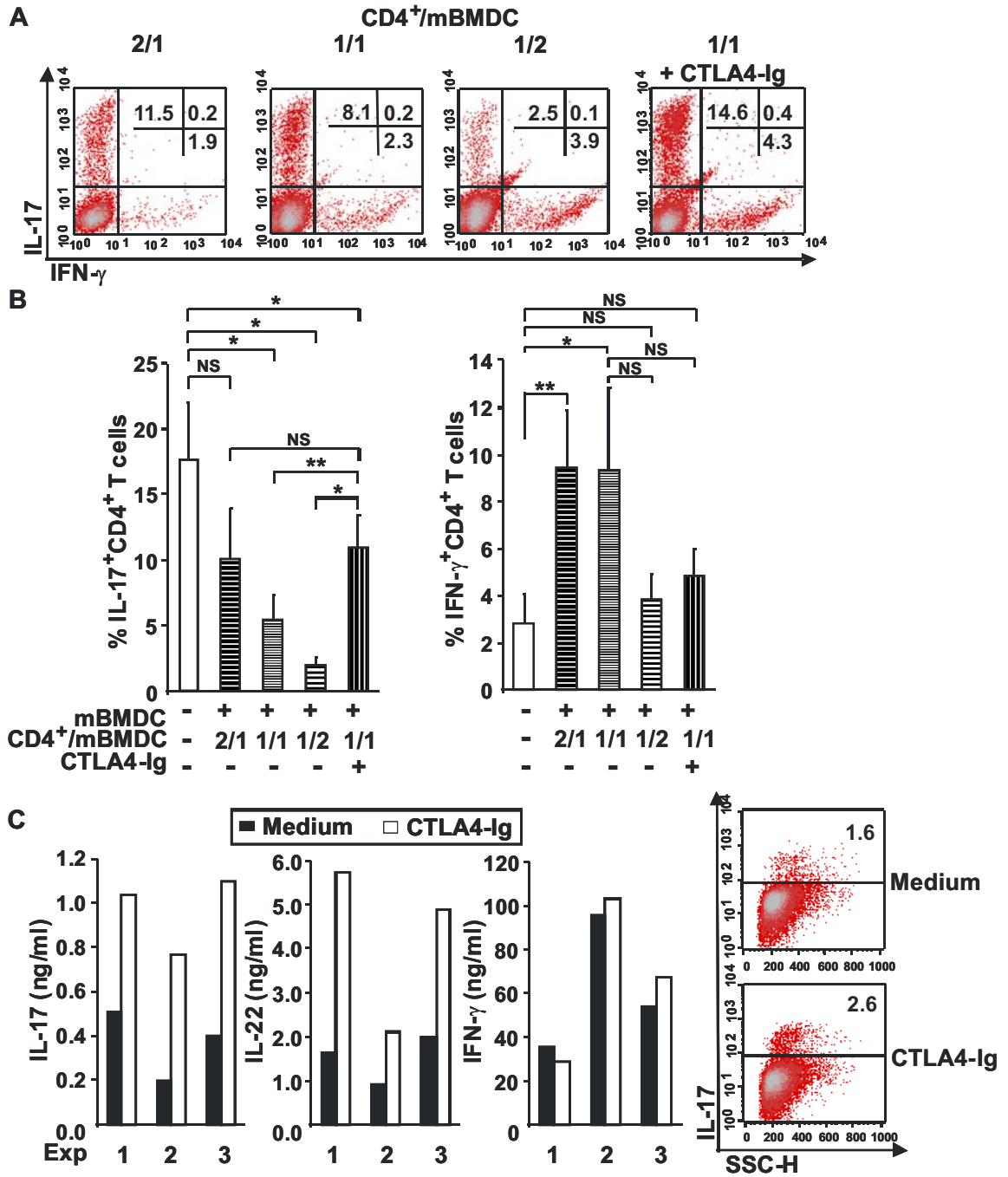


Figure 7. CTLA4-Ig favours Th17 development.

(A) CD4⁺ T cells were cultured with mature BMDCs at three different CD4⁺/mBMDCs ratios (2/1; 1/1; 1/2) in the presence of anti-CD3 under Th17 conditions. CTLA4-Ig (20 µg/ml) was added to cultures with a 1/1 CD4⁺/mBMDCs cell ratio. Cells were stained intracellularly for IL-17 and IFN-γ. Shown is one representative experiment out of 4. (B) CD4⁺ T cells were stimulated as in A. Data represent the mean ± SD of 4 experiments. (C) Human naïve CD4⁺ T cells were co-cultured with activated monocyte-derived DCs in the presence or absence of CTLA4-Ig (5 µg/ml), expanded in IL-2 and restimulated. IL-17, IL-22 and IFN-γ secretion was assessed in the culture supernatants and cells were stained for intracellular IL-17. Shown are 3 independent experiments (ELISA, Left panel) and 1 representative out of 3 experiments (intracytoplasmic staining, right panel). P values were calculated using the two-tailed, paired Student's *t* test, *, P < 0.05; **, P < 0.01.

Figure 7



References

1. Matusiewicz D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, et al. (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5: 101-104.
2. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, et al. (2000) High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 164: 2832-2838.
3. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, et al. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70.
4. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK (2008) Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453: 1051-1057.
5. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, et al. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.
6. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
7. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, et al. (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441: 231-234.
8. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-189.
9. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24: 677-688.
10. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, et al. (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448: 484-487.
11. Sharpe AH, Abbas AK (2006) T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* 355: 973-975.
12. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, et al. (2000) B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12: 431-440.
13. Egen JG, Kuhns MS, Allison JP (2002) CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 3: 611-618.
14. Racke MK, Scott DE, Quigley L, Gray GS, Abe R, et al. (1995) Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Invest* 96: 2195-2203.
15. Perrin PJ, Scott D, Davis TA, Gray GS, Doggett MJ, et al. (1996) Opposing effects of CTLA4-Ig and anti-CD80 (B7-1) plus anti-CD86 (B7-2) on experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 65: 31-39.
16. Lohr J, Knoechel B, Jiang S, Sharpe AH, Abbas AK (2003) The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol* 4: 664-669.
17. Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, Patel B, Koons A, et al. (1996) CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 5: 285-293.
18. Amezcua-Guerra LM, Hernandez-Martinez B, Pineda C, Bojalil R (2006) Ulcerative colitis during CTLA-4Ig therapy in a patient with rheumatoid arthritis. *Gut* 55: 1059-1060.
19. Van VQ, Lesage S, Bouguermouh S, Gautier P, Rubio M, et al. (2006) Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *Embo J* 25: 5560-5568.
20. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB (1991) CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147: 2461-2466.

21. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007) Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8: 942-949.
22. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, et al. (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198: 1951-1957.
23. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, et al. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
24. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, et al. (2007) Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26: 371-381.
25. Kimura A, Naka T, Kishimoto T (2007) IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12099-12104.
26. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, et al. (2006) Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7: 937-945.
27. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, et al. (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268: 1472-1476.
28. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, et al. (2006) The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 212: 60-73.
29. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, et al. (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 115: 1923-1933.
30. Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA (2007) IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178: 2018-2027.
31. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, et al. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198: 1875-1886.
32. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204: 1765-1774.
33. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W (2007) Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178: 6725-6729.
34. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, et al. (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8: 630-638.
35. Radhakrishnan S, Cabrera R, Schenk EL, Nava-Parada P, Bell MP, et al. (2008) Reprogrammed FoxP3+ T regulatory cells become IL-17+ antigen-specific autoimmune effectors in vitro and in vivo. *J Immunol* 181: 3137-3147.
36. Li MO, Wan YY, Flavell RA (2007) T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26: 579-591.
37. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM (2008) Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 14: 337-342.
38. Steinman L (2008) A rush to judgment on Th17. *J Exp Med* 205: 1517-1522.
39. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27: 111-122.

40. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, et al. (2006) Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355: 1018-1028.
41. Jabs C, Greve B, Chang TT, Sobel RA, Sharpe AH, et al. (2002) Genetic background determines the requirement for B7 costimulation in induction of autoimmunity. *Eur J Immunol* 32: 2687-2697.
42. Perrin PJ, Lavi E, Rumbley CA, Zekavat SA, Phillips SM (1999) Experimental autoimmune meningitis: a novel neurological disease in CD28-deficient mice. *Clin Immunol* 91: 41-49.
43. Kolls JK, Linden A (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467-476.
44. Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, et al. (2001) Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med* 194: 677-684.
45. Burchill MA, Nardelli DT, England DM, DeCoster DJ, Christopherson JA, et al. (2003) Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 71: 3437-3442.
46. Kotloski NJ, Nardelli DT, Peterson SH, Torrealba JR, Warner TF, et al. (2008) Interleukin-23 is required for development of arthritis in mice vaccinated and challenged with borrelia species. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1199-1207.
47. Iliopoulou BP, Alroy J, Huber BT (2007) CD28 deficiency exacerbates joint inflammation upon *Borrelia burgdorferi* infection, resulting in the development of chronic Lyme arthritis. *J Immunol* 179: 8076-8082.
48. Kim G, Levin M, Schoenberger SP, Sharpe A, Kronenberg M (2007) Paradoxical effect of reduced costimulation in T cell-mediated colitis. *J Immunol* 178: 5563-5570.
49. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, et al. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203: 2473-2483.
50. Abrams JR, Lebowitz MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Goldfarb MT, et al. (1999) CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 103: 1243-1252.
51. St Clair EW (2008) The calm after the cytokine storm: lessons from the TGN1412 trial. *J Clin Invest* 118: 1344-1347.
52. Schraven B, Kalinke U (2008) CD28 superagonists: what makes the difference in humans? *Immunity* 28: 591-595.

Discussion et Perspectives

1. Introduction

La réaction inflammatoire représente une réponse adaptative provoquée par l'infection et l'altération tissulaire. Les signaux de danger déclenchés par un pathogène ou une altération tissulaire activent les macrophages résidents, fibroblastes et mastocytes qui libèrent une variété de médiateurs proinflammatoires, ainsi que des produits de cascade de protéolyse. Ces médiateurs entraînent la constitution locale d'un exsudat inflammatoire formé de protéines plasmatiques et de leucocytes.

Alors qu'une robuste réponse Th1 et/ou Th17 est bénéfique au cours d'une infection, celle-ci doit être absolument limitée afin de prévenir une destruction inappropriée des tissus et la survenue de maladies auto-immunes (Fig. 10). Les mécanismes engagés *in vivo* pour contraindre la réponse immunitaire sont aussi variés que complexes, impliquant différentes cellules dont les cellules T régulatrices.

2. CD47 et inhibition du développement Th1

Nous avons montré que les souris BALB/c CD47-déficientes présentent un phénotype Th1 alors que les souris BALB/c sont connues pour exprimer davantage un profil de sécrétion de cytokines de type Th2 (576). Il est à souligner que ces résultats obtenus *in vivo* dans un modèle murin sont en accord avec de précédents travaux effectués *in vitro* au laboratoire avec des lymphocytes T CD4⁺ purifiés de sang de cordon ombilical, qui montraient que l'engagement de CD47 induisait une inhibition de la différenciation Th1, accompagnée d'une diminution de la synthèse de l'IL-2 et de l'expression de l'IL-12Rβ2, sans déviation de la réponse immunitaire vers le développement Th2 (564, 565).

L'absence de CD47 abaisse le seuil d'activation du TCR, en réponse à une dose d'antigène suboptimale requise pour l'activation et la prolifération des cellules T CD4⁺. En effet, après transfert adoptif des lymphocytes T CD4⁺DO11.10⁺CD47^{-/-} ou CD47^{+/+} dans une souris CD47-déficiente, les cellules CD4⁺DO11.10⁺CD47^{-/-} prolifèrent mieux que les CD47^{+/+} après immunisation à l'OVA peptide (576). Par ailleurs, il est décrit qu'une forte stimulation du TCR favorise le développement Th1 (577-580) alors qu'une plus faible activation du TCR entraîne par contre une synthèse d'IL-4 et une différenciation Th2 (581). Le mécanisme par lequel CD47 inhibe l'activation des cellules T CD4⁺ n'est pas encore bien connu. Cependant, l'inactivation de CD47 permettrait, en plus des conséquences directes (abaissement du seuil d'activation) sur la voie de la signalisation du TCR, la levée de l'inhibition exercée sur l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ décrite pour ses capacités costimulatrices (372, 582). Cette fonction rappelle le rôle de l'enzyme Mgat5 (beta1,6 N-acetylgluco-saminyl-transferase V) dont l'absence abaisse le seuil d'activation du TCR, et se traduit par une différenciation Th1 privilégiée et une augmentation de l'hypersensibilité de contact (583, 584).

Nous avons également montré que les souris BALB/c CD47^{-/-} développent une réaction d'hypersensibilité de contact (CHS) au DNFB (Dinitrofluorobenzène) plus importante que la souche de souris BALB/c sauvage, attribuée au profil de sécrétion de type Th1 des lymphocytes T CD4⁺. Nos études sont en apparence contradiction avec les résultats obtenus chez les souris C57BL/6 CD47^{-/-} où la réaction d'hypersensibilité de contact est diminuée par rapport à la souche de souris sauvage (545). Cependant, d'autres travaux utilisant l'oxazolone chez la souris C57BL/6 en accord avec nos résultats montrent une exacerbation de la CHS (585) imputée à un défaut de sensibilité des cellules T à l'apoptose. De plus, les souris C57BL/6 qui expriment une forme tronquée de SIRP- α ,

dépourvue de sa portion intracytoplasmique, ou d'autres traitées avec un mAc anti-SIRP- α , sont résistantes à l'induction de la CHS au DNFB (586, 587). Alors que l'engagement direct du SIRP- α par un mAc anti-SIRP- α ou par une protéine de fusion CD47-Fc, qui induisent la phosphorylation des tyrosines des motifs ITIM inhibent la CHS (588), le traitement avec un mAc anti-CD47 n'aurait pas d'effet (587).

La résistance au développement de la CHS est attribuée soit à un défaut de migration des cellules de Langerhans (586), ou bien à un défaut de leur maturation (défaut d'expression de CD80 et CD86) combinée à une inhibition de la synthèse de cytokines inflammatoires. Cependant, des études démontrent que la diminution de migration des cellules de Langerhans n'a pas d'effet, voire même aggrave l'hypersensibilité de contact et souligne le rôle primordial des DCs du derme (589, 590). La CHS étant une réaction de type Th1 liée à une production importante d'IFN- γ , la différence observée dans son amplitude entre les souris BALB/c CD47-déficientes et C57BL/6 CD47^{-/-} pourrait s'expliquer de la manière suivante. Essentiellement par le fait que chez les souris BALB/c-CD47 déficientes qui présentent certes une diminution de la stimulation des cellules T liée à un défaut de migration des DCs du derme vers les ganglions lymphatiques, mais compensée par un phénotype sécrétoire de type Th1 caractérisé par une synthèse d'IFN- γ importante, une survie et une activité des cellules T CD4⁺CD47^{-/-} plus grande, un nombre de cellules NK plus élevé, et un recrutement des cellules T au site inflammatoire éventuellement plus important. Ajouter à cela la diminution de la migration des cellules de Langerhans qui accentue la CHS. Les souris C57BL/6 CD47^{-/-} présentent les mêmes anomalies de migration des DCs que les souris BALB/c CD47-déficientes avec ces répercussions sur la stimulation des cellules T CD4⁺. Néanmoins, ces souris C57BL/6 CD47-déficientes dont les cellules T CD4⁺ sont moins stimulées, et qui ne présentent pas

également d'augmentation de synthèse d'IFN- γ , ni d'exacerbation du profil de sécrétion Th1 en comparaison avec la souche de souris C57BL/6 CD47^{+/+}, présentent par conséquent une inhibition de l'hypersensibilité de contact. Toutefois cette différence observée dans la réaction d'hypersensibilité de contact entre les souris C57BL/6 CD47^{-/-} et BALB/c CD47-déficientes mérite d'être clarifiée dans de futures études.

Le rôle de CD47 est à comparer à de nombreuses autres protéines membranaires qui exercent un rétrocontrôle négatif sur l'activation du lymphocyte T, favorisant ainsi la tolérance immunologique, telles que TIM-3 et certains membres de la superfamille des immunoglobulines CD160 et B7.

Ainsi, la protéine TIM-3 (T cell Ig- and mucin domain-containing molecule) est exprimée à la surface des lymphocytes Th1 et Th17 activés, et a pour ligand la protéine de la matrice extracellulaire Galectine-9 (591, 592). TIM-3 exerce un rétrocontrôle négatif sur la réponse immunologique en entraînant l'apoptose des cellules T effectrices, induisant ainsi une tolérance périphérique (592-596). Galectine-9 est également exprimée sur les Treg et inhibe via TIM-3 l'activation des lymphocytes T. Ainsi, un anticorps bloquant l'interaction TIM-3-Galectin-9 entraîne une diminution de l'activité suppressive des Treg, et une augmentation de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, et la synthèse d'IFN- γ (597).

L'expression des protéines de la superfamille des immunoglobulines CD160 et BTLA (B and T lymphocyte attenuateur; CD272) est augmentée sur les lymphocytes T humains activés. Lorsqu'ils sont engagés par HVEM (Herpesvirus entry mediator), une protéine de la famille du TNF, ils exercent un rétrocontrôle négatif sur l'activation des cellules T et la production de cytokines Th1 et Th2 (598-603).

Par ailleurs, l'activation des lymphocytes T CD4⁺ induit l'expression de CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) dont l'engagement par B7-1 (CD80) et/ou B7-2 (CD86) exprimés à la surface des APC, entraîne à son tour l'inhibition des effecteurs T CD4⁺. De même, les souris CTLA-4-déficientes présentent un défaut de tolérance périphérique (604-607).

PD-1 (Programmed death-1 receptor; CD279) qui a pour ligand PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1; B7-H1; CD274), et PD-L2 (Programmed Death-Ligand 2; B7-DC; CD273) induit la tolérance des lymphocytes T et protège les tissus d'une réaction immunitaire inappropriée en inhibant l'activation et la prolifération des cellules T, ainsi que la synthèse d'IFN- γ (608). De manière comparable, l'expression de B7.1 (CD80) induite à la suite de l'activation des cellules T CD4⁺ entraîne après sa liaison à PD-L1 l'inhibition de la prolifération et de la synthèse de cytokines (609). En effet, dans un modèle expérimental de GVHD (graft-versus-host disease), les souris irradiées qui reçoivent des cellules T allogéniques provenant de souris B7.1/B7.2-déficientes développent une réaction du greffon contre l'hôte accélérée (610). De même, l'expression de B7.1 sur les cellules T effectrices est requise pour les rendre sensibles à la suppression par les Treg dans un modèle de colite expérimental (611).

D'autres corégulateurs de la famille CD28/B7 non encore identifiés mais associés à des ligands récemment décrits exprimés sur les cellules dendritiques dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, inhibent l'activation des cellules T. La molécule de surface B7-H3 (CD276) de la famille CD28/B7, décrite chez l'homme et la souris, inhibe le développement Th1 et l'activation des lymphocytes T chez la souris (612-614). B7-H4 (B7S1; B7x; VTCN1) présente de grandes homologies avec B7-H3 et inhibe également l'activation des cellules T (615-617). B7S3 est la plus récemment décrite des molécules de

la famille CD28/B7 dont l'association à la protéine de fusion B7S3-Ig inhibe la prolifération des cellules T et la production d'IL-2 (618). La protéine de membrane VSIG4 (V-set and Ig domain-containing 4), est également un autre membre de la famille CD28/B7 qui inhibe la réponse T chez l'homme et la souris (619). De même, la molécule BTNL2 (Butyrophilin-like 2) qui se caractérise par une grande homologie avec les membres de la famille B7, inhibe également la prolifération des lymphocytes T en se liant à un récepteur induit à la suite de l'activation des cellules T (620, 621).

Comme PD-1, B7.1 et TIM-3, CD47 contribuerait à limiter l'activation des lymphocytes T et à maintenir la tolérance immunologique à long terme. Alors que des coinhibiteurs comme CTLA-4 interviendraient plutôt, au moment de l'initiation de la réponse immunitaire (622). Cela expliquerait pourquoi l'inactivation du gène CD47 potentialise la prédisposition à développer une maladie auto-immune selon le background génétique, tel qu'observé en croisant des souris CD47-déficientes avec des souris NOD, l'anémie hémolytique caractéristique des souris NOD se déclarant plus précocement (509, 623, 624). De même que l'on retrouve chez les souris âgées BALB/c CD47-déficientes des auto-anticorps (625).

L'inhibition du développement Th1 par CD47 n'est pas limitée uniquement à son action directe sur les cellules lymphocytes T CD4⁺. Ainsi, l'engagement de CD47 par la TSP-1 (soluble ou liée à la membrane de la cellule T CD4⁺) se traduit également par une inhibition de la maturation fonctionnelle des cellules dendritiques et un arrêt de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les DCs matures comme l'IL-12 (485, 564). Il n'est pas exclu que CD47 sur la cellule T effectrice puisse interagir de manière homotypique avec le CD47 exprimé sur la DC et inhiber la synthèse de cytokines pro-Th1 (560). De même, l'engagement de SIRP α exprimé par une cellule présentatrice

d'antigène induit une inhibition de la sécrétion de TNF- α (489, 626). Suggérant que, SIRP α (sur l'APC) à travers son interaction avec CD47 (sur le T) préviendrait l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, permettant ainsi l'exercice d'un rétrocontrôle négatif sur le lymphocyte T. De la même façon, la protéine TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain) à la surface des cellules T humaines en s'associant au récepteur PVR (Poliovirus receptor) sur les cellules dendritiques provoque la sécrétion d'IL-10, qui à son tour inhibe l'activation des lymphocytes T (627).

En résumé, nous proposons le modèle suivant pour expliquer le biais Th1 des souris BALB/c CD47^{-/-}. Les cellules T CD4⁺ CD47-déficientes sont fortement activées par le TCR, ce qui induit la synthèse d'IFN- γ et le début de la différenciation Th1 soutenue par une augmentation rapide de l'expression de l'IL-12R β 2 et de l'IL-2R α , associée à une synthèse accrue d'IL-2 par la cellule T et d'IL-12 par les DCs. Ces différents facteurs contribuent à un renforcement de la synthèse de T-bet et de la boucle de rétrocontrôle positive. De plus, l'expression accrue et sans doute précoce de l'IL-12R β 2 stimulerait la synthèse d'IL-10 (628-630) tel que nous l'observons avec les cellules T CD4⁺CD47^{-/-} (données non publiées).

3. CD28 et inhibition du développement Th17

L'augmentation du développement Th1 et du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs étaient en faveur d'une diminution du développement Th17 chez la BALB/c CD47-déficiente. Nous avons l'objectif d'étudier la contribution de CD47 dans le développement Th17. Au cours de la mise au point des conditions expérimentales pour la différenciation Th17, nous avons remarqué l'effet inhibiteur de l'engagement de CD28 sur le développement Th17 (631). Des études très récentes ont montré que la molécule

membranaire ICOS (Inducible costimulator), connue pour ces propriétés costimulatrices peut également inhiber le développement Th17, probablement en rapport avec une augmentation de la production d'IL-2 (632-634). En effet, des molécules solubles telles que des cytokines peuvent également prévenir la différenciation Th17 comme l'IL-2, l'IFN- γ , l'IL-27, et l'IL-4 (88, 109, 129, 635).

Nous avons montré que l'inhibition de la différenciation Th17 suite à l'engagement de CD28 était liée à la production accrue d'IL-2 et d'IFN- γ (631). Cependant, la différenciation Th17 n'était pas inhibée par l'engagement de CD28 sur des lymphocytes T CD4⁺ isolés de souris C57BL/6, à l'opposé des résultats obtenus avec les souris BALB/c (résultats non présentés). Cette différence pourrait s'expliquer par une sensibilité plus grande des souris BALB/c à la costimulation par CD28. En effet, cette souche de souris présentent une plus forte activation de Stat5 en réponse à l'IL-2 que les souris C57BL/6 (636). De plus, Stat5 a la propriété d'activer Socs3 (Suppressor of cytokine signaling 3) qui inhibe le développement Th17 en contrecarrant l'activation de Stat3 en réponse à l'IL-23 et l'IL-6 (637-640). Les souris dont les cellules hématopoïétiques sont sélectivement invalidées pour l'expression de Socs3, présentent un taux de cellules Th17 élevé et développent une arthrite expérimentale sévère en réponse à l'IL-1 (641).

Paradoxalement, nous avons également observé que l'inhibition de la différenciation Th17 en présence d'anticorps anti-CD28 n'était pas associée à une diminution de l'expression de ROR γ t (données non présentées). Toutefois, de récentes études montrent que le TGF- β induit l'expression de ROR γ t, mais réprime sa fonction, qui n'est acquise qu'en réponse à l'activation de la voie de signalisation IL-6/Stat3 (133). On peut donc émettre l'hypothèse que ROR γ t est exprimé mais non-fonctionnel en raison d'une perturbation de la voie de signalisation IL-6/Stat3 suite à l'activation de CD28.

C'est ainsi que l'augmentation de la différenciation Th17 chez la souris Est-1-KO n'est pas associée à une augmentation significative de l'expression de ROR γ t (131).

Notre étude montre également que la diminution de la différenciation Th17, n'était pas la conséquence d'un développement exagéré de Treg, attendu que l'engagement de CD28 induit le développement des lymphocytes T régulateurs (206, 207). Bien au contraire, la déplétion des Treg s'accompagnait d'une différenciation Th17 moins importante (631). Cette contribution des Treg, à la différenciation Th17, pourrait découler de la production de TGF- β (287) et/ou d'une inhibition du développement Th1 (145) ou bien encore être le résultat d'une reprogrammation des Treg en cellules Th17 (96, 287, 642, 643).

4. CD47 et induction de cellules T régulatrices

Nous avons montré *in vitro* que l'engagement de CD47 par un mAc anti-CD47, ou par le peptide dérivé de la TSP-1 (4N1K) induisait des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ à partir de lymphocytes humains T naïfs CD4⁺CD25⁻RA⁺, ou mémoires CD4⁺CD25⁻RO⁺, purifiés de sang total humain (212). D'autres études récentes corroborent également le fait d'induire des lymphocytes T régulateurs à partir de lymphocytes T CD4⁺ mémoires humains, et l'importance de cette voie dans le maintien de l'homéostasie (207, 644). En effet, l'induction des iTreg à partir de cellules T CD4⁺ mémoires serait proportionnelle au degré de stimulation antigénique et permettrait ainsi au système immunitaire d'exercer un rétrocontrôle négatif sur la réponse immunitaire adaptative (198). De plus, cela permettrait la conversion physiologique de lymphocytes T CD4⁺ mémoires auto-antigènes spécifiques en iTreg programmés pour supprimer une réaction auto-immune relative à cet antigène (645). Cette capacité de générer des iTreg à

partir de cellules T CD4⁺ mémoires pourrait également être mise à profit en thérapeutique pour induire des iTreg spécifiques de l'antigène (645).

D'autres molécules membranaires exprimées par la cellule T peuvent induire des iTreg tels que le CTLA-4 (646), l'activation du TCR avec ou sans engagement de CD28 (206, 207). Un inhibiteur de l'activation du complément, la protéine de surface CD46 induit également des iTreg produisant de l'IL-10 analogues aux Tr1 (632-634).

De nombreux travaux ont montré que le TGF- β induisait des iTreg en périphérie et la TSP-1 est connue pour être une molécule importante pour l'activation du TGF- β (343, 377). Toutefois, nous avons montré que l'induction d'iTreg était indépendante du TGF- β (212). On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle, au cours de la résolution de l'inflammation, la TSP-1, en plus d'activer le TGF- β et d'induire ainsi indirectement des iTreg, favoriserait également directement, en engageant CD47, la conversion de cellules T CD4⁺ naïves ou mémoires en iTreg. La TSP-1 peut être présente sous forme soluble dans le milieu extracellulaire ou sous forme membranaire sécrétée par la cellule dendritique ou par le lymphocyte T activé, et agir dès lors de manière paracrine (369, 572).

5. TSP-1/TGF- β : fonctions dépendantes ou indépendantes de CD47

La thrombospondine-1 est une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle majeur dans le contrôle de l'inflammation physiologique et préserve l'homéostasie du milieu intérieur (315, 319, 647-649). Elle est retrouvée en grande quantité dans de nombreuses localisations et lors de manifestations inflammatoires chez l'homme et la souris où elle contribue à la résolution de l'inflammation, que ce soit dans l'arthrite (650, 651), les myopathies inflammatoires (ou myosites) (652), l'hypersensibilité de contact

(585, 653), l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde (400, 654, 655), les lésions de la rétine (656).

La TSP-1 semble être caractérisée par une dualité fonctionnelle au cours de l'inflammation, puisqu'elle favorise au départ une inflammation "physiologique" en réponse à une lésion qui se traduit par l'agrégation des plaquettes sanguines (657) et le recrutement de monocytes et de neutrophiles à partir du sang circulant (Fig. 10) (658-660). Notamment, elle augmente l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales (544) et leur adhésion aux plaquettes sanguines, ainsi qu'aux macrophages (661, 662). La TSP-1, sécrétée par les cellules endothéliales favorise le recrutement des macrophages et la clairance des cellules en apoptose (663). Par ailleurs, la TSP-1 augmente la sécrétion par les macrophages du $\text{TNF}\alpha$ via CD36 et l'activation de la voie du $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (664). L'engagement par la TSP des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ a pour conséquence l'activation et la prolifération des lymphocytes T (372, 459, 582, 665-667). De plus, la TSP-1, en activant le $\text{TGF-}\beta$, favorise la différenciation Th17; ainsi les souris C57BL/6 $\text{TSP}^{-/-}$ développent une forme moins sévère d'EAE (668).

Dans un processus inflammatoire plus avancé, la TSP-1 aurait une grande importance dans la résolution de l'inflammation. En effet, nos travaux ont montré que l'engagement de CD47 inhibe la différenciation Th1 et favorise le développement de lymphocytes T régulateurs (212, 564, 576). De très nombreuses observations appuient le rôle anti-inflammatoire de la TSP, ainsi que son importance dans la résolution de l'inflammation, comme les exemples suivants le démontrent (585, 653). La synthèse de la TSP-1 par les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages après activation, (669) ainsi que son interaction avec CD47 et CD36 favorise la tolérance immunologique périphérique par différents mécanismes (338, 670, 671). Sur les DCs maturantes, la TSP-1

inhibe de manière autocrine la synthèse de l'IL-12 et de TNF- α , mais aussi de l'IL-10 (338). En activant le TGF- β , la TSP-1 facilite la phagocytose de corps apoptotiques, conférant ainsi aux cellules dendritiques des propriétés tolérogéniques (338, 670, 672); elle active le TGF- β sur les macrophages (671).

Les cellules endothéliales vasculaires jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'inflammation, qui se caractérise par une perméabilité vasculaire accrue, une extravasation de protéines plasmatiques ayant différentes propriétés proinflammatoires, un recrutement tissulaire de leucocytes et une néovascularisation. L'action anti-inflammatoire de la TSP-1, mais aussi de la TSP-2, se reflète dans leurs propriétés à diminuer la perméabilité vasculaire (653, 673). Par ailleurs, les TSP-1 et 2 inhibent l'adhérence des lymphocytes T aux cellules endothéliales (CE) vasculaires en bloquant l'interaction entre $\alpha 4\beta 1$ (LT) et VCAM-1 (CE) en regard du site inflammatoire. En effet la TSP-1 «piègerait» les lymphocytes T activés et entraverait leur migration transendothéliale vers le lieu de l'inflammation (373).

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$, activée par CD47, favorise l'extravasation des lymphocytes T inflammatoires en se fixant à VCAM-1 et à la TSP-1 (457, 674). Par ailleurs, le rôle de CD47 dans la migration des leucocytes et des DCs suggère que tout défaut de migration est en faveur d'une réponse immunitaire ou inflammation atténuée. (540, 546, 556, 559). L'amélioration de la survie au cours d'une infection à *Staphylocoques aureus*, la prévention de l'arthrite à *Staphylocoque aureus* et de la pneumonie à *Escherichia coli* chez la souris CD47-déficiente, milite également en faveur de l'effet protecteur du défaut de migration des neutrophiles dans la limitation de l'inflammation (675-677).

De même, l'action antiangiogénique de la TSP-1 contribue également à la résolution de l'inflammation (653). En effet, la TSP a été la première molécule décrite

dotée de propriétés antiangiogéniques *in vivo* (347), et de capacité d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales vasculaires *in vitro* (678). La régulation de la réponse à l'oxyde nitrique (NO) via son interaction avec CD47 permet également à la TSP-1 d'exercer son activité antiangiogénique (390, 679). La TSP-1 induit aussi l'apoptose des cellules endothéliales via CD36. Ces effets antiangiogéniques et anti-inflammatoires de la TSP-1 et 2 sont décrits aussi bien dans des modèles expérimentaux d'inflammation comme l'hypersensibilité de contact (653, 673), que dans des modèles chroniques tel que l'arthrite expérimentale (680, 681).

Néanmoins, certains travaux rapportent que l'engagement du CD47 exprimé sur le lymphocyte T CD4⁺ par des mAc anti-CD47 immobilisés, par la TSP ou par son peptide liant CD47 (4N1K), induisent l'activation médiée par le TCR du lymphocyte T (568, 569, 682). Ainsi, l'étude d'un clone de cellules T auto-réactifs isolés du tissu synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde suggérait que la TSP-1 activait la cellule T via le CD47 (570), alors qu'une autre étude décrit la TSP-1 soluble ou immobilisée en condition de pH physiologique comme inhibitrice de l'activation médiée par le TCR du lymphocyte T, cette inhibition requiert CD47 et un site récepteur de l'héparine (566). De manière comparable, un double effet de la TSP-1 s'exerce sur les NK. Il a été démontré que la TSP-1 inhibe indirectement (suite à l'activation du TGF- β) la prolifération précoce des cellules NK humaines de manière autocrine ou paracrine, alors qu'elle favorise l'expansion tardive des NK (683).

La TSP exercerait donc à la fois une activité costimulatrice et inhibitrice selon le contexte. La TSP-1 soluble ajoutée à une culture *in vitro* de lymphocytes T et d'APC inhibe la prolifération des T, entre autre en augmentant la production d'IL-10 par les APC (684). Au cours des maladies inflammatoires chroniques des articulations, la TSP-1 est

présente en grande quantité dans le tissu synovial, et elle est également retrouvée dans les artères atteintes d'athérosclérose. Ce qui est sans doute la traduction de sa synthèse afin d'amener l'inflammation (651, 685). En effet, l'expression de la TSP-1 dans un modèle de thérapie génique a permis la résolution de l'arthrite expérimentale au collagène chez la souris (650).

Il nous apparaît pas surprenant que les fonctions anti-inflammatoires de la TSP-1 soient partagées par d'autres molécules de la matrice extracellulaire, étant donné leur importance fondamentale dans le maintien de l'intégrité et l'homéostasie tissulaire. Ainsi, la Galectine-9 inhibe l'activation des macrophages et induit des iTreg à partir de cellules T naïfs, ainsi que l'apoptose des cellules effectrices Th1 et Th17 exprimant TIM-3 (686-688). Les souris C57BL/6J, normalement résistantes à l'induction d'arthrite expérimentale par le collagène, développent la maladie lorsqu'elles sont Galectine-9-déficientes (689). De même, la Galectine-9 a un rôle anti-inflammatoire dans un modèle d'inflammation péritonéale induite par le LPS (690). De plus, L'IFN- γ induit la synthèse de Galectine-9, qui à son tour inhibera la réponse Th1 formant une boucle de rétrocontrôle négatif (691, 692).

L'hyaluronane ou acide hyaluronique (HA; HMW-HA: High Molecular Weight Hyaluronan) est un glycosaminoglycane composant de la matrice extracellulaire aux propriétés anti-inflammatoires et dont un des ligands est la protéine membranaire CD44 (693, 694). Les souris CD44-déficientes développent une inflammation pulmonaire fatale (695). L'association de l'hyaluronane au CD44 entraîne l'apoptose des lymphocytes T (696), une augmentation de l'expression de Foxp3 par les Treg renforçant ainsi leur fonction suppressive (697, 698), et l'inhibition de la production de cytokines

proinflammatoires en réponse à l'activation des TLR sur l'APC (699). Il est intéressant de noter que la TSP-1 peut également former un complexe moléculaire anti-inflammatoire avec le TSG-6 (Tumor necrosis factor-induced protein-6, TNFIP6) et l'acide hyaluronique (700, 701). De plus, les cellules T de souris TSP-déficientes ont une moindre expression de CD44 (701). La chondromoduline-1 (ChM-1) est une protéine présente dans le cartilage qui a la propriété d'inhiber l'angiogénèse et l'activation des lymphocytes T (702).

La TSP-1 active le TGF- β , une cytokine produite par une grande variété de cellules, aux activités pléiotropiques, qui joue un rôle fondamental et non-redondant dans l'homéostasie, la tolérance au soi et la différenciation des lymphocytes T (357, 361, 703, 704). En 1986, une première publication rapportait que le TGF- β était produit par les lymphocytes T activés, et suggérait qu'il inhibait ensuite leur prolifération, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif (705). D'autres études ont confirmé cette observation, y compris avec les lymphocytes T régulateurs. L'absence de TGF- β entraîne des désordres auto-immuns chez les souris ayant réussi à survivre (706, 707). Les souris TGF- β -déficientes présentent un phénotype similaire aux souris TSP-1^{-/-}. Par la suite, le rôle essentiel des lymphocytes T dans la survenue de ces pathologies a été établi du fait de la protection conférée par la déplétion des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (708, 709).

La source du TGF- β (les cellules T CD4⁺ ou CD4⁺Foxp3⁺) requise pour l'action suppressive des cellules T régulatrices reste controversée, de même que sa présentation soluble ou liée à la membrane plasmique (710, 711). En plus du rôle direct du TGF- β dans la conversion des lymphocytes naïfs T CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ en lymphocytes T régulateurs (185, 189, 209, 712), il est également nécessaire pour le maintien de l'expression de FOXP3 par les Treg. Le TGF- β est également impliqué avec l'acide

réinoïque dans la conversion des cellules T CD4⁺ en Treg au niveau de la muqueuse intestinale (196).

Nous proposons donc le modèle suivant de modulation de l'inflammation par la TSP-1. Elle agirait initialement comme facilitateur de la réponse inflammatoire physiologique en favorisant le recrutement des monocytes et des neutrophiles, puis secondairement comme un important régulateur endogène négatif de l'inflammation en contrecarrant l'angiogénèse associé à l'inflammation, en diminuant la perméabilité vasculaire, le recrutement des lymphocytes, le développement Th1, et en activant le TGF- β au site inflammatoire (698). Elle convertirait en iTreg spécifiques de l'antigène des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ou mémoires provenant de la circulation sanguine périphérique. Ayant acquis leur propriétés suppressives ces cellules se rendent ensuite aux ganglions lymphatiques drainants où ils suppriment la réponse immunitaire (Fig. 10) (713, 714).

6. CD47 et Apoptose

Le système immunitaire requiert une fine régulation de l'apoptose afin d'assurer l'homéostasie lymphocytaire et de contrôler la sélection et la fonction des lymphocytes T. Les conditions caractérisées par un défaut d'activation de la voie FAS ou d'expression du FASL se traduisent par une augmentation du nombre de lymphocytes T matures et de manifestations auto-immunitaires (715). C'est pourquoi l'apoptose des lymphocytes T CD47-dépendante représenterait un moyen additionnel, non redondant et affranchi de la susceptibilité au TNF et au FASL pour assurer l'homéostasie des lymphocytes T lors d'une réponse antigénique (304, 467, 469, 471).

La TSP-1 a également la propriété d'induire une immunosuppression non seulement en facilitant l'apoptose à travers l'engagement de CD47, mais aussi en favorisant la phagocytose des corps apoptotiques, alors que SIRP- α et SIRP- γ n'induisent pas d'apoptose en se liant au CD47 (476). La TSP-1, peut former un pont moléculaire entre ces récepteurs CD36 et $\alpha v \beta 3$ à la surface des macrophages d'une part et les cellules épithéliales, fibroblastes, neutrophiles, éosinophiles et lymphocytaires sénescents d'autre part, facilitant ainsi leur phagocytose et permettant la résolution de l'inflammation (527-529, 716). Les différents mécanismes immunosuppresseurs associés à la phagocytose des cellules apoptotiques ont déjà fait l'objet de nombreuses études (717-720).

A l'instar de CD47, d'autres protéines membranaires telles que les molécules CD2, CD99, du CMH de classe I et II, PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1; CD162), CD44 et CD45, sont aussi impliquées dans l'apoptose caspase-indépendante des cellules T (696, 721-727).

On peut envisager l'apoptose médiée par CD47 comme un moyen pour les lymphocytes cytotoxiques d'éliminer les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires ou les cellules cancéreuses sans faire intervenir la voie des caspases. En effet, de nombreux virus ont la capacité d'interférer dans le recrutement normal des caspases (728-730). De plus, CD47 facilite la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages (522, 731).

7. Pourquoi les souris BALB/c déficientes pour CD47 ne développent-elles pas de maladies auto-immunes ou inflammatoires spontanément ?

7.1. Rôle de l'IFN- γ

Comme nous l'avons démontré, les souris BALB/c CD47^{-/-} présentent un phénotype Th1 caractérisé par une production importante d'IFN- γ (576). Nous pensons que cet excès d'IFN- γ exerce également un rétrocontrôle négatif qui contribuerait substantiellement à l'absence de manifestation auto-immune chez la souris BALB/c CD47^{-/-}, en accord avec le nouveau concept d'une dualité fonctionnelle de l'IFN- γ associée à des propriétés anti-inflammatoires (732, 733). En effet, l'inactivation du gène de l'IFN- γ ou la neutralisation de l'IFN- γ par des anticorps dans un modèle murin d'arthrite expérimentale se traduit par une aggravation de l'arthrite (734, 735). De même que les souris déficientes pour le récepteur de l'IFN- γ présentent une arthrite expérimentale avec un profil de cytokines Th1 plus prononcé que les souris contrôles (736, 737). Un effet protecteur de l'IFN- γ endogène est également documenté dans de nombreux modèles expérimentaux auto-immuns murins d'encéphalite (69-72, 75, 738), d'uvéite (739, 740), de néphrite (741) et de myocardite (742).

De nombreuses études ont montré que l'IFN- γ produit par les cellules Th1 limitait selon différents mécanismes la réponse Th1. Soit en augmentant l'expression d'iNOS qui à son tour stimule la production de NO par les macrophages qui enfin, entraînent l'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ (743-745). Soit en inhibant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ activés en agissant sur le cycle cellulaire (738, 746, 747) et/ou en favorisant l'apoptose des CD4⁺ activés (744, 748-751). L'IFN- γ inhibe également la

migration des DCs entraînant un défaut de stimulation antigène spécifique des lymphocytes T (752).

Précédemment nous avons vu également que l'IFN- γ inhibait la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes Th17 (87, 88). Par ailleurs, l'IFN- γ peut également convertir *in vitro* des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ en iTreg CD4⁺CD25⁺ qui suppriment l'induction d'une encéphalite expérimentale après transfert adoptif des cellules (200). De plus, des souris déficientes pour l'IFN- γ ou son récepteur étaient plus susceptibles à l'induction d'une arthrite expérimentale en raison d'une fonction régulatrice altérée des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ après immunisation (753). Récemment, il a été montré que le facteur de transcription T-bet est également important pour le contrôle et la régulation de la réponse Th1 (754), et il se fait que nous retrouvons également une augmentation de l'expression de T-bet par les cellules T CD4⁺CD47^{-/-} (576). Ainsi, en réponse à l'IFN- γ les cellules Treg augmentent l'expression de T-bet qui à son tour induit l'expression de CXCR3 et ces cellules Treg T-bet⁺ s'accumulent aux sites inflammatoires. L'expression de T-bet est essentielle à l'homéostasie et la fonction des cellules T régulatrices (754). Enfin, il est intéressant de noter que l'IFN- γ inhibe la production de TSP-1 par les kératinocytes (755).

7.2. Rôle de l'IL-10

L'IL-10 est une cytokine homodimérique de 35 kDa synthétisée par les cellules Th2 et par de nombreuses autres cellules comprenant les lymphocytes B, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et les éosinophiles (756). C'est une cytokine immunosuppressive qui inactive les macrophages et les cellules dendritiques et qui a pour conséquence l'inhibition de la synthèse de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-1 α et

β , IL-6, IL-18 et IL-12), de chimiokines (MCP1, MCP5, RANTES, IL-8, IP-10, et MIP-2) ainsi que la diminution de l'expression des antigènes de classe II du CMH et des molécules ICAM-1, B7-1 et B7-2 (756, 757).

Nous avons observé que le phénotype Th1 des lymphocytes T $CD4^+CD47^{-/}$ s'accompagnait paradoxalement d'une expression accrue d'IL-10, ce qui aurait pour avantage de tempérer une réponse Th1 démesurée (résultats non publiés). En effet, on décrit la synthèse d'IL-10 par des cellules T différenciées en Th1 ou Th17; l'IL-10 serait impliquée dans le rétrocontrôle négatif de leur activation, afin de se prémunir des conséquences d'une activation excessive et délétère du système immunitaire (103, 758-764). Par ailleurs, dans de nombreux modèles expérimentaux d'infections, l'IL-10 produite par les nTreg, les iTreg ou les Tr1, confère une protection contre la survenue d'une inflammation pathologique (628, 765-767).

L'expression de l'IL-10 par les cellules T $CD4^+$ Th1 est également favorisée par l'IL-12 (628, 629, 768). La synthèse d'IL-12 est ensuite inhibée par l'IL-10 qui exerce ainsi un rétrocontrôle négatif (628). Étant donné que les DCs isolées de souris BALB/c $CD47^{-/}$ produisent plus d'IL-12p70 que les souris BALB/c $CD47^{+/+}$ (485), nous suggérons que ce mécanisme favorise la production d'IL-10 par les cellules Th1 $CD4^+CD47^{-/}$ sans inhiber celle d'IFN- γ . En effet, durant l'interaction APC-cellule T, la stimulation de Notch par son ligand exprimé par l'APC, en présence d'IL-12 ou d'IL-27, induit les cellules Th1 à produire de grandes quantités d'IL-10 sans diminuer la sécrétion d'IFN- γ (769).

7.3. Rôle de l'oxyde nitrique (NO)

Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué, l'axe TSP-1/CD47 interfère avec la réponse au NO cGMP-dépendante (308, 390-396). On peut postuler que la TSP-1

exercerait la même fonction suppressive de la réponse au NO sur les cellules du système immunitaire. *A contrario*, l'invalidation du gène de CD47 devrait dès lors se traduire par une plus grande sensibilité au NO suite à l'interruption de l'axe de signalisation TSP/CD47. Ainsi, en présence de très faible taux de NO, décrit comme favorisant le développement Th1, l'absence de CD47, en abaissant le seuil de sensibilité au NO soutiendrait davantage la différenciation Th1, alors que la présence d'un niveau très élevé de nitrite exogène, tel qu'observé au cours de l'inflammation, conjuguée à l'effet additif d'une hypersensibilité au NO, mimerait les conséquences d'une exposition à une très forte concentration en NO (396).

En condition inflammatoire, le niveau de NO est élevé, et conjugué à l'absence de CD47 l'effet du NO sur la cellule serait décuplé. Or, de nombreuses publications rapportent le rétrocontrôle négatif exercé par des taux élevés de NO sur la réponse Th1 et l'inflammation. Les souris iNOS-déficientes développent une réponse Th1 exagérée (770-772). Le NO régule aussi le développement Th1 en inhibant la synthèse de l'IL-12p40 par les macrophages (773) et la prolifération des cellules Th1 en supprimant leur production d'IL-2 (774). De même, les DCs exposées à des cellules en apoptose acquièrent la propriété de produire du NO en plus grande quantité en réponse à l'IFN- γ et inhibent ainsi l'activation des lymphocytes T de manière NO dépendant (775). L'oxyde nitrique induit également la conversion périphérique des cellules T CD4⁺ naïves en lymphocytes T régulateurs via p53, l'IL-2 et OX40 (201), mais probablement aussi via l'augmentation de l'expression de l'IL-12R β 2 (776, 777).

7.4. Rôle des cellules Th1 et Th17 dans l'auto-immunité spécifique d'organe

Ceci permettrait d'expliquer pourquoi la souris BALB/c CD47^{-/-} en développant une réponse Th1 immédiatement après stimulation antigénique, supprimerait d'avance tout développement de cellules Th17 dans un milieu riche en cytokines IFN- γ et IL-2, et préviendrait ainsi l'émergence de maladies auto-immunes spécifiques d'organes.

Au cours de ces quatre dernières années, il a été démontré dans différents modèles expérimentaux animaux l'importance des cellules Th17 dans la pathogénèse des maladies auto-immunes spécifiques d'organes (86). Même si le rôle respectif des cellules Th1 et Th17 au cours de ces maladies inflammatoires est toujours sujet à débat, le scénario le plus probable impliquerait les deux types de cellules (778, 779). Ainsi, le ratio Th17/Th1 déterminerait la localisation des lésions rencontrées par exemple dans le modèle d'EAE (780-782).

L'étude de l'histoire naturelle de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) nous enseigne que les lymphocytes Th17 effecteurs précèdent les cellules Th1 au site inflammatoire, alors que ces derniers prédominent avant la période de résolution de l'inflammation (783). De même, le fait que les Treg isolés du SNC de ces souris au cours de la période de résolution de l'inflammation, suppriment les cellules effectrices isolées du site inflammatoire, alors qu'ils n'ont aucune action sur les cellules obtenues au cours de la phase effectrice de l'inflammation, suggère que les cellules Th1 sont plus susceptibles à l'action des Treg que les Th17 (86). De plus, une population considérable de CD4⁺ secrète en même temps de l'IFN- γ et de l'IL-17. Par la suite, il semble que ces cellules transitoires ne produiront plus que de l'IFN- γ . En résumé, le rôle des cellules Th1 et Th17 dans la genèse des maladies auto-immunes spécifiques d'organe peut être illustré par le modèle

suivant dans l'exemple de l'EAE. Les cellules Th17 constituent la première vague de cellules effectrices à se rendre dans le SNC et orchestrent le recrutement de nouvelles cellules effectrices, particulièrement les Th1 et les cellules mononuclées. C'est grâce entre autre à l'induction par l'IL-17, des chimiokines MCP-1 (Macrophage-Inflammatory Protein-1) (87) et IP-10, que les Th17 recruteraient les cellules mononuclées (784) et les Th1 qui expriment CXCR3 (785) respectivement. Ce modèle est soutenu par le fait qu'au cours d'études de vaccination anti-*Mycobacterium tuberculosis*, un développement Th17 précoce est essentiel pour promouvoir ultérieurement une réponse Th1 efficace qui contrôle ensuite l'infection (786). Par ailleurs, l'inhibition de la différenciation Th17 par l'IFN- γ s'accompagne d'une inhibition de l'attraction des neutrophiles au site inflammatoire (787).

Un modèle d'auto-immunité systémique a été développé par Abul Abbas à partir de souris BALB/c transgéniques qui expriment de manière ubiquitaire de l'ovalbumine soluble (sOVA Tg) (788). Ces souris croisées avec des souris RAG^{-/-} déficientes en lymphocytes développent des manifestations d'auto-immunité lorsque l'on y transfère des lymphocytes T naïfs CD4⁺ OVA-spécifiques purifiés de souris DO11.10 qui expriment un TCR transgénique pour l'ovalbumine. Ces souris perdent du poids et présentent une inflammation de la peau similaire à celle observée dans la réaction du greffon contre l'hôte. La réponse immunitaire Th17 est la première à survenir suivie de nombreuses cellules produisant de l'IFN- γ , que ce soit au niveau des organes lymphoïdes ou de la peau (130). La neutralisation de l'IL-17 ou le transfert de cellules CD4⁺DO11.10⁺IL-17^{-/-} se traduit par des atteintes cutanées moindres, mais sans incidence sur la perte de poids, suggérant que l'IL-17 contrôle l'inflammation au niveau des tissus périphériques, mais pas au niveau systémique. Même en obtenant dans ce modèle expérimental une très forte

réponse Th1, celle-ci ne se traduit par aucun des aspects pathologiques décrit précédemment, que ce soit l'inflammation cutanée ou la perte de poids. *A contrario*, l'absence d'IFN- γ ou de T-bet exacerbe les manifestations cutanées en augmentant l'IL-17.

7.5. Rôle des cellules Th1 et Th17 dans l'auto-immunité systémique

À la lumière de ces différents modèles expérimentaux, nous suggérons que la prééminence d'une réponse Th1 chez la souris CD47-déficiente prévient l'apparition de manifestations auto-immunes en inhibant l'émergence de cellules productrices d'IL-17 notamment par l'action de l'IFN- γ et de l'IL-2. Toutefois, une anémie hémolytique auto-immune (AHAI) létale peut se développer chez des souris CD47-déficientes croisées avec des souris NOD, et cela de façon plus précoce que chez ces dernières, connues pour produire spontanément des anticorps anti-GR (623, 624). Différentes raisons sont invoquées dans la littérature pour expliquer ce phénomène. L'absence de la protéine CD47 sur les hématies ne permettrait plus de contrecarrer la phagocytose des GR opsonisés par les auto-anticorps via le FC- γ récepteur; l'excès de phagocytose entraînerait une plus grande quantité d'antigènes d'hématies présentés et auto-amplifierait ainsi la destruction des GR, et enfin l'absence de CD47 dévoilerait de nouveaux antigènes à la surface des GR susceptibles de fixer d'autres auto-anticorps (509). Par ailleurs, les modèles expérimentaux de souris développant des AHAI ont un phénotype Th1 et produisent des immunoglobulines anti-GR de sous-type IgG2a (789), et c'est précisément ce que nous observons avec les souris BALB/c CD47^{-/-} qui présentent un biais Th1 et produisent plus d'IgG2a. En effet, L'IFN- γ favorise la commutation en faveur des IgG2a (790) (correspondant aux IgG chez l'homme), et ces anticorps sont très efficaces dans la réponse

antivirale (791). Ils ont la capacité d'activer le complément (792), de se fixer aux récepteurs Fc exprimés sur les macrophages (793) et d'induire une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (794) chez la souris. Enfin, les souris BALB/c déficientes pour l'IL-2 développent spontanément des AHAI en rapport avec un phénotype Th1 exacerbé dans un contexte d'absence de cellules T régulatrices (795), alors que si ces souris sont doublement déficientes pour l'IL-2 et l'IFN- γ , elles développent une colite inflammatoire médiée par l'IL-17 et une AHAI plus tardivement (795).

8. Perspectives

A. Étudier le rôle de CD47 sur le lymphocyte T CD4⁺ dans un modèle infectieux

Les souris C57BL/6 sont résistantes à l'infection par le protozoaire *Leshmania major* ou par le virus *Ectromelia virus* (796) du fait du développement d'une réponse Th1 spécifique. À l'opposé, les souris BALB/c sont inaptes à contrôler l'infection en raison du développement d'une réponse immunitaire Th2 aberrante (797, 798). C'est pourquoi il serait intéressant de montrer chez la souris BALB/c CD47-déficiente que la conversion de leur phénotype spontanément biaisé vers Th1 leur confère une résistance à l'infection par *Leshmania major* (799, 800) ou *Ectromelia virus* (801, 802).

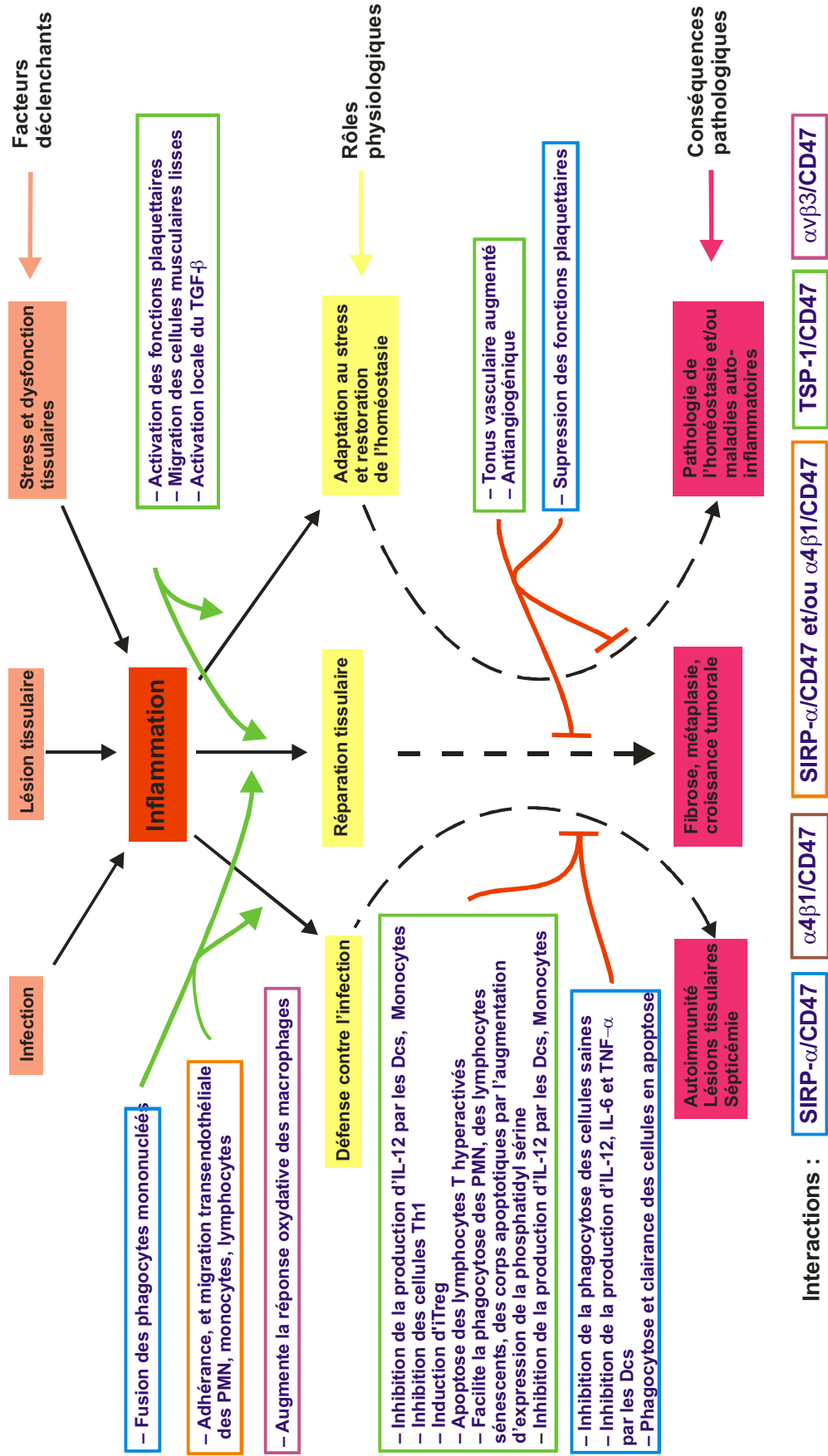


Figure 10. Rôle de CD47 et de ces ligands dans le maintien de l'homéostasie. CD47 facilite la défense contre l'infection, la réparation tissulaire et l'adaptation au stress (flèches vertes), mais prévient l'auto-immunité, la fibrose et les maladies auto-inflammatoires (flèches rouges). Adapté de Medzhitov R. in NATURE, vol 454, 24 July 2008, 428-435

B. Étudier dans un modèle expérimentale de myocardite auto-immune le rôle de CD47 et CD28 dans la dynamique Th1/Th17

L'utilisation du modèle d'induction de Myocardite expérimentale auto-immune (EAM), le modèle animal de la cardiomyopathie humaine dilatée, développé chez la souris BALB/c, nous permettrait d'étudier le rôle *in vivo* de CD47 sur les lymphocytes T CD4⁺ dans cet exemple de maladie inflammatoire médiée par les cellules Th17 (803). Il a en effet été démontré que les cytokines IL-6, IL-1, IL-23 et IL-17 (804-806) sont déterminantes pour le développement de l'EAM, alors que l'IFN- γ et l'expression de T-bet sont suppresseurs de l'inflammation cardiaque (742, 807, 808). Il serait donc intéressant de voir si la souche de souris BALB/c CD47^{-/-} de par son biais Th1 est protégée de l'inflammation cardiaque par rapport à la souris BALB/c CD47^{+/+}. De plus, l'expression de l'IL-12R β 2 par les cellules T CD4⁺CD47^{-/-} est augmentée, ce qui est en faveur d'une expression du récepteur de l'IL-12 au détriment du récepteur de l'IL-23, ce qui devrait favoriser également une résistance au développement de l'EAM (804).

Nous pourrions également utiliser ce modèle pour étudier le rôle de CD28 dans le développement Th17 *in vivo*. On comparera dans un premier temps l'évolution de la myocardite chez les souris BALB/c par rapport aux souris BALB/c CD28-déficientes. On traitera également les souris BALB/c au CTLA4-Ig, et on examinera si les souris traitées au CTLA4-Ig développent une myocardite plus sévère.

Le développement Th17 *in vitro* peut être induit en stimulant le TCR en présence de TGF- β , d'IL-6 et d'IL-23. Par ailleurs, les DCs en présence de produits microbiens tels que l'agoniste du TLR9 le CpG (Cytosine phosphate guanine) et le Curdlan (β -1,3-glucane; polysaccharide formé de D-glucose), ligands de la dectin-1, induisent une différenciation Th17 (809).

C. Rôle de CD47 et de CD28 sur les cellules T CD8⁺

Il est établi qu'à l'instar des lymphocytes T CD4⁺ on peut également subdiviser les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques suivant leur profil de sécrétion de cytokines en cellules T CD8⁺ Tc1 (IFN- γ et IL-2), CD8⁺ Tc2 (IL-4 et IL-15) et CD8⁺ Tc17 (IL-17 et IL-21) (810-813). Il serait intéressant d'étudier les conséquences de l'inactivation de CD47 sur les cellules T CD8⁺ naïves, et de voir si cela s'accompagne d'une augmentation de production d'IFN- γ et d'un phénotype Tc1 après stimulation avec des anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD28 *in vitro*. On évaluera également l'activité cytotoxique de ces cellules dans un modèle de réaction lymphocytaire mixte *in vitro* (MLR).

L'implication des lymphocytes T CD8⁺ producteur d'IL-17 (Tc17) dans les processus infectieux, cancéreux et inflammatoires aussi bien chez l'homme que chez la souris est bien documentée. Les mêmes conditions qui concourent à la différenciation des Th17 s'appliquent aux Tc17. L'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïves en présence de TGF- β et d'IL-6 augmente leur expression de ROR γ t et leur sécrétion d'IL-17 et d'IL-21 (107, 635, 814, 815). De même, les cytokines qui inhibent les Th17 suppriment également les Tc17 (107). De plus, certaines études montrent également que ces cellules perdent leurs propriétés cytotoxiques (815).

Parallèlement à cela, il serait judicieux d'évaluer le rôle intrinsèque de CD47 sur le lymphocyte T CD8⁺ dans la différenciation Tc17 en prenant en compte les études qui montrent que l'IFN- γ inhibe les Tc17 (814), que l'inactivation simultanée de T-bet et de l'Eomesodermin favorise le développement Tc17 (816), et que l'IL-23 est essentiel pour l'activité pathogénique des Tc17 (817). Ainsi, les lymphocytes T CD8⁺CD47^{-/-} et CD47^{+/+}

naïfs seront stimulés par l'anticorps anti-CD3, en conditions IL-17 polarisantes (TGF- β et IL-6) et la production des cytokines IFN- γ , IL-17, IL-10 sera déterminée.

D. D'autres études peuvent également être entreprises

Étudier le rôle de CD47 dans le développement et la fonction des cellules NKT.

Évaluer dans quelle mesure la production d'IL-10 par les cellules T CD4⁺ CD47^{-/-} IFN- γ ⁺IL-10⁺ permet à la souris d'exercer un rétrocontrôle négatif après induction d'une inflammation.

9. Conclusions générales

Notre étude a mis en évidence le rôle de la protéine transmembranaire CD47 exprimée sur le lymphocyte T dans le rétrocontrôle négatif de la réponse inflammatoire. En effet, l'engagement de CD47 induit des lymphocytes T régulateurs à partir de cellules T CD4⁺ naïves, mais également mémoires et inhibe le développement d'une réponse immunitaire Th1. La mise en évidence de ces fonctions qui assurent un état de tolérance immunitaire est très importante pour notre compréhension des mécanismes qui président à l'homéostasie du système immunitaire et dont le dérèglement conduit à des maladies inflammatoires et auto-immunes délétères. Ces propriétés anti-inflammatoires de CD47 peuvent être mises à profit pour développer de nouveaux moyens thérapeutiques nous permettant de moduler la réponse immunitaire.

Nous avons également mis en évidence le rôle de la molécule CD28 dans l'inhibition du développement Th17. Notre contribution est en accord avec la conception récente d'une plus grande plasticité dans la différenciation des cellules T CD4⁺. Cette nouvelle fonction décrite de CD28 nous recommande la prudence dans l'élaboration de nouvelles molécules thérapeutiques, particulièrement celles visant à bloquer des voies de signalisation préalablement définies comme costimulatrices.

Bibliographie

1. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 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.
2. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21:713-758.
3. Ansel, K. M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 24:607-656.
4. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.
5. Zhu, J., and W. E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557-1569.
6. Kopf, M., G. Le Gros, M. Bachmann, M. C. Lamers, H. Bluethmann, and G. Kohler. 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245-248.
7. Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984-993.
8. Trinchieri, G., and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
9. Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, and J. J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15137-15142.
10. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.
11. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, C. Stemmann, A. R. Satoskar, B. P. Sleckman, and L. H. Glimcher. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295:338-342.
12. Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, J. M. Drazen, G. T. De Sanctis, and L. H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
13. Djuretic, I. M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao, and K. M. Ansel. 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature immunology* 8:145-153.
14. Hwang, E. S., S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg, and L. H. Glimcher. 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307:430-433.
15. Naoe, Y., R. Setoguchi, K. Akiyama, S. Muroi, M. Kuroda, F. Hatam, D. R. Littman, and I. Taniuchi. 2007. Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbf beta binding to the Il4 silencer. *The Journal of experimental medicine* 204:1749-1755.
16. Usui, T., J. C. Preiss, Y. Kanno, Z. J. Yao, J. H. Bream, J. J. O'Shea, and W. Strober. 2006. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *The Journal of experimental medicine* 203:755-766.
17. Hatton, R. D., L. E. Harrington, R. J. Luther, T. Wakefield, K. M. Janowski, J. R. Oliver, R. L. Lallone, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2006. A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. *Immunity* 25:717-729.

18. Mullen, A. C., A. S. Hutchins, F. A. High, H. W. Lee, K. J. Sykes, L. A. Chodosh, and S. L. Reiner. 2002. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nature immunology* 3:652-658.
19. Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang, and S. L. Reiner. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292:1907-1910.
20. Bacon, C. M., E. F. Petricoin, 3rd, J. R. Ortaldo, R. C. Rees, A. C. Lerner, J. A. Johnston, and J. J. O'Shea. 1995. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7307-7311.
21. Kano, S., K. Sato, Y. Morishita, S. Vollstedt, S. Kim, K. Bishop, K. Honda, M. Kubo, and T. Taniguchi. 2008. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nature immunology* 9:34-41.
22. Kaplan, M. H., Y. L. Sun, T. Hoey, and M. J. Grusby. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382:174-177.
23. Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld, and J. N. Ihle. 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382:171-174.
24. Thieu, V. T., Q. Yu, H. C. Chang, N. Yeh, E. T. Nguyen, S. Sehra, and M. H. Kaplan. 2008. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 29:679-690.
25. Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *The Journal of experimental medicine* 185:817-824.
26. Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature immunology* 3:549-557.
27. Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra, and K. M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547-549.
28. Schulz, E. G., L. Mariani, A. Radbruch, and T. Hofer. 2009. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 30:673-683.
29. Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, H. Shen, N. Cereb, S. Y. Yang, T. Lindsten, J. Rossant, C. A. Hunter, and S. L. Reiner. 2003. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science (New York, N.Y)* 302:1041-1043.
30. Suto, A., A. L. Wurster, S. L. Reiner, and M. J. Grusby. 2006. IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J Immunol* 177:3721-3727.
31. Sareneva, T., I. Julkunen, and S. Matikainen. 2000. IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* 165:1933-1938.
32. Yoshimoto, T., K. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkusu, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira, and K. Nakanishi. 1998. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161:3400-3407.
33. Yang, J., H. Zhu, T. L. Murphy, W. Ouyang, and K. M. Murphy. 2001. IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nature immunology* 2:157-164.
34. Amsen, D., A. Antov, and R. A. Flavell. 2009. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:116-124.

35. Maekawa, Y., S. Tsukumo, S. Chiba, H. Hirai, Y. Hayashi, H. Okada, K. Kishihara, and K. Yasutomo. 2003. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4⁺ T cells. *Immunity* 19:549-559.
36. Minter, L. M., D. M. Turley, P. Das, H. M. Shin, I. Joshi, R. G. Lawlor, O. H. Cho, T. Palaga, S. Gottipati, J. C. Telfer, L. Kostura, A. H. Fauq, K. Simpson, K. A. Such, L. Miele, T. E. Golde, S. D. Miller, and B. A. Osborne. 2005. Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nature immunology* 6:680-688.
37. Shin, H. M., L. M. Minter, O. H. Cho, S. Gottipati, A. H. Fauq, T. E. Golde, G. E. Sonenshein, and B. A. Osborne. 2006. Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. *EMBO J* 25:129-138.
38. Sun, J., C. J. Krawczyk, and E. J. Pearce. 2008. Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4. *J Immunol* 180:1655-1661.
39. Kaplan, M. H., U. Schindler, S. T. Smiley, and M. J. Grusby. 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4:313-319.
40. Shimoda, K., J. van Deursen, M. Y. Sangster, S. R. Sarawar, R. T. Carson, R. A. Tripp, C. Chu, F. W. Quelle, T. Nosaka, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. Grosveld, W. E. Paul, and J. N. Ihle. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630-633.
41. Takeda, K., T. Tanaka, W. Shi, M. Matsumoto, M. Minami, S. Kashiwamura, K. Nakanishi, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-630.
42. Yamane, H., J. Zhu, and W. E. Paul. 2005. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4⁺ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *The Journal of experimental medicine* 202:793-804.
43. Spilianakis, C. G., and R. A. Flavell. 2004. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nature immunology* 5:1017-1027.
44. Lee, H. J., N. Takemoto, H. Kurata, Y. Kamogawa, S. Miyatake, A. O'Garra, and N. Arai. 2000. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *The Journal of experimental medicine* 192:105-115.
45. Lee, G. R., P. E. Fields, and R. A. Flavell. 2001. Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* 14:447-459.
46. Avni, O., D. Lee, F. Macian, S. J. Szabo, L. H. Glimcher, and A. Rao. 2002. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature immunology* 3:643-651.
47. Ho, I. C., T. S. Tai, and S. Y. Pai. 2009. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:125-135.
48. Ouyang, W., M. Lohning, Z. Gao, M. Assenmacher, S. Ranganath, A. Radbruch, and K. M. Murphy. 2000. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12:27-37.
49. Pai, S. Y., M. L. Truitt, and I. C. Ho. 2004. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1993-1998.
50. Zhu, J., B. Min, J. Hu-Li, C. J. Watson, A. Grinberg, Q. Wang, N. Killeen, J. F. Urban, Jr., L. Guo, and W. E. Paul. 2004. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nature immunology* 5:1157-1165.
51. Sokol, C. L., G. M. Barton, A. G. Farr, and R. Medzhitov. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature immunology* 9:310-318.
52. Xin, J., K. Ohmori, J. Nishida, Y. Zhu, and H. Huang. 2007. The initial response of CD4⁺ IL-4-producing cells. *Int Immunol* 19:305-310.
53. Tanaka, S., J. Tsukada, W. Suzuki, K. Hayashi, K. Tanigaki, M. Tsuji, H. Inoue, T. Honjo, and M. Kubo. 2006. The interleukin-4 enhancer CNS-2 is regulated by Notch signals and

- controls initial expression in NKT cells and memory-type CD4 T cells. *Immunity* 24:689-701.
54. Jankovic, D., M. C. Kullberg, N. Noben-Trauth, P. Caspar, W. E. Paul, and A. Sher. 2000. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4⁺ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 164:3047-3055.
 55. Min, B., M. Prout, J. Hu-Li, J. Zhu, D. Jankovic, E. S. Morgan, J. F. Urban, Jr., A. M. Dvorak, F. D. Finkelman, G. LeGros, and W. E. Paul. 2004. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *The Journal of experimental medicine* 200:507-517.
 56. Finkelman, F. D., S. C. Morris, T. Orekhova, M. Mori, D. Donaldson, S. L. Reiner, N. L. Reilly, L. Schopf, and J. F. Urban, Jr. 2000. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164:2303-2310.
 57. Amsen, D., A. Antov, D. Jankovic, A. Sher, F. Radtke, A. Souabni, M. Busslinger, B. McCright, T. Gridley, and R. A. Flavell. 2007. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27:89-99.
 58. Fang, T. C., Y. Yashiro-Ohtani, C. Del Bianco, D. M. Knoblock, S. C. Blacklow, and W. S. Pear. 2007. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27:100-110.
 59. Zhu, J., J. Cote-Sierra, L. Guo, and W. E. Paul. 2003. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 19:739-748.
 60. Cote-Sierra, J., G. Foucras, L. Guo, L. Chiodetti, H. A. Young, J. Hu-Li, J. Zhu, and W. E. Paul. 2004. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3880-3885.
 61. Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine* 172:921-929.
 62. Zhu, J., D. Jankovic, A. Grinberg, L. Guo, and W. E. Paul. 2006. Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18214-18219.
 63. Zhu, J., L. Guo, B. Min, C. J. Watson, J. Hu-Li, H. A. Young, P. N. Tsichlis, and W. E. Paul. 2002. Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16:733-744.
 64. Ho, I. C., M. R. Hodge, J. W. Rooney, and L. H. Glimcher. 1996. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85:973-983.
 65. Kim, J. I., I. C. Ho, M. J. Grusby, and L. H. Glimcher. 1999. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10:745-751.
 66. Lohoff, M., H. W. Mittrucker, S. Prechtel, S. Bischof, F. Sommer, S. Kock, D. A. Ferrick, G. S. Duncan, A. Gessner, and T. W. Mak. 2002. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11808-11812.
 67. Rengarajan, J., K. A. Mowen, K. D. McBride, E. D. Smith, H. Singh, and L. H. Glimcher. 2002. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *The Journal of experimental medicine* 195:1003-1012.
 68. Steinman, L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13:139-145.
 69. Willenborg, D. O., S. Fordham, C. C. Bernard, W. B. Cowden, and I. A. Ramshaw. 1996. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 157:3223-3227.
 70. Krakowski, M., and T. Owens. 1996. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 26:1641-1646.

71. Willenborg, D. O., S. A. Fordham, M. A. Staykova, I. A. Ramshaw, and W. B. Cowden. 1999. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol* 163:5278-5286.
72. Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton, and C. G. Fathman. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156:5-7.
73. Tran, E. H., E. N. Prince, and T. Owens. 2000. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 164:2759-2768.
74. Duong, T. T., F. D. Finkelman, B. Singh, and G. H. Strejan. 1994. Effect of anti-interferon-gamma monoclonal antibody treatment on the development of experimental allergic encephalomyelitis in resistant mouse strains. *J Neuroimmunol* 53:101-107.
75. Billiau, A., H. Heremans, F. Vandekerckhove, R. Dijkmans, H. Sobis, E. Meulepas, and H. Carton. 1988. Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *J Immunol* 140:1506-1510.
76. Voorthuis, J. A., B. M. Uitdehaag, C. J. De Groot, P. H. Goede, P. H. van der Meide, and C. D. Dijkstra. 1990. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 81:183-188.
77. Becher, B., B. G. Durell, and R. J. Noelle. 2002. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110:493-497.
78. Camoglio, L., N. P. Juffermans, M. Peppelenbosch, A. A. te Velde, F. J. ten Kate, S. J. van Deventer, and M. Kopf. 2002. Contrasting roles of IL-12p40 and IL-12p35 in the development of hapten-induced colitis. *Eur J Immunol* 32:261-269.
79. Zhang, G. X., B. Gran, S. Yu, J. Li, I. Siglienti, X. Chen, M. Kamoun, and A. Rostami. 2003. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 170:2153-2160.
80. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 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.
81. Kastelein, R. A., C. A. Hunter, and D. J. Cua. 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25:221-242.
82. Gran, B., G. X. Zhang, S. Yu, J. Li, X. H. Chen, E. S. Ventura, M. Kamoun, and A. Rostami. 2002. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169:7104-7110.
83. Cua, D. J. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
84. Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick, and D. J. Cua. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 198:1951-1957.
85. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage, and A. L. Gurney. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910-1914.
86. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell

- population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201:233-240.
87. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6:1133-1141.
 88. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 6:1123-1132.
 89. Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177.
 90. Stockinger, B., M. Veldhoen, and B. Martin. 2007. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 19:353-361.
 91. Yao, Z., W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen, and M. K. Spriggs. 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3:811-821.
 92. Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine* 194:519-527.
 93. Huang, W., L. Na, P. L. Fidel, and P. Schwarzenberger. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190:624-631.
 94. Zheng, Y., P. A. Valdez, D. M. Danilenko, Y. Hu, S. M. Sa, Q. Gong, A. R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F. J. de Sauvage, and W. Ouyang. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14:282-289.
 95. Ishigame, H., S. Kakuta, T. Nagai, M. Kadoki, A. Nambu, Y. Komiyama, N. Fujikado, Y. Tanahashi, A. Akitsu, H. Kotaki, K. Sudo, S. Nakae, C. Sasakawa, and Y. Iwakura. 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30:108-119.
 96. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
 97. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
 98. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
 99. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*.
 100. Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487.
 101. Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard, and D. R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* 8:967-974.
 102. Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten, and C. Dong. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480-483.
 103. McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D. J. Cua. 2007. TGF-β and IL-6 drive the production of IL-17 and

- IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology* 8:1390-1397.
104. McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea, and D. J. Cua. 2009. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature immunology* 10:314-324.
 105. Awasthi, A., L. Riol-Blanco, A. Jager, T. Korn, C. Pot, G. Galileos, E. Bettelli, V. K. Kuchroo, and M. Oukka. 2009. Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells. *J Immunol* 182:5904-5908.
 106. Murphy, K. M., and S. L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
 107. Stumhofer, J. S., A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C. J. Saris, J. J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst, and C. A. Hunter. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature immunology* 7:937-945.
 108. Fitzgerald, D. C., B. Ciric, T. Touil, H. Harle, J. Grammatikopolou, J. Das Sarma, B. Gran, G. X. Zhang, and A. Rostami. 2007. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:3268-3275.
 109. Batten, M., J. Li, S. Yi, N. M. Kljavin, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* 7:929-936.
 110. Fitzgerald, D. C., G. X. Zhang, M. El-Behi, Z. Fonseca-Kelly, H. Li, S. Yu, C. J. Saris, B. Gran, B. Ciric, and A. Rostami. 2007. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nature immunology* 8:1372-1379.
 111. Kleinschek, M. A., A. M. Owyang, B. Joyce-Shaikh, C. L. Langrish, Y. Chen, D. M. Gorman, W. M. Blumenschein, T. McClanahan, F. Brombacher, S. D. Hurst, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2007. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 204:161-170.
 112. Gorelik, L., and R. A. Flavell. 2000. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12:171-181.
 113. Gorham, J. D., M. L. Guler, D. Fenoglio, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1998. Low dose TGF-beta attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells. *J Immunol* 161:1664-1670.
 114. Lin, J. T., S. L. Martin, L. Xia, and J. D. Gorham. 2005. TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet. *J Immunol* 174:5950-5958.
 115. Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
 116. Ivanov, II, L. Zhou, and D. R. Littman. 2007. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 19:409-417.
 117. McGeachy, M. J., and D. J. Cua. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28:445-453.
 118. Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten, and C. Dong. 2008. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors RORalpha and RORgamma. *Immunity* 28:29-39.
 119. Harris, T. J., J. F. Grosso, H. R. Yen, H. Xin, M. Kortylewski, E. Albesiano, E. L. Hipkiss, D. Getnet, M. V. Goldberg, C. H. Maris, F. Housseau, H. Yu, D. M. Pardoll, and C. G.

- Drake. 2007. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179:4313-4317.
120. Mathur, A. N., H. C. Chang, D. G. Zisoulis, G. L. Stritesky, Q. Yu, J. T. O'Malley, R. Kapur, D. E. Levy, G. S. Kansas, and M. H. Kaplan. 2007. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol* 178:4901-4907.
 121. Liu, X., Y. S. Lee, C. R. Yu, and C. E. Egwuagu. 2008. Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *J Immunol* 180:6070-6076.
 122. Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich, and C. Dong. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282:9358-9363.
 123. Yang, L., D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, and D. A. Hafler. 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*.
 124. Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H. L. Weiner. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453:65-71.
 125. Veldhoen, M., K. Hirota, J. Christensen, A. O'Garra, and B. Stockinger. 2009. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *The Journal of experimental medicine* 206:43-49.
 126. Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renauld, and B. Stockinger. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453:106-109.
 127. Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature immunology* 8:958-966.
 128. Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2009. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity* 30:576-587.
 129. Laurence, A., C. M. Tato, T. S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R. B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E. M. Shevach, and J. O'Shea J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26:371-381.
 130. Lohr, J., B. Knoechel, J. J. Wang, A. V. Villarino, and A. K. Abbas. 2006. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 203:2785-2791.
 131. Moisan, J., R. Grenningloh, E. Bettelli, M. Oukka, and I. C. Ho. 2007. Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation. *The Journal of experimental medicine* 204:2825-2835.
 132. Yang, X. O., R. Nurieva, G. J. Martinez, H. S. Kang, Y. Chung, B. P. Pappu, B. Shah, S. H. Chang, K. S. Schluns, S. S. Watowich, X. H. Feng, A. M. Jetten, and C. Dong. 2008. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29:44-56.
 133. Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler, and D. R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453:236-240.
 134. Ichiyama, K., M. Hashimoto, T. Sekiya, R. Nakagawa, Y. Wakabayashi, Y. Sugiyama, K. Komai, I. Saba, T. Moroy, and A. Yoshimura. 2009. Gfi1 negatively regulates Th17 differentiation by inhibiting ROR{gamma}t activity. *Int Immunol*.
 135. Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52:65-70.
 136. Minegishi, Y., M. Saito, S. Tsuchiya, I. Tsuge, H. Takada, T. Hara, N. Kawamura, T. Ariga, S. Pasic, O. Stojkovic, A. Metin, and H. Karasuyama. 2007. Dominant-negative

- mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 448:1058-1062.
137. Milner, J. D., J. M. Brenchley, A. Laurence, A. F. Freeman, B. J. Hill, K. M. Elias, Y. Kanno, C. Spalding, H. Z. Elloumi, M. L. Paulson, J. Davis, A. Hsu, A. I. Asher, J. O'Shea, S. M. Holland, W. E. Paul, and D. C. Douek. 2008. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 452:773-776.
 138. Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology* 8:942-949.
 139. Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman, and R. de Waal Malefyt. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature immunology* 8:950-957.
 140. Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S. I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot, and V. Soumelis. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nature immunology* 9:650-657.
 141. van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter, F. J. Muller, D. W. Hommes, S. A. Zaat, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27:660-669.
 142. Manel, N., D. Unutmaz, and D. R. Littman. 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nature immunology* 9:641-649.
 143. Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2008. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *The Journal of experimental medicine* 205:1903-1916.
 144. Chen, Z., C. M. Tato, L. Muul, A. Laurence, and J. J. O'Shea. 2007. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 56:2936-2946.
 145. Santarlasci, V., L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, V. Querci, R. De Palma, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 39:207-215.
 146. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* 204:1849-1861.
 147. Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, and S. Romagnani. 2008. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 20:1361-1368.
 148. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
 149. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
 150. Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 184:387-396.

151. Curotto de Lafaille, M. A., and J. J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635.
152. Josefowicz, S. Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-625.
153. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
154. Marie, J. C., D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25:441-454.
155. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201:737-746.
156. Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A. B. Kulkarni, S. Perruche, and W. Chen. 2008. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nature immunology* 9:632-640.
157. Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, N. Kutchukhidze, and J. J. Lafaille. 2004. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* 173:7259-7268.
158. D'Cruz, L. M., and L. Klein. 2005. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nature immunology* 6:1152-1159.
159. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology* 6:1142-1151.
160. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine* 201:723-735.
161. Burchill, M. A., J. Yang, K. B. Vang, J. J. Moon, H. H. Chu, C. W. Lio, A. L. Vegoe, C. S. Hsieh, M. K. Jenkins, and M. A. Farrar. 2008. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28:112-121.
162. Malek, T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26:453-479.
163. Lio, C. W., and C. S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
164. Burchill, M. A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar, and M. A. Farrar. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178:280-290.
165. Soper, D. M., D. J. Kasprowicz, and S. F. Ziegler. 2007. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* 37:1817-1826.
166. Vang, K. B., J. Yang, S. A. Mahmud, M. A. Burchill, A. L. Vegoe, and M. A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* 181:3285-3290.
167. Powell, B. R., N. R. Buist, and P. Stenzel. 1982. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 100:731-737.
168. Godfrey, V. L., J. E. Wilkinson, and L. B. Russell. 1991. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol* 138:1379-1387.
169. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
170. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation,

- polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
171. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
 172. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
 173. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology* 4:337-342.
 174. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4:330-336.
 175. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
 176. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143.
 177. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747.
 178. Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada, and S. Sakaguchi. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685-689.
 179. Li, B., and M. I. Greene. 2007. FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex. *Cell Cycle* 6:1432-1436.
 180. Li, B., A. Samanta, X. Song, K. T. Iacono, K. Bembas, R. Tao, S. Basu, J. L. Riley, W. W. Hancock, Y. Shen, S. J. Saouaf, and M. I. Greene. 2007. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4571-4576.
 181. Marson, A., K. Kretschmer, G. M. Frampton, E. S. Jacobsen, J. K. Polansky, K. D. MacIsaac, S. S. Levine, E. Fraenkel, H. von Boehmer, and R. A. Young. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445:931-935.
 182. Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940.
 183. Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, and J. J. Lafaille. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *The Journal of experimental medicine* 196:851-857.
 184. Knoechel, B., J. Lohr, E. Kahn, J. A. Bluestone, and A. K. Abbas. 2005. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *The Journal of experimental medicine* 202:1375-1386.
 185. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198:1875-1886.
 186. Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine* 199:1401-1408.
 187. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature immunology* 6:1219-1227.

188. Mucida, D., N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J. J. Lafaille, and M. A. Curotto de Lafaille. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 115:1923-1933.
189. Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149-5153.
190. Zheng, S. G., J. Wang, P. Wang, J. D. Gray, and D. A. Horwitz. 2007. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178:2018-2027.
191. Zheng, S. G., J. H. Wang, W. Stohl, K. S. Kim, J. D. Gray, and D. A. Horwitz. 2006. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol* 176:3321-3329.
192. Benson, M. J., K. Pino-Lagos, M. Roseblatt, and R. J. Noelle. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *The Journal of experimental medicine* 204:1765-1774.
193. Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317:256-260.
194. Mucida, D., Y. Park, and H. Cheroutre. 2009. From the diet to the nucleus: Vitamin A and TGF-beta join efforts at the mucosal interface of the intestine. *Semin Immunol* 21:14-21.
195. Hill, J. A., J. A. Hall, C. M. Sun, Q. Cai, N. Ghyselinck, P. Chambon, Y. Belkaid, D. Mathis, and C. Benoist. 2008. Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells. *Immunity* 29:758-770.
196. Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* 204:1775-1785.
197. Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204:1757-1764.
198. Akbar, A. N., M. Vukmanovic-Stejic, L. S. Taams, and D. C. Macallan. 2007. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol* 7:231-237.
199. Pyzik, M., and C. A. Piccirillo. 2007. TGF- β 1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol* 82:335-346.
200. Wang, Z., J. Hong, W. Sun, G. Xu, N. Li, X. Chen, A. Liu, L. Xu, B. Sun, and J. Z. Zhang. 2006. Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs. *J Clin Invest* 116:2434-2441.
201. Niedbala, W., B. Cai, H. Liu, N. Pitman, L. Chang, and F. Y. Liew. 2007. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15478-15483.
202. Guo, F., C. Iclozan, W.-K. Suh, C. Anasetti, and X.-Z. Yu. 2008. CD28 Controls Differentiation of Regulatory T Cells from Naive CD4 T Cells. *J Immunol* 181:2285-2291.
203. Liang, S., P. Alard, Y. Zhao, S. Parnell, S. L. Clark, and M. M. Kosiewicz. 2005. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J. Exp. Med.* 201:127-137.
204. Thorstenson, K. M., and A. Khoruts. 2001. Generation of Anergic and Potentially Immunoregulatory CD25+CD4 T Cells In Vivo After Induction of Peripheral Tolerance with Intravenous or Oral Antigen. *J Immunol* 167:188-195.
205. Knoechel, B., J. Lohr, E. Kahn, J. A. Bluestone, and A. K. Abbas. 2005. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J. Exp. Med.* 202:1375-1386.

206. Walker, M. R., D. J. Kasprovicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner, and S. F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112:1437-1443.
207. Walker, M. R., B. D. Carson, G. T. Nepom, S. F. Ziegler, and J. H. Buckner. 2005. De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4103-4108.
208. Morgan, M. E., J. H. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Heemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, L. van der Zanden, R. R. de Vries, T. W. Huizinga, T. H. Ottenhoff, and R. E. Toes. 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 66:13-20.
209. Zheng, S. G., J. D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, and D. A. Horwitz. 2002. Generation Ex Vivo of TGF- β -Producing Regulatory T Cells from CD4+CD25- Precursors. *J Immunol* 169:4183-4189.
210. Zheng, S. G., J. H. Wang, J. D. Gray, H. Soucier, and D. A. Horwitz. 2004. Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25- Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol* 172:5213-5221.
211. Skapenko, A., J. R. Kalden, P. E. Lipsky, and H. Schulze-Koops. 2005. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol* 175:6107-6116.
212. Grimbert, P., S. Bouguermouh, N. Baba, T. Nakajima, Z. Allakhverdi, D. Braun, H. Saito, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2006. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *J Immunol* 177:3534-3541.
213. Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H. D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38.
214. Lal, G., N. Zhang, W. van der Touw, Y. Ding, W. Ju, E. P. Bottinger, S. P. Reid, D. E. Levy, and J. S. Bromberg. 2009. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol* 182:259-273.
215. Huehn, J., J. K. Polansky, and A. Hamann. 2008. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* advanced online publication.
216. Mantel, P. Y., N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176:3593-3602.
217. Gavin, M. A., T. R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W. Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E. L. Ocheltree, P. D. Greenberg, H. D. Ochs, and A. Y. Rudensky. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6659-6664.
218. Tran, D. Q., H. Ramsey, and E. M. Shevach. 2007. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 110:2983-2990.
219. Allan, S. E., S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo, and M. K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19:345-354.
220. Pillai, V., S. B. Ortega, C. K. Wang, and N. J. Karandikar. 2007. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol* 123:18-29.
221. Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.

222. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
223. Fukaura, H., S. C. Kent, M. J. Pietrusiewicz, S. J. Khoury, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 1996. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 98:70-77.
224. Tsuji, N. M., and A. Kosaka. 2008. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol* 29:532-540.
225. Gershon, R. K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723-737.
226. Anderson, L. C., H. Binz, and H. Wigzell. 1976. Specific unresponsiveness to transplantation antigens induced by auto-immunisation with syngeneic, antigen-specific T lymphoblasts. *Nature* 264:778-780.
227. Jiang, H., S. I. Zhang, and B. Pernis. 1992. Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256:1213-1215.
228. Koh, D. R., W. P. Fung-Leung, A. Ho, D. Gray, H. Acha-Orbea, and T. W. Mak. 1992. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8⁻ mice. *Science* 256:1210-1213.
229. Zhang, J., R. Medaer, P. Stinissen, D. Hafler, and J. Raus. 1993. MHC-restricted depletion of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. *Science* 261:1451-1454.
230. Hsieh, C. S., Y. Liang, A. J. Tzysnik, S. G. Self, D. Liggitt, and A. Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21:267-277.
231. Hsieh, C. S., Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot, and A. Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology* 7:401-410.
232. Pacholczyk, R., H. Ignatowicz, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2006. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity* 25:249-259.
233. Wong, J., R. Obst, M. Correia-Neves, G. Losyev, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 178:7032-7041.
234. Pacholczyk, R., J. Kern, N. Singh, M. Iwashima, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2007. Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity* 27:493-504.
235. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3(+) T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645.
236. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
237. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10:1969-1980.
238. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* 188:287-296.
239. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of experimental medicine* 193:1303-1310.
240. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with

- regulatory properties isolated from peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* 193:1285-1294.
241. Hawrylowicz, C. M., and A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5:271-283.
 242. Joetham, A., K. Takeda, C. Taube, N. Miyahara, S. Matsubara, T. Koya, Y. H. Rha, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2007. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 178:1433-1442.
 243. Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller, and A. Y. Rudensky. 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28:546-558.
 244. Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190:995-1004.
 245. Mann, M. K., K. Maresz, L. P. Shriver, Y. Tan, and B. N. Dittel. 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178:3447-3456.
 246. Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
 247. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104:2840-2848.
 248. Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
 249. Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R. I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109:2058-2065.
 250. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2480-2488.
 251. Duthoit, C. T., D. J. Mekala, R. S. Alli, and T. L. Geiger. 2005. Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4+ T cells by regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes. *J Immunol* 174:155-163.
 252. Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology* 8:1353-1362.
 253. Oberle, N., N. Eberhardt, C. S. Falk, P. H. Krammer, and E. Suri-Payer. 2007. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 179:3578-3587.
 254. Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 204:1257-1265.
 255. Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110:1225-1232.
 256. Kobie, J. J., P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell, and T. R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses

- effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177:6780-6786.
257. Bynoe, M. S., and C. Viret. 2008. Foxp3+CD4+ T cell-mediated immunosuppression involves extracellular nucleotide catabolism. *Trends Immunol* 29:99-102.
 258. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 204:1303-1310.
 259. Shalev, I., H. Liu, C. Kosciak, A. Bartczak, M. Javadi, K. M. Wong, A. Maknojjia, W. He, M. F. Liu, J. Diao, E. Winter, J. Manuel, D. McCarthy, M. Cattral, J. Gommerman, D. A. Clark, M. J. Phillips, R. R. Gorczynski, L. Zhang, G. Downey, D. Grant, M. I. Cybulsky, and G. Levy. 2008. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J Immunol* 180:249-260.
 260. Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nature immunology* 7:83-92.
 261. Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille, and M. L. Dustin. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 203:505-511.
 262. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 192:295-302.
 263. Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio, and F. Ivars. 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118:240-249.
 264. Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdager, and P. Santamaria. 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 19:877-889.
 265. Read, S., R. Greenwald, A. Izcue, N. Robinson, D. Mandelbrot, L. Francisco, A. H. Sharpe, and F. Powrie. 2006. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* 177:4376-4383.
 266. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322:271-275.
 267. Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology* 4:1206-1212.
 268. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4:762-774.
 269. Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology* 3:1097-1101.
 270. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30:1538-1543.
 271. Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen, and W. Zou. 2006. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 177:40-44.
 272. Lewkowich, I. P., N. S. Herman, K. W. Schleifer, M. P. Dance, B. L. Chen, K. M. Dienger, A. A. Sproles, J. S. Shah, J. Kohl, Y. Belkaid, and M. Wills-Karp. 2005. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary

- dendritic cell phenotype and function. *The Journal of experimental medicine* 202:1549-1561.
273. Houot, R., I. Perrot, E. Garcia, I. Durand, and S. Lebecque. 2006. Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol* 176:5293-5298.
 274. Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 172:4676-4680.
 275. DiPaolo, R. J., C. Brinster, T. S. Davidson, J. Andersson, D. Glass, and E. M. Shevach. 2007. Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. *J Immunol* 179:4685-4693.
 276. Taams, L. S., J. M. van Amelsfort, M. M. Tiemessen, K. M. Jacobs, E. C. de Jong, A. N. Akbar, J. W. Bijlsma, and F. P. Lafeber. 2005. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol* 66:222-230.
 277. Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. van Herwijnen, S. John, and L. S. Taams. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19446-19451.
 278. Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180:5916-5926.
 279. Ansel, K. M., D. U. Lee, and A. Rao. 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nature immunology* 4:616-623.
 280. Merkenschlager, M., and C. B. Wilson. 2008. RNAi and chromatin in T cell development and function. *Curr Opin Immunol* 20:131-138.
 281. Wilson, C. B., E. Rowell, and M. Sekimata. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:91-105.
 282. Wei, G., L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T. Y. Roh, W. T. Watford, D. E. Schones, W. Peng, H. W. Sun, W. E. Paul, J. J. O'Shea, and K. Zhao. 2009. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30:155-167.
 283. Zhou, L., M. M. Chong, and D. R. Littman. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30:646-655.
 284. Krawczyk, C. M., H. Shen, and E. J. Pearce. 2007. Functional plasticity in memory T helper cell responses. *J Immunol* 178:4080-4088.
 285. Lee, Y. K., H. Turner, C. L. Maynard, J. R. Oliver, D. Chen, C. O. Elson, and C. T. Weaver. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92-107.
 286. Bending, D., H. De La Pena, M. Veldhoen, J. M. Phillips, C. Uyttenhove, B. Stockinger, and A. Cooke. 2009. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest*.
 287. Xu, L., A. Kitani, I. Fuss, and W. Strober. 2007. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178:6725-6729.
 288. Nagar, M., H. Vernitsky, Y. Cohen, D. Dominissini, Y. Berkun, G. Rechavi, N. Amariglio, and I. Goldstein. 2008. Epigenetic inheritance of DNA methylation limits activation-induced expression of FOXP3 in conventional human CD25-CD4+ T cells. *Int Immunol* 20:1041-1055.
 289. Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T. J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek, and J. Huehn. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37:2378-2389.

290. Polansky, J. K., K. Kretschmer, J. Freyer, S. Floess, A. Garbe, U. Baron, S. Olek, A. Hamann, H. von Boehmer, and J. Huehn. 2008. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 38:1654-1663.
291. Josefowicz, S. Z., C. B. Wilson, and A. Y. Rudensky. 2009. Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 182:6648-6652.
292. Brown, E., L. Hooper, T. Ho, and H. Gresham. 1990. Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J Cell Biol* 111:2785-2794.
293. Rosales, C., H. D. Gresham, and E. J. Brown. 1992. Expression of the 50-kDa integrin-associated protein on myeloid cells and erythrocytes. *J Immunol* 149:2759-2764.
294. Campbell, I. G., P. S. Freemont, W. Foulkes, and J. Trowsdale. 1992. An ovarian tumor marker with homology to vaccinia virus contains an IgV-like region and multiple transmembrane domains. *Cancer Res* 52:5416-5420.
295. Lindberg, F. P., D. M. Lublin, M. J. Telen, R. A. Veile, Y. E. Miller, H. Donis-Keller, and E. J. Brown. 1994. Rh-related antigen CD47 is the signal-transducer integrin-associated protein. *J Biol Chem* 269:1567-1570.
296. Mawby, W. J., C. H. Holmes, D. J. Anstee, F. A. Spring, and M. J. Tanner. 1994. Isolation and characterization of CD47 glycoprotein: a multispinning membrane protein which is the same as integrin-associated protein (IAP) and the ovarian tumour marker OA3. *Biochem J* 304 (Pt 2):525-530.
297. Reinhold, M. I., F. P. Lindberg, D. Plas, S. Reynolds, M. G. Peters, and E. J. Brown. 1995. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108 (Pt 11):3419-3425.
298. Brown, E. J., and W. A. Frazier. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11:130-135.
299. Lindberg, F. P., H. D. Gresham, E. Schwarz, and E. J. Brown. 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol* 123:485-496.
300. Rebres, R. A., L. E. Vaz, J. M. Green, and E. J. Brown. 2001. Normal ligand binding and signaling by CD47 (integrin-associated protein) requires a long range disulfide bond between the extracellular and membrane-spanning domains. *J Biol Chem* 276:34607-34616.
301. Schickel, J., K. Stahn, K. P. Zimmer, R. Sudbrak, T. M. Storm, M. Durst, M. Kiehnopf, and T. Deufel. 2002. Gene for integrin-associated protein (IAP, CD47): physical mapping, genomic structure, and expression studies in skeletal muscle. *Biochem Cell Biol* 80:169-176.
302. Wang, X. Q., and W. A. Frazier. 1998. The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 9:865-874.
303. Frazier, W. A., A. G. Gao, J. Dimitry, J. Chung, E. J. Brown, F. P. Lindberg, and M. E. Linder. 1999. The thrombospondin receptor integrin-associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi. *J Biol Chem* 274:8554-8560.
304. Manna, P. P., and W. A. Frazier. 2003. The mechanism of CD47-dependent killing of T cells: heterotrimeric Gi-dependent inhibition of protein kinase A. *J Immunol* 170:3544-3553.
305. Green, J. M., A. Zhelesnyak, J. Chung, F. P. Lindberg, M. Sarfati, W. A. Frazier, and E. J. Brown. 1999. Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* 146:673-682.
306. Manna, P. P., and W. A. Frazier. 2004. CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A. *Cancer Res* 64:1026-1036.

307. 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.
308. Isenberg, J. S., D. S. Annis, M. L. Pendrak, M. Ptaszynska, W. A. Frazier, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2009. Differential interactions of thrombospondin-1, -2, and -4 with CD47 and effects on cGMP signaling and ischemic injury responses. *J Biol Chem* 284:1116-1125.
309. Floquet, N., S. Dedieu, L. Martiny, M. Dauchez, and D. Perahia. 2008. Human thrombospondin's (TSP-1) C-terminal domain opens to interact with the CD-47 receptor: a molecular modeling study. *Arch Biochem Biophys* 478:103-109.
310. Kosfeld, M. D., T. V. Pavlopoulos, and W. A. Frazier. 1991. Cell attachment activity of the carboxyl-terminal domain of human thrombospondin expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266:24257-24259.
311. Kosfeld, M. D., and W. A. Frazier. 1992. Identification of active peptide sequences in the carboxyl-terminal cell binding domain of human thrombospondin-1. *J Biol Chem* 267:16230-16236.
312. Kosfeld, M. D., and W. A. Frazier. 1993. Identification of a new cell adhesion motif in two homologous peptides from the COOH-terminal cell binding domain of human thrombospondin. *J Biol Chem* 268:8808-8814.
313. Baenziger, N. L., G. N. Brodie, and P. W. Majerus. 1971. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:240-243.
314. Lawler, J. W., H. S. Slayter, and J. E. Coligan. 1978. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 253:8609-8616.
315. Adams, J. C., and J. Lawler. 2004. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:961-968.
316. Adams, J. C. 2001. THROMBOSPONDINS: Multifunctional Regulators of Cell Interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17:25-51.
317. Adams, J., and J. Lawler. 1993. Extracellular matrix: the thrombospondin family. *Curr Biol* 3:188-190.
318. Carlson, C. B., J. Lawler, and D. F. Mosher. 2008. Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci* 65:672-686.
319. Lawler, J. 2000. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 12:634-640.
320. Lawler, J., and R. O. Hynes. 1986. The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* 103:1635-1648.
321. Bornstein, P. 1995. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 130:503-506.
322. Laherty, C. D., K. O'Rourke, F. W. Wolf, R. Katz, M. F. Seldin, and V. M. Dixit. 1992. Characterization of mouse thrombospondin 2 sequence and expression during cell growth and development. *J Biol Chem* 267:3274-3281.
323. Vischer, P., W. Volker, A. Schmidt, and N. Sinclair. 1988. Association of thrombospondin of endothelial cells with other matrix proteins and cell attachment sites and migration tracks. *Eur J Cell Biol* 47:36-46.
324. Murphy-Ullrich, J. E., and D. F. Mosher. 1987. Interactions of thrombospondin with endothelial cells: receptor-mediated binding and degradation. *J Cell Biol* 105:1603-1611.
325. Hunter, N. R., J. Dawes, I. R. MacGregor, and D. S. Pepper. 1984. Quantitation by radioimmunoassay of thrombospondin synthesised and secreted by human endothelial cells. *Thromb Haemost* 52:288-291.
326. Jaffe, E. A., J. T. Ruggiero, and D. J. Falcone. 1985. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood* 65:79-84.

327. Jaffe, E. A., J. T. Ruggiero, L. K. Leung, M. J. Doyle, P. J. McKeown-Longo, and D. F. Mosher. 1983. Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:998-1002.
328. Mosher, D. F., M. J. Doyle, and E. A. Jaffe. 1982. Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 93:343-348.
329. Raugi, G. J., S. M. Mumby, D. Abbott-Brown, and P. Bornstein. 1982. Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *J Cell Biol* 95:351-354.
330. Arbeille, B. B., F. M. Fauvel-Lafeve, M. B. Lemesle, D. Tenza, and Y. J. Legrand. 1991. Thrombospondin: a component of microfibrils in various tissues. *J Histochem Cytochem* 39:1367-1375.
331. Donoviel, D. B., S. L. Amacher, K. W. Judge, and P. Bornstein. 1990. Thrombospondin gene expression is associated with mitogenesis in 3T3 cells: induction by basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 145:16-23.
332. Majack, R. A., J. Mildbrandt, and V. M. Dixit. 1987. Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 262:8821-8825.
333. Uchida, H., H. Hayashi, M. Kuroki, K. Uno, H. Yamada, Y. Yamashita, J. Tombran-Tink, M. Kuroki, and K. Oshima. 2005. Vitamin A up-regulates the expression of thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor in retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* 80:23-30.
334. Uchida, H., M. Kuroki, T. Shitama, H. Hayashi, and M. Kuroki. 2008. Activation of TGF- β 1 Through Up-Regulation of TSP-1 by Retinoic Acid in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Current Eye Research* 33:199 - 203.
335. Xu, B., P. Liu, J. Li, and H. Lu. All-trans retinoic acid induces Thrombospondin-1 expression in acute promyelocytic leukemia cells through down-regulation of its transcription repressor, c-MYC oncoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* In Press, Accepted Manuscript.
336. Duhant, X., L. Schandene, C. Bruyns, N. S. Gonzalez, M. Goldman, J.-M. Boeynaems, and D. Communi. 2002. Extracellular Adenine Nucleotides Inhibit the Activation of Human CD4+ T Lymphocytes. *J Immunol* 169:15-21.
337. Marteau, F., N. S. Gonzalez, D. Communi, M. Goldman, J.-M. Boeynaems, and D. Communi. 2005. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood* 106:3860-3866.
338. Doyen, V., M. Rubio, D. Braun, T. Nakajima, J. Abe, H. Saito, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2003. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *The Journal of experimental medicine* 198:1277-1283.
339. Agah, A., T. R. Kyriakides, J. Lawler, and P. Bornstein. 2002. The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *Am J Pathol* 161:831-839.
340. DiPietro, L. A., N. N. Nissen, R. L. Gamelli, A. E. Koch, J. M. Pyle, and P. J. Polverini. 1996. Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *Am J Pathol* 148:1851-1860.
341. Roy, S., S. Khanna, C. Rink, S. Biswas, and C. K. Sen. 2008. Characterization of the acute temporal changes in excisional murine cutaneous wound inflammation by screening of the wound-edge transcriptome. *Physiol Genomics* 34:162-184.
342. Morandi, V., S. E. Cherradi, S. Lambert, F. Fauvel-Lafeve, Y. J. Legrand, and C. Legrand. 1994. Proinflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha) down regulate synthesis and secretion of thrombospondin by human endothelial cells. *J Cell Physiol* 160:367-377.
343. Schultz-Cherry, S., and J. Murphy-Ullrich. 1993. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism [published erratum appears in *J Cell Biol* 1993 Sep;122(5):following 1143]. *J. Cell Biol.* 122:923-932.

344. Harpel, J. G., S. Schultz-Cherry, J. E. Murphy-Ullrich, and D. B. Rifkin. 2001. Tamoxifen and estrogen effects on TGF-beta formation: role of thrombospondin-1, alphavbeta3, and integrin-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 284:11-14.
345. Murphy-Ullrich, J. E., and M. Poczatek. 2000. Activation of latent TGF-[beta] by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11:59-69.
346. Forslow, A., Z. Liu, and K. G. Sundqvist. 2007. Receptor communication within the lymphocyte plasma membrane: a role for the thrombospondin family of matricellular proteins. *Cell Mol Life Sci* 64:66-76.
347. Good, D. J., P. J. Polverini, F. Rastinejad, M. M. Le Beau, R. S. Lemons, W. A. Frazier, and N. P. Bouck. 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6624-6628.
348. Tolsma, S. S., O. V. Volpert, D. J. Good, W. A. Frazier, P. J. Polverini, and N. Bouck. 1993. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122:497-511.
349. Volpert, O. V., S. S. Tolsma, S. Pellerin, J. J. Feige, H. Chen, D. F. Mosher, and N. Bouck. 1995. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 217:326-332.
350. Futagami, Y., S. Sugita, J. Vega, K. Ishida, H. Takase, K. Maruyama, H. Aburatani, and M. Mochizuki. 2007. Role of Thrombospondin-1 in T Cell Response to Ocular Pigment Epithelial Cells. *J Immunol* 178:6994-7005.
351. Sekiyama, E., T. Nakamura, L. J. Cooper, S. Kawasaki, J. Hamuro, N. J. Fullwood, and S. Kinoshita. 2006. Unique Distribution of Thrombospondin-1 in Human Ocular Surface Epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47:1352-1358.
352. Miyajima-Uchida, H., H. Hayashi, R. Beppu, M. Kuroki, M. Fukami, F. Arakawa, Y. Tomita, M. Kuroki, and K. Oshima. 2000. Production and Accumulation of Thrombospondin-1 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:561-567.
353. Dong, M., G. Ding, J. Zhou, H. Wang, Y. Zhao, and H. Huang. 2008. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis. *Cell Physiol Biochem* 21:463-472.
354. Chen, C. P., and J. D. Aplin. 2003. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen. *Placenta* 24:316-325.
355. Taylor, A. W. 2009. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol* 85:29-33.
356. Annes, J. P., J. S. Munger, and D. B. Rifkin. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116:217-224.
357. Li, M. O., S. Sanjabi, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
358. Lucas, P. J., S. J. Kim, S. J. Melby, and R. E. Gress. 2000. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. *The Journal of experimental medicine* 191:1187-1196.
359. Li, M. O., Y. Y. Wan, and R. A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26:579-591.
360. Longenecker, G., T. Thyagarajan, C. N. Nagineni, K. C. Flanders, V. Factor, G. Miller, J. M. Ward, A. Nalca, V. M. Rangnekar, S. Thorgeirsson, and A. B. Kulkarni. 2002. Endocrine expression of the active form of TGF-beta1 in the TGF-beta1 null mice fails to ameliorate lethal phenotype. *Cytokine* 18:43-50.
361. Li, M. O., and R. A. Flavell. 2008. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 28:468-476.

362. DeFreitas, M. F., C. K. Yoshida, W. A. Frazier, D. L. Mendrick, R. M. Kypta, and L. F. Reichardt. 1995. Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron* 15:333-343.
363. Guo, N., N. S. Templeton, H. Al-Barazi, J. A. Cashel, J. M. Sipes, H. C. Krutzsch, and D. D. Roberts. 2000. Thrombospondin-1 promotes alpha3beta1 integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 60:457-466.
364. Godyna, S., G. Liao, I. Popa, S. Stefansson, and W. S. Argraves. 1995. Identification of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) as an endocytic receptor for thrombospondin-1. *J Cell Biol* 129:1403-1410.
365. Mikhailenko, I., M. Z. Kounnas, and D. K. Strickland. 1995. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates the cellular internalization and degradation of thrombospondin. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem* 270:9543-9549.
366. Yang, Z., D. K. Strickland, and P. Bornstein. 2001. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 276:8403-8408.
367. Goicoechea, S., M. A. Pallero, P. Eggleton, M. Michalak, and J. E. Murphy-Ullrich. 2002. The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the N-terminal domain of cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 277:37219-37228.
368. Goicoechea, S., A. W. Orr, M. A. Pallero, P. Eggleton, and J. E. Murphy-Ullrich. 2000. Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 275:36358-36368.
369. Li, S. S., A. Forslow, and K. G. Sundqvist. 2005. Autocrine regulation of T cell motility by calreticulin-thrombospondin-1 interaction. *J Immunol* 174:654-661.
370. Murphy-Ullrich, J. E., S. Gurusiddappa, W. A. Frazier, and M. Hook. 1993. Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. *J Biol Chem* 268:26784-26789.
371. Merle, B., L. Malaval, J. Lawler, P. Delmas, and P. Clezardin. 1997. Decorin inhibits cell attachment to thrombospondin-1 by binding to a KKTR-dependent cell adhesive site present within the N-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 67:75-83.
372. Yabkowitz, R., V. Dixit, N. Guo, D. Roberts, and Y. Shimizu. 1993. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 5 beta 1 (VLA-5) integrins. *J Immunol* 151:149-158.
373. Li, Z., M. J. Calzada, J. M. Sipes, J. A. Cashel, H. C. Krutzsch, D. S. Annis, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2002. Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol* 157:509-519.
374. Calzada, M. J., J. M. Sipes, H. C. Krutzsch, P. D. Yurchenco, D. S. Annis, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2003. Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by alpha6beta1 integrin. *J Biol Chem* 278:40679-40687.
375. Schultz-Cherry, S., H. Chen, D. F. Mosher, T. M. Misenheimer, H. C. Krutzsch, D. D. Roberts, and J. E. Murphy-Ullrich. 1995. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem* 270:7304-7310.
376. Ribeiro, S. M., M. Poczatek, S. Schultz-Cherry, M. Villain, and J. E. Murphy-Ullrich. 1999. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 274:13586-13593.
377. 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-[beta]1 In Vivo. *Cell* 93:1159-1170.
378. Guo, N. H., H. C. Krutzsch, E. Negre, T. Vogel, D. A. Blake, and D. D. Roberts. 1992. Heparin- and sulfatide-binding peptides from the type I repeats of human thrombospondin promote melanoma cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3040-3044.

379. Hofsteenge, J., K. G. Huwiler, B. Macek, D. Hess, J. Lawler, D. F. Mosher, and J. Peter-Katalinic. 2001. C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* 276:6485-6498.
380. Asch, A. S., S. Silbiger, E. Heimer, and R. L. Nachman. 1992. Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 182:1208-1217.
381. Tuszynski, G. P., V. L. Rothman, M. Papale, B. K. Hamilton, and J. Eyal. 1993. Identification and characterization of a tumor cell receptor for CSVTCG, a thrombospondin adhesive domain. *J Cell Biol* 120:513-521.
382. Crombie, R., R. L. Silverstein, C. MacLow, S. F. 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. *The Journal of experimental medicine* 187:25-35.
383. Dawson, D. W., O. V. Volpert, S. F. Pearce, A. J. Schneider, R. L. Silverstein, J. Henkin, and N. P. Bouck. 1999. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. *Mol Pharmacol* 55:332-338.
384. Adams, J. C., and J. Lawler. 1993. Diverse mechanisms for cell attachment to platelet thrombospondin. *J Cell Sci* 104 (Pt 4):1061-1071.
385. Sipes, J. M., H. C. Krutzsch, J. Lawler, and D. D. Roberts. 1999. Cooperation between thrombospondin-1 type 1 repeat peptides and alpha(v)beta(3) integrin ligands to promote melanoma cell spreading and focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 274:22755-22762.
386. Chandrasekaran, S., N. H. Guo, R. G. Rodrigues, J. Kaiser, and D. D. Roberts. 1999. Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem* 274:11408-11416.
387. Chandrasekaran, L., C. Z. He, H. Al-Barazi, H. C. Krutzsch, M. L. Iruela-Arispe, and D. D. Roberts. 2000. Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell* 11:2885-2900.
388. Lawler, J., R. Weinstein, and R. O. Hynes. 1988. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol* 107:2351-2361.
389. Dixit, V. M., N. J. Galvin, K. M. O'Rourke, and W. A. Frazier. 1986. Monoclonal antibodies that recognize calcium-dependent structures of human thrombospondin. Characterization and mapping of their epitopes. *J Biol Chem* 261:1962-1968.
390. Isenberg, J. S., L. A. Ridnour, E. M. Perruccio, M. G. Espey, D. A. Wink, and D. D. Roberts. 2005. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13141-13146.
391. Isenberg, J. S., L. A. Ridnour, J. Dimitry, W. A. Frazier, D. A. Wink, and D. D. Roberts. 2006. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 281:26069-26080.
392. Isenberg, J. S., Y. Qin, J. B. Maxhimer, J. M. Sipes, D. Despres, J. Schnermann, W. A. Frazier, and D. D. Roberts. 2009. Thrombospondin-1 and CD47 regulate blood pressure and cardiac responses to vasoactive stress. *Matrix Biol* 28:110-119.
393. Isenberg, J. S., F. Hyodo, K. Matsumoto, M. J. Romeo, M. Abu-Asab, M. Tsokos, P. Kuppasamy, D. A. Wink, M. C. Krishna, and D. D. Roberts. 2007. Thrombospondin-1 limits ischemic tissue survival by inhibiting nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation. *Blood* 109:1945-1952.
394. Isenberg, J. S., W. A. Frazier, and D. D. Roberts. 2008. Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling. *Cell Mol Life Sci* 65:728-742.
395. Isenberg, J. S., D. A. Wink, and D. D. Roberts. 2006. Thrombospondin-1 antagonizes nitric oxide-stimulated vascular smooth muscle cell responses. *Cardiovasc Res* 71:785-793.

396. Isenberg, J. S., S. Shiva, and M. Gladwin. 2009. Thrombospondin-1-CD47 blockade and exogenous nitrite enhance ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis via coupled NO-cGMP pathway activation. *Nitric Oxide*.
397. Graf, R., M. Freyberg, D. Kaiser, and P. Friedl. 2002. Mechanosensitive induction of apoptosis in fibroblasts is regulated by thrombospondin-1 and integrin associated protein (CD47). *Apoptosis* 7:493-498.
398. 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.
399. Huang, X. Z., J. F. Wu, D. Cass, D. J. Erle, D. Corry, S. G. Young, R. V. Farese, Jr., and D. Sheppard. 1996. Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *J Cell Biol* 133:921-928.
400. Chatila, K., G. Ren, Y. Xia, P. Huebener, M. Bujak, and N. G. Frangogiannis. 2007. The role of the thrombospondins in healing myocardial infarcts. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 5:21-27.
401. Ludlow, A., K. O. Yee, R. Lipman, R. Bronson, P. Weinreb, X. Huang, D. Sheppard, and J. Lawler. 2005. Characterization of integrin beta6 and thrombospondin-1 double-null mice. *J Cell Mol Med* 9:421-437.
402. Yang, Z., Z. Mu, B. Dabovic, V. Jurukovski, D. Yu, J. Sung, X. Xiong, and J. S. Munger. 2007. Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J Cell Biol* 176:787-793.
403. Travis, M. A., B. Reizis, A. C. Melton, E. Masteller, Q. Tang, J. M. Proctor, Y. Wang, X. Bernstein, X. Huang, L. F. Reichardt, J. A. Bluestone, and D. Sheppard. 2007. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449:361-365.
404. Lacy-Hulbert, A., A. M. Smith, H. Tissire, M. Barry, D. Crowley, R. T. Bronson, J. T. Roes, J. S. Savill, and R. O. Hynes. 2007. Ulcerative colitis and autoimmunity induced by loss of myeloid alphav integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15823-15828.
405. Ali, N. A., A. A. Gaughan, C. G. Orosz, C. P. Baran, S. McMaken, Y. Wang, T. D. Eubank, M. Hunter, F. J. Lichtenberger, N. A. Flavahan, J. Lawler, and C. B. Marsh. 2008. Latency associated peptide has in vitro and in vivo immune effects independent of TGF-beta1. *PLoS ONE* 3:e1914.
406. Bornstein, P. 2001. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 107:929-934.
407. Vernon-Wilson, E. F., W. J. Kee, A. C. Willis, A. N. Barclay, D. L. Simmons, and M. H. Brown. 2000. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1. *Eur J Immunol* 30:2130-2137.
408. Seiffert, M., P. Brossart, C. Cant, M. Cella, M. Colonna, W. Brugger, L. Kanz, A. Ullrich, and H. J. Buhring. 2001. Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood* 97:2741-2749.
409. Barclay, A. N. 2009. Signal regulatory protein alpha (SIRPalpha)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol*.
410. Barclay, A. N., and M. H. Brown. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 6:457-464.
411. van Beek, E. M., F. Cochrane, A. N. Barclay, and T. K. van den Berg. 2005. Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol* 175:7781-7787.
412. van den Berg, T. K., E. M. van Beek, H. J. Buhring, M. Colonna, M. Hamaguchi, C. J. Howard, M. Kasuga, Y. Liu, T. Matozaki, B. G. Neel, C. A. Parkos, S. Sano, A. Vignery, E. Vivier, M. Wright, R. Zawatzky, and A. N. Barclay. 2005. A nomenclature for signal regulatory protein family members. *J Immunol* 175:7788-7789.

413. Liu, Y., Q. Tong, Y. Zhou, H. W. Lee, J. J. Yang, H. J. Buhring, Y. T. Chen, B. Ha, C. X. Chen, Y. Yang, and K. Zen. 2007. Functional elements on SIRPalpha IgV domain mediate cell surface binding to CD47. *J Mol Biol* 365:680-693.
414. Liu, Y., I. Soto, Q. Tong, A. Chin, H. J. Buhring, T. Wu, K. Zen, and C. A. Parkos. 2005. SIRPbeta1 is expressed as a disulfide-linked homodimer in leukocytes and positively regulates neutrophil transepithelial migration. *J Biol Chem* 280:36132-36140.
415. Fujioka, Y., T. Matozaki, T. Noguchi, A. Iwamatsu, T. Yamao, N. Takahashi, M. Tsuda, T. Takada, and M. Kasuga. 1996. A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol* 16:6887-6899.
416. Oshima, K., A. R. Ruhul Amin, A. Suzuki, M. Hamaguchi, and S. Matsuda. 2002. SHPS-1, a multifunctional transmembrane glycoprotein. *FEBS Lett* 519:1-7.
417. Timms, J. F., K. Carlberg, H. Gu, H. Chen, S. Kamatkar, M. J. Nadler, L. R. Rohrschneider, and B. G. Neel. 1998. Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *Mol Cell Biol* 18:3838-3850.
418. Saginario, C., H. Sterling, C. Beckers, R. Kobayashi, M. Solimena, E. Ullu, and A. Vignery. 1998. MFR, a putative receptor mediating the fusion of macrophages. *Mol Cell Biol* 18:6213-6223.
419. Patel, V., R. E. Smith, A. Serra, G. Brooke, C. J. Howard, and K. P. Rigley. 2002. MyD-1 (SIRPalpha) regulates T cell function in the absence of exogenous danger signals, via a TNFalpha-dependent pathway. *Eur J Immunol* 32:1865-1872.
420. Jiang, P., C. F. Lagenaur, and V. Narayanan. 1999. Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J Biol Chem* 274:559-562.
421. Cant, C. A., and A. Ullrich. 2001. Signal regulation by family conspiracy. *Cell Mol Life Sci* 58:117-124.
422. Yamao, T., T. Matozaki, K. Amano, Y. Matsuda, N. Takahashi, F. Ochi, Y. Fujioka, and M. Kasuga. 1997. Mouse and human SHPS-1: molecular cloning of cDNAs and chromosomal localization of genes. *Biochem Biophys Res Commun* 231:61-67.
423. Kharitonov, A., Z. Chen, I. Sures, H. Wang, J. Schilling, and A. Ullrich. 1997. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 386:181-186.
424. Matozaki, T., Y. Murata, H. Okazawa, and H. Ohnishi. 2009. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19:72-80.
425. Veillette, A., E. Thibaudeau, and S. Latour. 1998. High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *J Biol Chem* 273:22719-22728.
426. Adams, S., L. J. van der Laan, E. Vernon-Wilson, C. Renardel de Lavalette, E. A. Dopp, C. D. Dijkstra, D. L. Simmons, and T. K. van den Berg. 1998. Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells. *J Immunol* 161:1853-1859.
427. Babic, I., A. Schallhorn, F. P. Lindberg, and F. R. Jirik. 2000. SHPS-1 induces aggregation of Ba/F3 pro-B cells via an interaction with CD47. *J Immunol* 164:3652-3658.
428. Barclay, A. N., and D. Hatherley. 2008. The counterbalance theory for evolution and function of paired receptors. *Immunity* 29:675-678.
429. Nakaishi, A., M. Hirose, M. Yoshimura, C. Oneyama, K. Saito, N. Kuki, M. Matsuda, N. Honma, H. Ohnishi, T. Matozaki, M. Okada, and A. Nakagawa. 2008. Structural insight into the specific interaction between murine SHPS-1/SIRP alpha and its ligand CD47. *J Mol Biol* 375:650-660.
430. Hatherley, D., S. C. Graham, J. Turner, K. Harlos, D. I. Stuart, and A. N. Barclay. 2008. Paired receptor specificity explained by structures of signal regulatory proteins alone and complexed with CD47. *Mol Cell* 31:266-277.

431. Hatherley, D., K. Harlos, D. C. Dunlop, D. I. Stuart, and A. N. Barclay. 2007. The structure of the macrophage signal regulatory protein alpha (SIRPalph) inhibitory receptor reveals a binding face reminiscent of that used by T cell receptors. *J Biol Chem* 282:14567-14575.
432. Subramanian, S., R. Parthasarathy, S. Sen, E. T. Boder, and D. E. Discher. 2006. Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRPalph. *Blood* 107:2548-2556.
433. Subramanian, S., E. T. Boder, and D. E. Discher. 2007. Phylogenetic divergence of CD47 interactions with human signal regulatory protein alpha reveals locus of species specificity. Implications for the binding site. *J Biol Chem* 282:1805-1818.
434. Takenaka, K., T. K. Prasolava, J. C. Wang, S. M. Mortin-Toth, S. Khalouei, O. I. Gan, J. E. Dick, and J. S. Danska. 2007. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nature immunology* 8:1313-1323.
435. Chuang, W., and C. F. Lagenaur. 1990. Central nervous system antigen P84 can serve as a substrate for neurite outgrowth. *Dev Biol* 137:219-232.
436. Comu, S., W. Weng, S. Olinsky, P. Ishwad, Z. Mi, J. Hempel, S. Watkins, C. F. Lagenaur, and V. Narayanan. 1997. The murine P84 neural adhesion molecule is SHPS-1, a member of the phosphatase-binding protein family. *J Neurosci* 17:8702-8710.
437. Murata, T., H. Ohnishi, H. Okazawa, Y. Murata, S. Kusakari, Y. Hayashi, M. Miyashita, H. Itoh, P. A. Oldenborg, N. Furuya, and T. Matozaki. 2006. CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. *J Neurosci* 26:12397-12407.
438. Numakawa, T., T. Ishimoto, S. Suzuki, Y. Numakawa, N. Adachi, T. Matsumoto, D. Yokomaku, H. Koshimizu, K. E. Fujimori, R. Hashimoto, T. Taguchi, and H. Kunugi. 2004. Neuronal roles of the integrin-associated protein (IAP/CD47) in developing cortical neurons. *J Biol Chem* 279:43245-43253.
439. Miyashita, M., H. Ohnishi, H. Okazawa, H. Tomonaga, A. Hayashi, T. T. Fujimoto, N. Furuya, and T. Matozaki. 2004. Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: roles of integrins, Rac, and Cdc42. *Mol Biol Cell* 15:3950-3963.
440. Mi, Z. P., P. Jiang, W. L. Weng, F. P. Lindberg, V. Narayanan, and C. F. Lagenaur. 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.
441. Ohnishi, H., Y. Kaneko, H. Okazawa, M. Miyashita, R. Sato, A. Hayashi, K. Tada, S. Nagata, M. Takahashi, and T. Matozaki. 2005. Differential localization of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 and CD47 and its molecular mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 25:2702-2711.
442. Umemori, H., and J. R. Sanes. 2008. Signal Regulatory Proteins (SIRPS) Are Secreted Presynaptic Organizing Molecules. *J Biol Chem* 283:34053-34061.
443. Huang, A. M., H. L. Wang, Y. P. Tang, and E. H. Lee. 1998. Expression of integrin-associated protein gene associated with memory formation in rats. *J Neurosci* 18:4305-4313.
444. Chang, H. P., Y. L. Ma, F. J. Wan, L. Y. Tsai, F. P. Lindberg, and E. H. Lee. 2001. Functional blocking of integrin-associated protein impairs memory retention and decreases glutamate release from the hippocampus. *Neuroscience* 102:289-296.
445. Furusawa, T., N. Yanai, T. Hara, A. Miyajima, and M. Obinata. 1998. Integrin-associated protein (IAP, also termed CD47) is involved in stroma-supported erythropoiesis. *J Biochem* 123:101-106.
446. Ichigotani, Y., S. Matsuda, K. Machida, K. Oshima, T. Iwamoto, K. Yamaki, T. Hayakawa, and M. Hamaguchi. 2000. Molecular cloning of a novel human gene (SIRP-B2) which encodes a new member of the SIRP/SHPS-1 protein family. *J Hum Genet* 45:378-382.

447. Brooke, G., J. D. Holbrook, M. H. Brown, and A. N. Barclay. 2004. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family. *J Immunol* 173:2562-2570.
448. Weerasinghe, D., K. P. McHugh, F. P. Ross, E. J. Brown, R. H. Gisler, and B. A. Imhof. 1998. A role for the alphavbeta3 integrin in the transmigration of monocytes. *J Cell Biol* 142:595-607.
449. Lindberg, F. P., H. D. Gresham, M. I. Reinhold, and E. J. Brown. 1996. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *J Cell Biol* 134:1313-1322.
450. Gao, A. G., F. P. Lindberg, J. M. Dimitry, E. J. Brown, and W. A. Frazier. 1996. Thrombospondin modulates alpha v beta 3 function through integrin-associated protein. *J Cell Biol* 135:533-544.
451. McDonald, J. F., A. Zheleznyak, and W. A. Frazier. 2004. Cholesterol-independent interactions with CD47 enhance alphavbeta3 avidity. *J Biol Chem* 279:17301-17311.
452. Chung, J., A. G. Gao, and W. A. Frazier. 1997. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Biol Chem* 272:14740-14746.
453. Kato, H., S. Honda, H. Yoshida, H. Kashiwagi, M. Shiraga, N. Honma, Y. Kurata, and Y. Tomiyama. 2005. SHPS-1 negatively regulates integrin alphaIIb beta3 function through CD47 without disturbing FAK phosphorylation. *J Thromb Haemost* 3:763-774.
454. Fujimoto, T. T., S. Katsutani, T. Shimomura, and K. Fujimura. 2003. Thrombospondin-bound integrin-associated protein (CD47) physically and functionally modifies integrin alphaIIb beta3 by its extracellular domain. *J Biol Chem* 278:26655-26665.
455. Shimizu, Y., G. A. Van Seventer, K. J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345:250-253.
456. Brittain, J. E., J. Han, K. I. Ataga, E. P. Orringer, and L. V. Parise. 2004. Mechanism of CD47-induced {alpha}4{beta}1 Integrin Activation and Adhesion in Sickle Reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 279:42393-42402.
457. Barazi, H. O., Z. Li, J. A. Cashel, H. C. Krutzsch, D. S. Annis, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2002. Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha v beta 3 and alpha 4 beta 1 integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem* 277:42859-42866.
458. Ticchioni, M., V. Raimondi, L. Lamy, J. Wijdenes, F. P. Lindberg, E. J. Brown, and A. Bernard. 2001. Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow. *FASEB J* 15:341-350.
459. Davis, L., N. Oppenheimer-Marks, J. Bednarczyk, B. McIntyre, and P. Lipsky. 1990. Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules. *J Immunol* 145:785-793.
460. Udagawa, T., D. G. Woodside, and B. W. McIntyre. 1996. Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation. *J Immunol* 157:1965-1972.
461. Schwartz, M. A., E. J. Brown, and B. Fazeli. 1993. A 50-kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 268:19931-19934.
462. Gresham, H. D., J. L. Goodwin, P. M. Allen, D. C. Anderson, and E. J. Brown. 1989. A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp-stimulated neutrophil phagocytosis. *J Cell Biol* 108:1935-1943.
463. Orazizadeh, M., H. S. Lee, B. Groenendijk, S. J. Sadler, M. O. Wright, F. P. Lindberg, and D. M. Salter. 2008. CD47 associates with alpha 5 integrin and regulates responses of human articular chondrocytes to mechanical stimulation in an in vitro model. *Arthritis Res Ther* 10:R4.

464. Chung, J., X. Q. Wang, F. P. Lindberg, and W. A. Frazier. 1999. Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in alpha2beta1-mediated platelet activation. *Blood* 94:642-648.
465. Wang, X. Q., F. P. Lindberg, and W. A. Frazier. 1999. Integrin-associated protein stimulates alpha2beta1-dependent chemotaxis via Gi-mediated inhibition of adenylate cyclase and extracellular-regulated kinases. *J Cell Biol* 147:389-400.
466. Mateo, V., E. J. Brown, G. Biron, M. Rubio, A. Fischer, F. L. Deist, and M. Sarfati. 2002. Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization. *Blood* 100:2882-2890.
467. Mateo, V., L. Lagneaux, D. Bron, G. Biron, M. Armant, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 5:1277-1284.
468. Manna, P. P., J. Dimitry, P. A. Oldenborg, and W. A. Frazier. 2005. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 280:29637-29644.
469. Pettersen, R. D. 2000. CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis* 5:299-306.
470. Lamy, L., M. Ticchioni, A. K. Rouquette-Jazdanian, M. Samson, M. Deckert, A. H. Greenberg, and A. Bernard. 2003. CD47 and the 19 kDa interacting protein-3 (BNIP3) in T cell apoptosis. *J Biol Chem* 278:23915-23921.
471. Pettersen, R. D., K. Hestdal, M. K. Olafsen, S. O. Lie, and F. P. Lindberg. 1999. CD47 signals T cell death. *J Immunol* 162:7031-7040.
472. Bras, M., V. J. Yuste, G. Roue, S. Barbier, P. Sancho, C. Virely, M. Rubio, S. Baudet, J. E. Esquerda, H. Merle-Beral, M. Sarfati, and S. A. Susin. 2007. Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 27:7073-7088.
473. Merle-Beral, H., S. Barbier, G. Roue, M. Bras, M. Sarfati, and S. A. Susin. 2008. Caspase-independent type III PCD: a new means to modulate cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*.
474. Saumet, A., M. B. Slimane, M. Lanotte, J. Lawler, and V. Dubernard. 2005. Type 3 repeat/C-terminal domain of thrombospondin-1 triggers caspase-independent cell death through CD47/alpha2beta3 in promyelocytic leukemia NB4 cells. *Blood* 106:658-667.
475. Johansson, U., K. Higginbottom, and M. Londei. 2004. CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells. *Scand J Immunol* 59:40-49.
476. Friedl, P., P. Vischer, and M. A. Freyberg. 2002. The role of thrombospondin-1 in apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 59:1347-1357.
477. Freyberg, M. A., D. Kaiser, R. Graf, J. Buttenbender, and P. Friedl. 2001. Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1 and the integrin-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 286:141-149.
478. Freyberg, M. A., D. Kaiser, R. Graf, P. Vischer, and P. Friedl. 2000. Integrin-associated protein and thrombospondin-1 as endothelial mechanosensitive death mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 271:584-588.
479. Koshimizu, H., T. Araki, S. Takai, D. Yokomaku, Y. Ishikawa, M. Kubota, S. Sano, H. Hatanaka, and M. Yamada. 2002. Expression of CD47/integrin-associated protein induces death of cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 82:249-257.
480. Xing, C., S. Lee, W. J. Kim, G. Jin, Y. G. Yang, X. Ji, X. Wang, and E. H. Lo. 2009. Role of oxidative stress and caspase 3 in CD47-mediated neuronal cell death. *J Neurochem* 108:430-436.
481. Uno, S., Y. Kinoshita, Y. Azuma, T. Tsunenari, Y. Yoshimura, S. Iida, Y. Kikuchi, H. Yamada-Okabe, and N. Fukushima. 2007. Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. *Oncol Rep* 17:1189-1194.

482. Kikuchi, Y., S. Uno, Y. Yoshimura, K. Otabe, S. Iida, M. Oheda, N. Fukushima, and M. Tsuchiya. 2004. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315:912-918.
483. Demeure, C. E., H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 164:2193-2199.
484. Johansson, U., and M. Londei. 2004. Ligation of CD47 during monocyte differentiation into dendritic cells results in reduced capacity for interleukin-12 production. *Scand J Immunol* 59:50-57.
485. Armant, M., M. N. Avice, P. Hermann, M. Rubio, M. Kiniwa, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *The Journal of experimental medicine* 190:1175-1182.
486. Sick, E., N. Niederhoffer, K. Takeda, Y. Landry, and J. P. Gies. 2009. Activation of CD47 receptors causes histamine secretion from mast cells. *Cell Mol Life Sci* 66:1271-1282.
487. Yu, X., A. Fukunaga, H. Nagai, S. Oniki, N. Honma, M. Ichihashi, T. Matozaki, C. Nishigori, and T. Horikawa. 2006. Engagement of CD47 inhibits the contact hypersensitivity response via the suppression of motility and B7 expression by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 126:797-807.
488. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol* 167:2547-2554.
489. Braun, D., L. Galibert, T. Nakajima, H. Saito, V. V. Quang, M. Rubio, and M. Sarfati. 2006. Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein-alpha ligation and maturation signals. *J Immunol* 177:8550-8559.
490. Smith, R. E., V. Patel, S. D. Seatter, M. R. Deehan, M. H. Brown, G. P. Brooke, H. S. Goodridge, C. J. Howard, K. P. Rigley, W. Harnett, and M. M. Harnett. 2003. A novel MyD-1 (SIRP-1alpha) signaling pathway that inhibits LPS-induced TNFalpha production by monocytes. *Blood* 102:2532-2540.
491. Cameron, C. M., J. W. Barrett, M. Mann, A. Lucas, and G. McFadden. 2005. Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the downregulation of macrophage activation in vivo. *Virology* 337:55-67.
492. Parkinson, J. E., C. M. Sanderson, and G. L. Smith. 1995. The vaccinia virus A38L gene product is a 33-kDa integral membrane glycoprotein. *Virology* 214:177-188.
493. Stanford, M. M., S. J. Werden, and G. McFadden. 2007. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet Res* 38:299-318.
494. Johansen, M. L., and E. J. Brown. 2007. Dual regulation of SIRPalpha phosphorylation by integrins and CD47. *J Biol Chem* 282:24219-24230.
495. Miyake, A., Y. Murata, H. Okazawa, H. Ikeda, Y. Niwayama, H. Ohnishi, Y. Hirata, and T. Matozaki. 2008. Negative regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes Cells* 13:209-219.
496. Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, Y. F. Fang, C. F. Lagenaur, H. D. Gresham, and F. P. Lindberg. 2000. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288:2051-2054.
497. Oldenborg, P. A., H. D. Gresham, and F. P. Lindberg. 2001. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fc gamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *The Journal of experimental medicine* 193:855-862.
498. Subramanian, S., R. Tsai, S. Sen, K. N. Dahl, and D. E. Discher. 2006. Membrane mobility and clustering of Integrin Associated Protein (IAP, CD47)--major differences between mouse and man and implications for signaling. *Blood Cells Mol Dis* 36:364-372.

499. Blazar, B. R., F. P. Lindberg, E. Ingulli, A. Panoskaltis-Mortari, P. A. Oldenborg, K. Iizuka, W. M. Yokoyama, and P. A. Taylor. 2001. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine* 194:541-549.
500. Ishikawa-Sekigami, T., Y. Kaneko, Y. Saito, Y. Murata, H. Okazawa, H. Ohnishi, P. A. Oldenborg, Y. Nojima, and T. Matozaki. 2006. Enhanced phagocytosis of CD47-deficient red blood cells by splenic macrophages requires SHPS-1. *Biochem Biophys Res Commun* 343:1197-1200.
501. Ishikawa-Sekigami, T., Y. Kaneko, H. Okazawa, T. Tomizawa, J. Okajo, Y. Saito, C. Okuzawa, M. Sugawara-Yokoo, U. Nishiyama, H. Ohnishi, T. Matozaki, and Y. Nojima. 2006. SHPS-1 promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages. *Blood* 107:341-348.
502. Annis, A. M., and R. L. Sparrow. 2002. Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci* 27:233-238.
503. Bessos, H., and J. Seghatchian. 2005. Red cell storage lesion: the potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells. *Transfus Apher Sci* 32:227-232.
504. Cartron, J. P. 1999. RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12:655-689.
505. Cherif-Zahar, B., V. Raynal, P. Gane, M. G. Mattei, P. Bailly, B. Gibbs, Y. Colin, and J. P. Cartron. 1996. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nat Genet* 12:168-173.
506. Bruce, L. J., S. Ghosh, M. J. King, D. M. Layton, W. J. Mawby, G. W. Stewart, P. A. Oldenborg, J. Delaunay, and M. J. Tanner. 2002. Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex. *Blood* 100:1878-1885.
507. Mouro-Chanteloup, I., J. Delaunay, P. Gane, V. Nicolas, M. Johansen, E. J. Brown, L. L. Peters, C. L. Van Kim, J. P. Cartron, and Y. Colin. 2003. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47. *Blood* 101:338-344.
508. Arndt, P. A., and G. Garratty. 2004. Rh(null) red blood cells with reduced CD47 do not show increased interactions with peripheral blood monocytes. *Br J Haematol* 125:412-414.
509. Oldenborg, P. A. 2004. Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leuk Lymphoma* 45:1319-1327.
510. Ahrens, N., C. Pagenkopf, H. Kiesewetter, and A. Salama. 2006. CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia. *Transfus Med* 16:397-402.
511. Gardai, S. J., K. A. McPhillips, S. C. Frasch, W. J. Janssen, A. Starefeldt, J. E. Murphy-Ullrich, D. L. Bratton, P. A. Oldenborg, M. Michalak, and P. M. Henson. 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123:321-334.
512. Kinchen, J. M., and K. S. Ravichandran. 2008. Phagocytic signaling: you can touch, but you can't eat. *Curr Biol* 18:R521-524.
513. Okazawa, H., S. Motegi, N. Ohyama, H. Ohnishi, T. Tomizawa, Y. Kaneko, P. A. Oldenborg, O. Ishikawa, and T. Matozaki. 2005. Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. *J Immunol* 174:2004-2011.
514. Gresham, H. D., B. M. Dale, J. W. Potter, P. W. Chang, C. M. Vines, C. A. Lowell, C. F. Lagenaur, and C. L. Willman. 2000. Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr. *The Journal of experimental medicine* 191:515-528.

515. Yamao, T., T. Noguchi, O. Takeuchi, U. Nishiyama, H. Morita, T. Hagiwara, H. Akahori, T. Kato, K. Inagaki, H. Okazawa, Y. Hayashi, T. Matozaki, K. Takeda, S. Akira, and M. Kasuga. 2002. Negative regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. *J Biol Chem* 277:39833-39839.
516. van den Berg, T. K., and C. E. van der Schoot. 2008. Innate immune 'self' recognition: a role for CD47-SIRPalpha interactions in hematopoietic stem cell transplantation. *Trends Immunol* 29:203-206.
517. Ikeda, H., H. Okazawa, H. Ohnishi, Y. Murata, P. A. Oldenburg, and T. Matozaki. 2006. Mutational analysis of the mechanism of negative regulation by SRC homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 of phagocytosis in macrophages. *J Immunol* 177:3123-3132.
518. Tsai, R. K., and D. E. Discher. 2008. Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J Cell Biol* 180:989-1003.
519. Ide, K., H. Wang, H. Tahara, J. Liu, X. Wang, T. Asahara, M. Sykes, Y. G. Yang, and H. Ohdan. 2007. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5062-5066.
520. Wang, H., M. L. Madariaga, S. Wang, N. Van Rooijen, P. A. Oldenburg, and Y. G. Yang. 2007. Lack of CD47 on nonhematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47null cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13744-13749.
521. Janssen, W. J., K. A. McPhillips, M. G. Dickinson, D. J. Linderman, K. Morimoto, Y. Q. Xiao, K. M. Oldham, R. W. Vandivier, P. M. Henson, and S. J. Gardai. 2008. Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha. *Am J Respir Crit Care Med* 178:158-167.
522. Nilsson, A., and P. A. Oldenburg. 2009. CD47 promotes both phosphatidylserine-independent and phosphatidylserine-dependent phagocytosis of apoptotic murine thymocytes by non-activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*.
523. Han, X., H. Sterling, Y. Chen, C. Saginario, E. J. Brown, W. A. Frazier, F. P. Lindberg, and A. Vignery. 2000. CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation. *J Biol Chem* 275:37984-37992.
524. Lundberg, P., C. Koskinen, P. A. Baldock, H. Lothgren, A. Stenberg, U. H. Lerner, and P. A. Oldenburg. 2007. Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRPalpha-interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 352:444-448.
525. Vignery, A. 2000. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 81:291-304.
526. Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343:170-173.
527. Savill, J., N. Hogg, Y. Ren, and C. Haslett. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90:1513-1522.
528. Ren, Y., and J. Savill. 1995. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *J Immunol* 154:2366-2374.
529. Stern, M., J. Savill, and C. Haslett. 1996. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol* 149:911-921.
530. Van Strijp, J. A., D. G. Russell, E. Tuomanen, E. J. Brown, and S. D. Wright. 1993. Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, alpha m beta 2, Mac-1). Indirect effects of an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. *J Immunol* 151:3324-3336.
531. Blystone, S. D., F. P. Lindberg, S. E. LaFlamme, and E. J. Brown. 1995. Integrin beta 3 cytoplasmic tail is necessary and sufficient for regulation of alpha 5 beta 1 phagocytosis by alpha v beta 3 and integrin-associated protein. *J Cell Biol* 130:745-754.

532. Capo, C., F. P. Lindberg, S. Meconi, Y. Zaffran, G. Tardei, E. J. Brown, D. Raoult, and J. L. Mege. 1999. Subversion of monocyte functions by *coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin and CR3. *J Immunol* 163:6078-6085.
533. Ishibashi, Y., S. Claus, and D. A. Relman. 1994. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine* 180:1225-1233.
534. Zhou, M., and E. J. Brown. 1993. Leukocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *The Journal of experimental medicine* 178:1165-1174.
535. Hermann, P., M. Armant, E. Brown, M. Rubio, H. Ishihara, D. Ulrich, R. G. Caspary, F. P. Lindberg, R. Armitage, C. Maliszewski, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. The vitronectin receptor and its associated CD47 molecule mediates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes by interaction with soluble CD23. *J Cell Biol* 144:767-775.
536. 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* 155:4868-4875.
537. Armant, M., H. Ishihara, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1994. Regulation of cytokine production by soluble CD23: costimulation of interferon gamma secretion and triggering of tumor necrosis factor alpha release. *The Journal of experimental medicine* 180:1005-1011.
538. Sarfati, M., G. Fortin, M. Raymond, and S. Susin. 2008. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling. *Curr Drug Targets* 9:842-850.
539. Shinohara, M., N. Ohyama, Y. Murata, H. Okazawa, H. Ohnishi, O. Ishikawa, and T. Matozaki. 2006. CD47 regulation of epithelial cell spreading and migration, and its signal transduction. *Cancer Sci* 97:889-895.
540. Cooper, D., F. P. Lindberg, J. R. Gamble, E. J. Brown, and M. A. Vadas. 1995. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3978-3982.
541. Liu, Y., H. J. Buhning, K. Zen, S. L. Burst, F. J. Schnell, I. R. Williams, and C. A. Parkos. 2002. Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem* 277:10028-10036.
542. Liu, Y., M. B. O'Connor, K. J. Mandell, K. Zen, A. Ullrich, H. J. Buhning, and C. A. Parkos. 2004. Peptide-mediated inhibition of neutrophil transmigration by blocking CD47 interactions with signal regulatory protein alpha. *J Immunol* 172:2578-2585.
543. Parkos, C. A., S. P. Colgan, T. W. Liang, A. Nusrat, A. E. Bacarra, D. K. Carnes, and J. L. Madara. 1996. CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 132:437-450.
544. Narizhneva, N. V., O. V. Razorenova, E. A. Podrez, J. Chen, U. M. Chandrasekharan, P. E. DiCorleto, E. F. Plow, E. J. Topol, and T. V. Byzova. 2005. Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB J* 19:1158-1160.
545. Hagnerud, S., P. P. Manna, M. Cella, A. Stenberg, W. A. Frazier, M. Colonna, and P. A. Oldenborg. 2006. Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. *J Immunol* 176:5772-5778.
546. Van, V. Q., S. Lesage, S. Bouguermouh, P. Gautier, M. Rubio, M. Levesque, S. Nguyen, L. Galibert, and M. Sarfati. 2006. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* 25:5560-5568.
547. de Vries, H. E., J. J. Hendriks, H. Honing, C. R. De Lavalette, S. M. van der Pol, E. Hooijberg, C. D. Dijkstra, and T. K. van den Berg. 2002. Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol* 168:5832-5839.

548. Rosseau, S., J. Selhorst, K. Wiechmann, K. Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2000. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164:427-435.
549. Liu, D. Q., L. M. Li, Y. L. Guo, R. Bai, C. Wang, Z. Bian, C. Y. Zhang, and K. Zen. 2008. Signal regulatory protein alpha negatively regulates beta2 integrin-mediated monocyte adhesion, transendothelial migration and phagocytosis. *PLoS ONE* 3:e3291.
550. Liu, S. Q., P. K. Alkema, C. Tieche, B. J. Tefft, D. Z. Liu, Y. C. Li, B. E. Sumpio, J. A. Caprini, and M. Paniagua. 2005. Negative regulation of monocyte adhesion to arterial elastic laminae by signal regulatory protein alpha and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-1. *J Biol Chem* 280:39294-39301.
551. 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)beta3 and alpha4beta1 integrins regulates lymphocyte migration on vascular cell adhesion molecule 1. *Eur J Immunol* 27:3242-3252.
552. 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.
553. Zen, K., and C. A. Parkos. 2003. Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol* 15:557-564.
554. Chin, A. C., and C. A. Parkos. 2006. Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD: potential targets for inhibiting neutrophil trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 1072:276-287.
555. Zemans, R. L., S. P. Colgan, and G. P. Downey. 2009. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:519-535.
556. Liu, Y., D. Merlin, S. L. Burst, M. Pochet, J. L. Madara, and C. A. Parkos. 2001. The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. *J Biol Chem* 276:40156-40166.
557. Gresham, H. D., S. P. Adams, and E. J. Brown. 1992. Ligand binding specificity of the leukocyte response integrin expressed by human neutrophils. *J Biol Chem* 267:13895-13902.
558. Senior, R. M., H. D. Gresham, G. L. Griffin, E. J. Brown, and A. E. Chung. 1992. Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leukocyte response integrin. *J Clin Invest* 90:2251-2257.
559. Stefanidakis, M., G. Newton, W. Y. Lee, C. A. Parkos, and F. W. Luscinskas. 2008. Endothelial CD47 interaction with SIRPgamma is required for human T-cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro. *Blood* 112:1280-1289.
560. Rebres, R. A., K. Kajihara, and E. J. Brown. 2005. Novel CD47-dependent intercellular adhesion modulates cell migration. *J Cell Physiol* 205:182-193.
561. Weinstat-Saslow, D. L., V. S. Zabrenetzky, K. VanHoutte, W. A. Frazier, D. D. Roberts, and P. S. Steeg. 1994. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res* 54:6504-6511.
562. Yoshida, H., Y. Tomiyama, K. Oritani, Y. Murayama, J. Ishikawa, H. Kato, J. Miyagawa Ji, N. Honma, T. Nishiura, and Y. Matsuzawa. 2002. Interaction between Src homology 2 domain bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1 and CD47 mediates the adhesion of human B lymphocytes to nonactivated endothelial cells. *J Immunol* 168:3213-3220.
563. Yoshida, H., Y. Tomiyama, J. Ishikawa, K. Oritani, I. Matsumura, M. Shiraga, T. Yokota, Y. Okajima, M. Ogawa, J. Miyagawa, T. Nishiura, and Y. Matsuzawa. 2000. Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42. *Blood* 96:234-241.

564. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 165:4624-4631.
565. Avice, M. N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *J Immunol* 167:2459-2468.
566. Li, Z., L. He, K. E. Wilson, and D. D. Roberts. 2001. Thrombospondin-1 Inhibits TCR-Mediated T Lymphocyte Early Activation. *J Immunol* 166:2427-2436.
567. Waclavicek, M., O. Majdic, T. Stulnig, M. Berger, T. Baumruker, W. Knapp, and W. F. Pickl. 1997. T cell stimulation via CD47: agonistic and antagonistic effects of CD47 monoclonal antibody 1/1A4. *J Immunol* 159:5345-5354.
568. Ticchioni, M., M. Deckert, F. Mary, G. Bernard, E. J. Brown, and A. Bernard. 1997. Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. *J Immunol* 158:677-684.
569. 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. *The Journal of experimental medicine* 185:1-11.
570. Vallejo, A. N., L. O. Mugge, P. A. Klimiuk, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy. 2000. Central Role of Thrombospondin-1 in the Activation and Clonal Expansion of Inflammatory T Cells. *J Immunol* 164:2947-2954.
571. Li, S. S., A. Ivanoff, S. E. Bergstrom, A. Sandstrom, B. Christensson, J. van Nerven, J. Holgersson, D. Hauzenberger, I. Arencibia, and K. G. Sundqvist. 2002. T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur J Immunol* 32:1069-1079.
572. Li, S. S., Z. Liu, M. Uzunel, and K. G. Sundqvist. 2006. Endogenous thrombospondin-1 is a cell-surface ligand for regulation of integrin-dependent T-lymphocyte adhesion. *Blood* 108:3112-3120.
573. Okajo, J., Y. Kaneko, Y. Murata, T. Tomizawa, C. Okuzawa, Y. Saito, T. Ishikawa-Sekigami, H. Okazawa, H. Ohnishi, T. Matozaki, and Y. Nojima. 2007. Regulation by Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 of alpha-galactosylceramide-induced antimetastatic activity and Th1 and Th2 responses of NKT cells. *J Immunol* 178:6164-6172.
574. Brooke, G. P., K. R. Parsons, and C. J. Howard. 1998. Cloning of two members of the SIRP alpha family of protein tyrosine phosphatase binding proteins in cattle that are expressed on monocytes and a subpopulation of dendritic cells and which mediate binding to CD4 T cells. *Eur J Immunol* 28:1-11.
575. Piccio, L., W. Vermi, K. S. Boles, A. Fuchs, C. A. Strader, F. Facchetti, M. Cella, and M. Colonna. 2005. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* 105:2421-2427.
576. Bouguermouh, S., V. Q. Van, J. Martel, P. Gautier, M. Rubio, and M. Sarfati. 2008. CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response. *J Immunol* 180:8073-8082.
577. Hosken, N. A., K. Shibuya, A. W. Heath, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *The Journal of experimental medicine* 182:1579-1584.
578. Ise, W., M. Totsuka, Y. Sogawa, A. Ametani, S. Hachimura, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu, and S. Kaminogawa. 2002. Naive CD4+ T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J Immunol* 168:3242-3250.
579. Constant, S., C. Pfeiffer, A. Woodard, T. Pasqualini, and K. Bottomly. 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 182:1591-1596.

580. Constant, S. L., and K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15:297-322.
581. Tao, X., C. Grant, S. Constant, and K. Bottomly. 1997. Induction of IL-4-producing CD4⁺ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J Immunol* 158:4237-4244.
582. Nguyen, K., N. R. Sylvain, and S. C. Bunnell. 2008. T Cell Costimulation via the Integrin VLA-4 Inhibits the Actin-Dependent Centralization of Signaling Microclusters Containing the Adaptor SLP-76. *Immunity* 28:810-821.
583. Morgan, R., G. Gao, J. Pawling, J. W. Dennis, M. Demetriou, and B. Li. 2004. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol* 173:7200-7208.
584. Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin, and J. W. Dennis. 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409:733-739.
585. Lamy, L., A. Foussat, E. J. Brown, P. Bornstein, M. Ticchioni, and A. Bernard. 2007. Interactions between CD47 and Thrombospondin Reduce Inflammation. *J Immunol* 178:5930-5939.
586. Fukunaga, A., H. Nagai, T. Noguchi, H. Okazawa, T. Matozaki, X. Yu, C. F. Lagenaur, N. Honma, M. Ichihashi, M. Kasuga, C. Nishigori, and T. Horikawa. 2004. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the migration of Langerhans cells from the epidermis to draining lymph nodes. *J Immunol* 172:4091-4099.
587. Motegi, S. I., H. Okazawa, Y. Murata, Y. Kanazawa, Y. Saito, H. Kobayashi, H. Ohnishi, P. A. Oldenborg, O. Ishikawa, and T. Matozaki. 2008. Essential roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin. *Immunol Lett* 121:52-60.
588. Fukunaga, A., H. Nagai, X. Yu, S. Oniki, H. Okazawa, S. Motegi, R. Suzuki, N. Honma, T. Matozaki, C. Nishigori, and T. Horikawa. 2006. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the induction of Langerhans cell maturation. *Eur J Immunol* 36:3216-3226.
589. Kaplan, D. H., M. C. Jenison, S. Saeland, W. D. Shlomchik, and M. J. Shlomchik. 2005. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23:611-620.
590. Fukunaga, A., N. M. Khaskhely, C. S. Sreevidya, S. N. Byrne, and S. E. Ullrich. 2008. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol* 180:3057-3064.
591. Chen, Y., C. L. Langrish, B. McKenzie, B. Joyce-Shaikh, J. S. Stumhofer, T. McClanahan, W. Blumenschein, T. Churakovsa, J. Low, L. Presta, C. A. Hunter, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2006. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116:1317-1326.
592. Zhu, C., A. C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S. J. Khoury, X. X. Zheng, T. B. Strom, and V. K. Kuchroo. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature immunology* 6:1245-1252.
593. Sabatos, C. A., S. Chakravarti, E. Cha, A. Schubart, A. Sanchez-Fueyo, X. X. Zheng, A. J. Coyle, T. B. Strom, G. J. Freeman, and V. K. Kuchroo. 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nature immunology* 4:1102-1110.
594. Sanchez-Fueyo, A., J. Tian, D. Picarella, C. Domenig, X. X. Zheng, C. A. Sabatos, N. Manlongat, O. Bender, T. Kamradt, V. K. Kuchroo, J. C. Gutierrez-Ramos, A. J. Coyle, and T. B. Strom. 2003. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature immunology* 4:1093-1101.
595. Wang, F., W. He, J. Yuan, K. Wu, H. Zhou, W. Zhang, and Z. K. Chen. 2008. Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts. *Transpl Immunol* 19:12-19.
596. Sehrawat, S., A. Suryawanshi, M. Hirashima, and B. T. Rouse. 2009. Role of Tim-3/Galectin-9 Inhibitory Interaction in Viral-Induced Immunopathology: Shifting the Balance toward Regulators. *J Immunol* 182:3191-3201.

597. Wang, F., L. Wan, C. Zhang, X. Zheng, J. Li, and Z. K. Chen. 2009. Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Immunobiology* 214:342-349.
598. Cai, G., A. Anumanthan, J. A. Brown, E. A. Greenfield, B. Zhu, and G. J. Freeman. 2008. CD160 inhibits activation of human CD4⁺ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature immunology* 9:176-185.
599. Murphy, K. M., C. A. Nelson, and J. R. Sedy. 2006. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol* 6:671-681.
600. Watanabe, N., M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison, and K. M. Murphy. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature immunology* 4:670-679.
601. Tao, R., L. Wang, K. M. Murphy, C. C. Fraser, and W. W. Hancock. 2008. Regulatory T cell expression of herpesvirus entry mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells. *J Immunol* 180:6649-6655.
602. Liu, X., M. Alexiou, N. Martin-Orozco, Y. Chung, R. I. Nurieva, L. Ma, Q. Tian, G. Kollias, S. Lu, D. Graf, and C. Dong. 2009. Cutting edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction. *J Immunol* 182:4516-4520.
603. Sedy, J. R., M. Gavrieli, K. G. Potter, M. A. Hurchla, R. C. Lindsley, K. Hildner, S. Scheu, K. Pfeffer, C. F. Ware, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2005. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature immunology* 6:90-98.
604. Krummel, M. F., and J. P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine* 182:459-465.
605. Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone, and A. H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
606. Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson, and J. A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
607. Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser, and T. W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 270:985-988.
608. Keir, M. E., M. J. Butte, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677-704.
609. Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111-122.
610. Taylor, P. A., C. J. Lees, S. Fournier, J. P. Allison, A. H. Sharpe, and B. R. Blazar. 2004. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. *J Immunol* 172:34-39.
611. Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10398-10403.
612. Yi, K. H., and L. Chen. 2009. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunological reviews* 229:145-151.
613. Suh, W. K., B. U. Gajewska, H. Okada, M. A. Gronski, E. M. Bertram, W. Dawicki, G. S. Duncan, J. Bukczynski, S. Plyte, A. Elia, A. Wakeham, A. Itie, S. Chung, J. Da Costa, S. Arya, T. Horan, P. Campbell, K. Gaida, P. S. Ohashi, T. H. Watts, S. K. Yoshinaga, M. R. Bray, M. Jordana, and T. W. Mak. 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nature immunology* 4:899-906.

614. Prasad, D. V., T. Nguyen, Z. Li, Y. Yang, J. Duong, Y. Wang, and C. Dong. 2004. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J Immunol* 173:2500-2506.
615. Prasad, D. V., S. Richards, X. M. Mai, and C. Dong. 2003. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity* 18:863-873.
616. Sica, G. L., I. H. Choi, G. Zhu, K. Tamada, S. D. Wang, H. Tamura, A. I. Chapoval, D. B. Flies, J. Bajorath, and L. Chen. 2003. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 18:849-861.
617. Zang, X., P. Loke, J. Kim, K. Murphy, R. Waitz, and J. P. Allison. 2003. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10388-10392.
618. Yang, Y., X. K. Liu, T. Nguyen, C. Bishop, D. Graf, and C. Dong. 2007. Characterization of B7S3 as a novel negative regulator of T cells. *J Immunol* 178:3661-3667.
619. Vogt, L., N. Schmitz, M. O. Kurrer, M. Bauer, H. I. Hinton, S. Behnke, D. Gatto, P. Sebbel, R. R. Beerli, I. Sonderegger, M. Kopf, P. Saudan, and M. F. Bachmann. 2006. VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. *J Clin Invest* 116:2817-2826.
620. Nguyen, T., X. K. Liu, Y. Zhang, and C. Dong. 2006. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol* 176:7354-7360.
621. Arnett, H. A., S. S. Escobar, E. Gonzalez-Suarez, A. L. Budelsky, L. A. Steffen, N. Boiani, M. Zhang, G. Siu, A. W. Brewer, and J. L. Viney. 2007. BTNL2, a butyrophilin/B7-like molecule, is a negative costimulatory molecule modulated in intestinal inflammation. *J Immunol* 178:1523-1533.
622. Fife, B. T., and J. A. Bluestone. 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological reviews* 224:166-182.
623. Oldenborg, P. A., H. D. Gresham, Y. Chen, S. Izui, and F. P. Lindberg. 2002. Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* 99:3500-3504.
624. Baxter, A. G., and T. E. Mandel. 1991. Hemolytic anemia in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol* 21:2051-2055.
625. Van, V. Q., J. Darwiche, M. Raymond, S. Lesage, S. Bouguermouh, M. Rubio, and M. Sarfati. 2008. Cutting edge: CD47 controls the in vivo proliferation and homeostasis of peripheral CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells that express CD103. *J Immunol* 181:5204-5208.
626. Vanshree Patel, Rosemary E. S., Alessandro Serra, Gareth Brooke, Christopher J. Howard, Kevin P. Rigley,. 2002. MyD-1 (SIRP&agr;) regulates T cell function in the absence of exogenous danger signals, via a TNF&agr;-dependent pathway. *European Journal of Immunology* 32:1865-1872.
627. Yu, X., K. Harden, L. C. Gonzalez, M. Francesco, E. Chiang, B. Irving, I. Tom, S. Ivelja, C. J. Refino, H. Clark, D. Eaton, and J. L. Grogan. 2009. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology* 10:48-57.
628. O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7:425-428.
629. Chang, H. D., C. Helbig, L. Tykocinski, S. Kreher, J. Koeck, U. Niesner, and A. Radbruch. 2007. Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *Eur J Immunol* 37:807-817.
630. Assenmacher, M., M. Lohning, A. Scheffold, A. Richter, S. Miltenyi, J. Schmitz, and A. Radbruch. 1998. Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4. *J Immunol* 161:2825-2832.
631. Bouguermouh, S., G. Fortin, N. Baba, M. Rubio, and M. Sarfati. 2009. CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PLoS ONE* 4:e5087.

632. Dong, C., A. E. Juedes, U.-A. Temann, S. Shresta, J. P. Allison, N. H. Ruddle, and R. A. Flavell. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409:97-101.
633. Dong, C., and R. I. Nurieva. 2003. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *Journal of Autoimmunity* 21:255-260.
634. Galicia, G., A. Kasran, C. Uyttenhove, K. De Swert, J. Van Snick, and J. L. Ceuppens. 2009. ICOS Deficiency Results in Exacerbated IL-17 Mediated Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Clin Immunol*.
635. Kryczek, I., S. Wei, L. Vatan, J. Escara-Wilke, W. Szeliga, E. T. Keller, and W. Zou. 2007. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J Immunol* 179:1423-1426.
636. Yagi, J., Y. Arimura, H. Takatori, H. Nakajima, I. Iwamoto, and T. Uchiyama. 2006. Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4+ T cells. *Int Immunol* 18:1681-1690.
637. Chen, Z., A. Laurence, Y. Kanno, M. Pacher-Zavisin, B. M. Zhu, C. Tato, A. Yoshimura, L. Hennighausen, and J. J. O'Shea. 2006. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8137-8142.
638. Takatori, H., H. Nakajima, S. Kagami, K. Hirose, A. Suto, K. Suzuki, M. Kubo, A. Yoshimura, Y. Saito, and I. Iwamoto. 2005. Stat5a inhibits IL-12-induced Th1 cell differentiation through the induction of suppressor of cytokine signaling 3 expression. *J Immunol* 174:4105-4112.
639. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454-465.
640. Qin, H., L. Wang, T. Feng, C. O. Elson, S. A. Niyongere, S. J. Lee, S. L. Reynolds, C. T. Weaver, K. Roarty, R. Serra, E. N. Benveniste, and Y. Cong. 2009. TGF- β Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of SOCS3. *J Immunol* 183:97-105.
641. Wong, P. K., P. J. Egan, B. A. Croker, K. O'Donnell, N. A. Sims, S. Drake, H. Kiu, E. J. McManus, W. S. Alexander, A. W. Roberts, and I. P. Wicks. 2006. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 116:1571-1581.
642. Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots, and I. Joosten. 2008. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112:2340-2352.
643. Kitani, A., and L. Xu. 2008. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1:S43-46.
644. Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan, and A. N. Akbar. 2006. Human CD4+ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 116:2423-2433.
645. Zhang, X. L., J. Peng, J. Z. Sun, J. J. Liu, C. S. Guo, Z. G. Wang, Y. Yu, Y. Shi, P. Qin, S. G. Li, L. N. Zhang, and M. Hou. 2009. De novo induction of platelet-specific CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from CD4(+)CD25(-) cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 113:2568-2577.
646. Li, R., N. Perez, S. Karumuthil-Meilethil, B. S. Prabhakar, M. J. Holterman, and C. Vasu. 2007. Enhanced Engagement of CTLA-4 Induces Antigen-Specific CD4+CD25+Foxp3+ and CD4+CD25 TGF- β 1+ Adaptive Regulatory T Cells. *J Immunol* 179:5191-5203.
647. Bornstein, P., A. Agah, and T. R. Kyriakides. 2004. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1115-1125.
648. Bornstein, P., and E. H. Sage. 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14:608-616.
649. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.

650. I-Ming Jou, A.-L. S., Shih-Yao Chen, Chrong-Reen Wang, Dar-Bin Shieh, Ching-Shan Tsai, Chao-Liang Wu. 2005. Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 52:339-344.
651. Koch, A. E., J. Friedman, J. C. Burrows, G. K. Haines, and N. P. Bouck. 1993. Localization of the angiogenesis inhibitor thrombospondin in human synovial tissues. *Pathobiology* 61:1-6.
652. Salajegheh, M., R. Raju, J. Schmidt, and M. C. Dalakas. 2007. Upregulation of thrombospondin-1(TSP-1) and its binding partners, CD36 and CD47, in sporadic inclusion body myositis. *J Neuroimmunol* 187:166-174.
653. Velasco, P., R. Huegel, J. Brasch, J. M. Schroder, M. Weichenthal, E. Stockfleth, T. Schwarz, J. Lawler, M. Detmar, and B. Lange-Asschenfeldt. 2009. The Angiogenesis Inhibitor Thrombospondin-1 Inhibits Acute Cutaneous Hypersensitivity Reactions. *J Invest Dermatol*.
654. Frangogiannis, N. G., G. Ren, O. Dewald, P. Zymek, S. Haudek, A. Koerting, K. Winkelmann, L. H. Michael, J. Lawler, and M. L. Entman. 2005. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation* 111:2935-2942.
655. Schellings, M. W., Y. M. Pinto, and S. Heymans. 2004. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res* 64:24-31.
656. Ng, T., B. Turpie, and S. Masli. 2009. Thrombospondin-1 mediated regulation of microglia activation after retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
657. Leung, L. L. 1984. Role of thrombospondin in platelet aggregation. *J Clin Invest* 74:1764-1772.
658. Mansfield, P., and S. Suchard. 1994. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 153:4219-4229.
659. Mansfield, P. J., L. A. Boxer, and S. J. Suchard. 1990. Thrombospondin stimulates motility of human neutrophils. *J Cell Biol* 111:3077-3086.
660. Mansfield, P. J., and S. J. Suchard. 1993. Thrombospondin promotes both chemotaxis and haptotaxis in neutrophil-like HL-60 cells. *J Immunol* 150:1959-1970.
661. Silverstein, R. L., and R. L. Nachman. 1987. Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* 79:867-874.
662. Silverstein, R. L., A. S. Asch, and R. L. Nachman. 1989. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J Clin Invest* 84:546-552.
663. Kirsch, T., A. Woywodt, J. Klose, K. Wyss, M. Beese, U. Erdbruegger, M. Grossheim, H. Haller, and M. Haubitz. 2009. Endothelial-derived thrombospondin-1 promotes macrophage recruitment and apoptotic cell clearance. *J Cell Mol Med*.
664. Janabi, M., S. Yamashita, K. Hirano, N. Sakai, H. Hiraoka, K. Matsumoto, Z. Zhang, S. Nozaki, and Y. Matsuzawa. 2000. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1953-1960.
665. Udagwa, T., D. Woodside, and B. McIntyre. 1996. Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation. *J Immunol* 157:1965-1972.
666. Damle, N. K., and A. Aruffo. 1991. Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4+T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:6403-6407.
667. Mittelbrunn, M. a., A. Molina, M. a. M. Escribese, M. a. YÃ±ez-MÃ³, E. Escudero, Ã. n. Ursa, R. Tejedor, F. Mampaso, and F. SÃ¡nchez-Madrid. 2004. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11058-11063.

668. Yang, K., J. L. Vega, M. Hadzipasic, J. P. Schatzmann Peron, B. Zhu, Y. Carrier, S. Masli, L. V. Rizzo, and H. L. Weiner. 2009. Deficiency of thrombospondin-1 reduces Th17 differentiation and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 32:94-103.
669. DiPietro, L. A., and P. J. Polverini. 1993. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *Am J Pathol* 143:678-684.
670. Masli, S., B. Turpie, and J. W. Streilein. 2006. Thrombospondin orchestrates the tolerance-promoting properties of TGF β -treated antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 18:689-699.
671. Yehualaeshet, T., R. O'Connor, J. Green-Johnson, S. Mai, R. Silverstein, J. E. Murphy-Ullrich, and N. Khalil. 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.
672. Krispin, A., Y. Bledi, M. Atallah, U. Trahtemberg, I. Verbovetski, E. Nahari, O. Zelig, M. Linial, and D. Mevorach. 2006. Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. *Blood* 108:3580-3589.
673. Lange-Asschenfeldt, B., W. Weninger, P. Velasco, T. R. Kyriakides, U. H. von Andrian, P. Bornstein, and M. Detmar. 2002. Increased and prolonged inflammation and angiogenesis in delayed-type hypersensitivity reactions elicited in the skin of thrombospondin-2--deficient mice. *Blood* 99:538-545.
674. Bauer, M., C. Brakebusch, C. Coisne, M. Sixt, H. Wekerle, B. Engelhardt, and R. Fassler. 2009. Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1920-1925.
675. Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung, and F. P. Lindberg. 2000. Survival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* 164:3713-3722.
676. Su, X., M. Johansen, M. R. Looney, E. J. Brown, and M. A. Matthay. 2008. CD47 deficiency protects mice from lipopolysaccharide-induced acute lung injury and Escherichia coli pneumonia. *J Immunol* 180:6947-6953.
677. Verdrengh, M., F. P. Lindberg, C. Ryden, and A. Tarkowski. 1999. Integrin-associated protein (IAP)-deficient mice are less susceptible to developing Staphylococcus aureus-induced arthritis. *Microbes Infect* 1:745-751.
678. Tolsma, S. S., M. S. Stack, and N. Bouck. 1997. Lumen formation and other angiogenic activities of cultured capillary endothelial cells are inhibited by thrombospondin-1. *Microvasc Res* 54:13-26.
679. Isenberg, J. S., D. D. Roberts, and W. A. Frazier. 2008. CD47: a new target in cardiovascular therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:615-621.
680. Rico, M. C., J. L. Castaneda, J. M. Manns, A. B. Uknis, I. M. Sainz, F. F. Safadi, S. N. Popoff, and R. A. Dela Cadena. 2007. Amelioration of inflammation, angiogenesis and CTGF expression in an arthritis model by a TSP1-derived peptide treatment. *J Cell Physiol* 211:504-512.
681. Park, Y. W., Y. M. Kang, J. Butterfield, M. Detmar, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand. 2004. Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 165:2087-2098.
682. Wilson, K. E., Z. Li, M. Kara, K. L. Gardner, and D. D. Roberts. 1999. β 1 Integrin- and Proteoglycan-Mediated Stimulation of T Lymphoma Cell Adhesion and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling by Thrombospondin-1 and Thrombospondin-1 Peptides. *J Immunol* 163:3621-3628.
683. Pierson, B. A., K. Gupta, W. S. Hu, and J. S. Miller. 1996. Human natural killer cell expansion is regulated by thrombospondin-mediated activation of transforming growth factor-beta 1 and independent accessory cell-derived contact and soluble factors. *Blood* 87:180-189.

684. Beppu, R., K. Nakamura, H. Miyajima-Uchida, M. Kuroki, P. D. Khare, Y. Yamauchi, Y. Yamashita, T. Shirakusa, and M. Kuroki. 2001. SOLUBLE THROMBOSPONDIN-1 SUPPRESSES T CELL PROLIFERATION AND ENHANCES IL-10 SECRETION BY ANTIGEN PRESENTING CELLS STIMULATED WITH PHYTOHEMAGGLUTININ. *Immunological Investigations* 30:143 - 156.
685. Riessen, R., M. Kearney, J. Lawler, and J. M. Isner. 1998. Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *Am Heart J* 135:357-364.
686. Seki, M., S. Oomizu, K. M. Sakata, A. Sakata, T. Arikawa, K. Watanabe, K. Ito, K. Takeshita, T. Niki, N. Saita, N. Nishi, A. Yamauchi, S. Katoh, A. Matsukawa, V. Kuchroo, and M. Hirashima. 2008. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 127:78-88.
687. Monney, L., C. A. Sabatos, J. L. Gaglia, A. Ryu, H. Waldner, T. Chernova, S. Manning, E. A. Greenfield, A. J. Coyle, R. A. Sobel, G. J. Freeman, and V. K. Kuchroo. 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415:536-541.
688. Norling, L., M. Perretti, and D. Cooper. 2009. Endogenous Galectins and the control of host inflammatory response. *J Endocrinol*:JOE-08-0512.
689. Seki, M., K. M. Sakata, S. Oomizu, T. Arikawa, A. Sakata, M. Ueno, A. Nobumoto, T. Niki, N. Saita, K. Ito, S. Y. Dai, S. Katoh, N. Nishi, M. Tsukano, K. Ishikawa, A. Yamauchi, V. Kuchroo, and M. Hirashima. 2007. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 56:3968-3976.
690. Tsuboi, Y., H. Abe, R. Nakagawa, S. Oomizu, K. Watanabe, N. Nishi, T. Nakamura, A. Yamauchi, and M. Hirashima. 2007. Galectin-9 protects mice from the Shwartzman reaction by attracting prostaglandin E2-producing polymorphonuclear leukocytes. *Clin Immunol* 124:221-233.
691. Asakura, H., Y. Kashio, K. Nakamura, M. Seki, S. Dai, Y. Shirato, M. J. Abedin, N. Yoshida, N. Nishi, T. Imaizumi, N. Saita, Y. Toyama, H. Takashima, T. Nakamura, M. Ohkawa, and M. Hirashima. 2002. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *J Immunol* 169:5912-5918.
692. Imaizumi, T., M. Kumagai, N. Sasaki, H. Kurotaki, F. Mori, M. Seki, N. Nishi, K. Fujimoto, K. Tanji, T. Shibata, W. Tamo, T. Matsumiya, H. Yoshida, X. F. Cui, S. Takanashi, K. Hanada, K. Okumura, S. Yagihashi, K. Wakabayashi, T. Nakamura, M. Hirashima, and K. Satoh. 2002. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukoc Biol* 72:486-491.
693. Pure, E., and C. A. Cuff. 2001. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med* 7:213-221.
694. Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G. D. Prestwich, M. M. Mascarenhas, H. G. Garg, D. A. Quinn, R. J. Homer, D. R. Goldstein, R. Bucala, P. J. Lee, R. Medzhitov, and P. W. Noble. 2005. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 11:1173-1179.
695. Teder, P., R. W. Vandivier, D. Jiang, J. Liang, L. Cohn, E. Pure, P. M. Henson, and P. W. Noble. 2002. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 296:155-158.
696. Ruffell, B., and P. Johnson. 2008. Hyaluronan induces cell death in activated T cells through CD44. *J Immunol* 181:7044-7054.
697. Bollyky, P. L., J. D. Lord, S. A. Masewicz, S. P. Evanko, J. H. Buckner, T. N. Wight, and G. T. Nepom. 2007. Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 179:744-747.
698. Bollyky, P. L., B. A. Falk, R. P. Wu, N. W. J. H. Buckner Thomas, and G. T. Nepom. 2009. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high

- molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*.
699. Kawana, H., H. Karaki, M. Higashi, M. Miyazaki, F. Hilberg, M. Kitagawa, and K. Harigaya. 2008. CD44 suppresses TLR-mediated inflammation. *J Immunol* 180:4235-4245.
 700. Day, A. J., and C. A. de la Motte. 2005. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol* 26:637-643.
 701. Kuznetsova, S. A., A. J. Day, D. J. Mahoney, M. S. Rugg, D. F. Mosher, and D. D. Roberts. 2005. The N-terminal module of thrombospondin-1 interacts with the link domain of TSG-6 and enhances its covalent association with the heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor. *J Biol Chem* 280:30899-30908.
 702. Setoguchi, K., Y. Misaki, K. Kawahata, K. Shimada, T. Juji, S. Tanaka, H. Oda, C. Shukunami, Y. Nishizaki, Y. Hiraki, and K. Yamamoto. 2004. Suppression of T cell responses by chondromodulin I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor: therapeutic potential in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:828-839.
 703. Li, M. O., Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson, and R. A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.
 704. Rubtsov, Y. P., and A. Y. Rudensky. 2007. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* 7:443-453.
 705. Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn, and A. S. Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of experimental medicine* 163:1037-1050.
 706. Kulkarni, A. B., C. G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K. C. Flanders, A. B. Roberts, M. B. Sporn, J. M. Ward, and S. Karlsson. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770-774.
 707. Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
 708. Kobayashi, S., K. Yoshida, J. M. Ward, J. J. Letterio, G. Longenecker, L. Yaswen, B. Mittleman, E. Mozes, A. B. Roberts, S. Karlsson, and A. B. Kulkarni. 1999. Beta 2-microglobulin-deficient background ameliorates lethal phenotype of the TGF-beta 1 null mouse. *J Immunol* 163:4013-4019.
 709. Letterio, J. J., A. G. Geiser, A. B. Kulkarni, H. Dang, L. Kong, T. Nakabayashi, C. L. Mackall, R. E. Gress, and A. B. Roberts. 1996. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J Clin Invest* 98:2109-2119.
 710. Kullberg, M. C., V. Hay, A. W. Cheever, M. Mamura, A. Sher, J. J. Letterio, E. M. Shevach, and C. A. Piccirillo. 2005. TGF-beta1 production by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur J Immunol* 35:2886-2895.
 711. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172:834-842.
 712. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2005. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5126-5131.
 713. Belkaid, Y., and K. V. Tarbell. 2009. Arming Treg cells at the inflammatory site. *Immunity* 30:322-323.
 714. Zhang, N., B. Schroppel, G. Lal, C. Jakubzick, X. Mao, D. Chen, N. Yin, R. Jessberger, J. C. Ochando, Y. Ding, and J. S. Bromberg. 2009. Regulatory T cells sequentially migrate

- from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 30:458-469.
715. Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317.
 716. Moodley, Y., P. Rigby, C. Bundell, S. Bunt, H. Hayashi, N. Misso, R. McAnulty, G. Laurent, A. Scaffidi, P. Thompson, and D. Knight. 2003. Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 162:771-779.
 717. Fadok, V. A., D. L. Bratton, and P. M. Henson. 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108:957-962.
 718. Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2:965-975.
 719. Sun, E. W., and Y. F. Shi. 2001. Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol Ther* 92:135-145.
 720. Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden, and I. Girkontaite. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350-351.
 721. Pettersen, R. D., G. Bernard, M. K. Olafsen, M. Pourtein, and S. O. Lie. 2001. CD99 signals caspase-independent T cell death. *J Immunol* 166:4931-4942.
 722. Klaus, S. J., S. P. Sidorenko, and E. A. Clark. 1996. CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes. *J Immunol* 156:2743-2753.
 723. Skov, S., P. Klausen, and M. H. Claesson. 1997. Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J Cell Biol* 139:1523-1531.
 724. Woodle, E. S., D. M. Smith, J. A. Bluestone, W. M. Kirkman, 3rd, D. R. Green, and E. W. Skowronski. 1997. Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway. *J Immunol* 158:2156-2164.
 725. Drenou, B., V. Blancheteau, D. H. Burgess, R. Fauchet, D. J. Charron, and N. A. Mooney. 1999. A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J Immunol* 163:4115-4124.
 726. Chen, S. C., C. C. Huang, C. L. Chien, C. J. Jeng, H. T. Su, E. Chiang, M. R. Liu, C. H. Wu, C. N. Chang, and R. H. Lin. 2004. Cross-linking of P-selectin glycoprotein ligand-1 induces death of activated T cells. *Blood* 104:3233-3242.
 727. Deas, O., C. Dumont, M. MacFarlane, M. Rouleau, C. Hebib, F. Harper, F. Hirsch, B. Charpentier, G. M. Cohen, and A. Senik. 1998. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 161:3375-3383.
 728. Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
 729. Djerbi, M., V. Screpanti, A. I. Catrina, B. Bogen, P. Biberfeld, and A. Grandien. 1999. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *The Journal of experimental medicine* 190:1025-1032.
 730. Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinel, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter, and J. Tschopp. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-521.
 731. Tada, K., M. Tanaka, R. Hanayama, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 2003. Tethering of apoptotic cells to phagocytes through binding of CD47 to Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1. *J Immunol* 171:5718-5726.

732. Kelchtermans, H., A. Billiau, and P. Matthys. 2008. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol* 29:479-486.
733. Zhang, J. 2007. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest* 117:871-873.
734. Manoury-Schwartz, B., G. Chiocchia, N. Bessis, O. Abehsira-Amar, F. Batteux, S. Muller, S. Huang, M. C. Boissier, and C. Fournier. 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 158:5501-5506.
735. Vermeire, K., H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau, and P. Matthys. 1997. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 158:5507-5513.
736. Matthys, P., K. Vermeire, T. Mitera, H. Heremans, S. Huang, D. Schols, C. De Wolf-Peeters, and A. Billiau. 1999. Enhanced autoimmune arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice is conditioned by mycobacteria in Freund's adjuvant and by increased expansion of Mac-1+ myeloid cells. *J Immunol* 163:3503-3510.
737. Matthys, P., K. Vermeire, and A. Billiau. 2001. Mac-1(+) myelopoiesis induced by CFA: a clue to the paradoxical effects of IFN-gamma in autoimmune disease models. *Trends Immunol* 22:367-371.
738. Chu, C. Q., S. Wittmer, and D. K. Dalton. 2000. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 192:123-128.
739. Caspi, R. R., C. C. Chan, B. G. Grubbs, P. B. Silver, B. Wiggert, C. F. Parsa, S. Bahmanyar, A. Billiau, and H. Heremans. 1994. Endogenous systemic IFN-gamma has a protective role against ocular autoimmunity in mice. *J Immunol* 152:890-899.
740. Jones, L. S., L. V. Rizzo, R. K. Agarwal, T. K. Tarrant, C. C. Chan, B. Wiggert, and R. R. Caspi. 1997. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *J Immunol* 158:5997-6005.
741. Ring, G. H., Z. Dai, S. Saleem, F. K. Baddoura, and F. G. Lakkis. 1999. Increased susceptibility to immunologically mediated glomerulonephritis in IFN-gamma-deficient mice. *J Immunol* 163:2243-2248.
742. Eriksson, U., M. O. Kurrer, W. Sebald, F. Brombacher, and M. Kopf. 2001. Dual role of the IL-12/IFN-gamma axis in the development of autoimmune myocarditis: induction by IL-12 and protection by IFN-gamma. *J Immunol* 167:5464-5469.
743. Feuerer, M., K. Eulenburg, C. Loddenkemper, A. Hamann, and J. Huehn. 2006. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol* 176:2857-2863.
744. Dalton, D. K., L. Haynes, C. Q. Chu, S. L. Swain, and S. Wittmer. 2000. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *The Journal of experimental medicine* 192:117-122.
745. Tarrant, T. K., P. B. Silver, J. L. Wahlsten, L. V. Rizzo, C. C. Chan, B. Wiggert, and R. R. Caspi. 1999. Interleukin 12 protects from a T helper type 1-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune uveitis, through a mechanism involving interferon gamma, nitric oxide, and apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 189:219-230.
746. Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I. S. Figari, A. Bradley, and T. A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259:1739-1742.
747. Sabatino, J. J., Jr., J. Shires, J. D. Altman, M. L. Ford, and B. D. Evavold. 2008. Loss of IFN-gamma enables the expansion of autoreactive CD4+ T cells to induce experimental autoimmune encephalomyelitis by a nonencephalitogenic myelin variant antigen. *J Immunol* 180:4451-4457.
748. Refaeli, Y., L. Van Parijs, S. I. Alexander, and A. K. Abbas. 2002. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 196:999-1005.

749. Li, X., K. K. McKinstry, S. L. Swain, and D. K. Dalton. 2007. IFN-gamma acts directly on activated CD4⁺ T cells during mycobacterial infection to promote apoptosis by inducing components of the intracellular apoptosis machinery and by inducing extracellular proapoptotic signals. *J Immunol* 179:939-949.
750. Foulds, K. E., M. J. Rotte, M. A. Paley, B. Singh, D. C. Douek, B. J. Hill, J. J. O'Shea, W. T. Watford, R. A. Seder, and C. Y. Wu. 2008. IFN-gamma mediates the death of Th1 cells in a paracrine manner. *J Immunol* 180:842-849.
751. Berner, V., H. Liu, Q. Zhou, K. L. Alderson, K. Sun, J. M. Weiss, T. C. Back, D. L. Longo, B. R. Blazar, R. H. Wiltout, L. A. Welniak, D. Redelman, and W. J. Murphy. 2007. IFN-gamma mediates CD4⁺ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy. *Nat Med* 13:354-360.
752. Wu, X., W. Hou, S. Sun, E. Bi, Y. Wang, M. Shi, J. Zang, C. Dong, and B. Sun. 2006. Novel function of IFN-gamma: negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming. *J Immunol* 177:934-943.
753. Kelchtermans, H., B. De Klerck, T. Mitera, M. Van Balen, D. Bullens, A. Billiau, G. Leclercq, and P. Matthys. 2005. Defective CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther* 7:R402-415.
754. Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology*.
755. Nickoloff, B. J., B. L. Riser, R. S. Mitra, V. M. Dixit, and J. Varani. 1988. Inhibitory effect of gamma interferon on cultured human keratinocyte thrombospondin production, distribution, and biologic activities. *J Invest Dermatol* 91:213-218.
756. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
757. Mosser, D. M., and X. Zhang. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews* 226:205-218.
758. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks. 2007. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 204:285-297.
759. Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, T. A. Wynn, M. Kamanaka, R. A. Flavell, and A. Sher. 2007. Conventional T-bet⁺Foxp3⁺ Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* 204:273-283.
760. Jankovic, D., and G. Trinchieri. 2007. IL-10 or not IL-10: that is the question. *Nature immunology* 8:1281-1283.
761. Trinchieri, G. 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* 204:239-243.
762. Gerosa, F., C. Nisii, S. Righetti, R. Micciolo, M. Marchesini, A. Cazzadori, and G. Trinchieri. 1999. CD4⁽⁺⁾ T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin Immunol* 92:224-234.
763. Pohl-Koppe, A., K. E. Balashov, A. C. Steere, E. L. Logigian, and D. A. Hafler. 1998. Identification of a T cell subset capable of both IFN-gamma and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection. *J Immunol* 160:1804-1810.
764. Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Harris, L. A. Turka, M. Ernst, C. J. Saris, J. J. O'Shea, and C. A. Hunter. 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature immunology* 8:1363-1371.
765. Couper, K. N., D. G. Blount, and E. M. Riley. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180:5771-5777.
766. Awasthi, A., Y. Carrier, J. P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R. A. Flavell, V. K. Kuchroo, M. Oukka, and H. L. Weiner. 2007. A dominant function for interleukin 27 in

- generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature immunology* 8:1380-1389.
767. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 212:28-50.
768. Gerosa, F., C. Paganin, D. Peritt, F. Paiola, M. T. Scupoli, M. Aste-Amezaga, I. Frank, and G. Trinchieri. 1996. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *The Journal of experimental medicine* 183:2559-2569.
769. Rutz, S., M. Janke, N. Kassner, T. Hohnstein, M. Krueger, and A. Scheffold. 2008. Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3497-3502.
770. Wei, X. Q., I. G. Charles, A. Smith, J. Ure, G. J. Feng, F. P. Huang, D. Xu, W. Muller, S. Moncada, and F. Y. Liew. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375:408-411.
771. McInnes, I. B., B. Leung, X. Q. Wei, C. C. Gemmell, and F. Y. Liew. 1998. Septic arthritis following *Staphylococcus aureus* infection in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 160:308-315.
772. MacLean, A., X. Q. Wei, F. P. Huang, U. A. Al-Alem, W. L. Chan, and F. Y. Liew. 1998. Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses. *J Gen Virol* 79 (Pt 4):825-830.
773. Huang, F. P., W. Niedbala, X. Q. Wei, D. Xu, G. J. Feng, J. H. Robinson, C. Lam, and F. Y. Liew. 1998. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 28:4062-4070.
774. Taylor-Robinson, A. W. 1997. Inhibition of IL-2 production by nitric oxide: a novel self-regulatory mechanism for Th1 cell proliferation. *Immunol Cell Biol* 75:167-175.
775. Ren, G., J. Su, X. Zhao, L. Zhang, J. Zhang, A. I. Roberts, H. Zhang, G. Das, and Y. Shi. 2008. Apoptotic cells induce immunosuppression through dendritic cells: critical roles of IFN-gamma and nitric oxide. *J Immunol* 181:3277-3284.
776. Niedbala, W., X. Q. Wei, C. Campbell, D. Thomson, M. Komai-Koma, and F. Y. Liew. 2002. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16186-16191.
777. Zhao, Z., S. Yu, D. C. Fitzgerald, M. Elbehi, B. Ciric, A. M. Rostami, and G.-X. Zhang. 2008. IL-12R{beta}2 Promotes the Development of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 181:3870-3876.
778. Luger, D., P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E. P. Bowman, N. M. Sgambellone, C. C. Chan, and R. R. Caspi. 2008. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *The Journal of experimental medicine* 205:799-810.
779. Kroenke, M. A., T. J. Carlson, A. V. Andjelkovic, and B. M. Segal. 2008. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *The Journal of experimental medicine* 205:1535-1541.
780. Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris, and J. M. Goverman. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 14:337-342.
781. Lees, J. R., P. T. Golumbek, J. Sim, D. Dorsey, and J. H. Russell. 2008. Regional CNS responses to IFN-gamma determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. *The Journal of experimental medicine* 205:2633-2642.
782. Goverman, J. 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*.
783. Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T. R. Petersen, B. T. Backstrom, R. A. Sobel, K. W. Wucherpfennig, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007.

- Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 13:423-431.
784. Fife, B. T., G. B. Huffnagle, W. A. Kuziel, and W. J. Karpus. 2000. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 192:899-905.
785. Liu, L., D. Huang, M. Matsui, T. T. He, T. Hu, J. Demartino, B. Lu, C. Gerard, and R. M. Ransohoff. 2006. Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3^{-/-} mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 176:4399-4409.
786. Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nature immunology* 8:369-377.
787. Irmeler, I. M., M. Gajda, and R. Brauer. 2007. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol* 179:6228-6236.
788. Knoechel, B., J. Lohr, S. Zhu, L. Wong, D. Hu, L. Ausubel, and A. K. Abbas. 2006. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol* 176:6473-6483.
789. Fossati-Jimack, L., A. Ioan-Facsinay, L. Reininger, Y. Chicheportiche, N. Watanabe, T. Saito, F. M. Hofhuis, J. E. Gessner, C. Schiller, R. E. Schmidt, T. Honjo, J. S. Verbeek, and S. Izui. 2000. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fcgamma receptor III. *The Journal of experimental medicine* 191:1293-1302.
790. Snapper, C. M., and W. E. Paul. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236:944-947.
791. Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2006. Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24:19-28.
792. Klaus, G. G., M. B. Pepys, K. Kitajima, and B. A. Askonas. 1979. Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. *Immunology* 38:687-695.
793. Heusser, C. H., C. L. Anderson, and H. M. Grey. 1977. Receptors for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. *The Journal of experimental medicine* 145:1316-1327.
794. Kipps, T. J., P. Parham, J. Punt, and L. A. Herzenberg. 1985. Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *The Journal of experimental medicine* 161:1-17.
795. Hoyer, K. K., W. F. Kuswanto, E. Gallo, and A. K. Abbas. 2009. Distinct roles of helper T-cell subsets in a systemic autoimmune disease. *Blood* 113:389-395.
796. Karupiah, G., T. N. Fredrickson, K. L. Holmes, L. H. Khairallah, and R. M. Buller. 1993. Importance of interferons in recovery from mousepox. *J Virol* 67:4214-4226.
797. Sacks, D., and N. Noben-Trauth. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-858.
798. Atrasheuskaya, A. V., E. K. Bukin, T. M. Fredeking, and G. M. Ignatyev. 2004. Protective effect of exogenous recombinant mouse interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on ectromelia virus infection in susceptible BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 136:207-214.
799. Kopf, M., F. Brombacher, G. Kohler, G. Kienzle, K. H. Widmann, K. Lefrang, C. Humborg, B. Ledermann, and W. Solbach. 1996. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major. *The Journal of experimental medicine* 184:1127-1136.

800. Sypek, J. P., C. L. Chung, S. E. Mayor, J. M. Subramanyam, S. J. Goldman, D. S. Sieburth, S. F. Wolf, and R. G. Schaub. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *The Journal of experimental medicine* 177:1797-1802.
801. Mahalingam, S., G. Karupiah, K. Takeda, S. Akira, K. I. Matthaei, and P. S. Foster. 2001. Enhanced resistance in STAT6-deficient mice to infection with ectromelia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6812-6817.
802. Chaudhri, G., V. Panchanathan, R. M. Buller, A. J. van den Eertwegh, E. Claassen, J. Zhou, R. de Chazal, J. D. Laman, and G. Karupiah. 2004. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9057-9062.
803. Pummerer, C. L., K. Luze, G. Grassl, K. Bachmaier, F. Offner, S. K. Burrell, D. M. Lenz, T. J. Zamborelli, J. M. Penninger, and N. Neu. 1996. Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice. *J Clin Invest* 97:2057-2062.
804. Sonderegger, I., T. A. Rohn, M. O. Kurrer, G. Iezzi, Y. Zou, R. A. Kastelein, M. F. Bachmann, and M. Kopf. 2006. Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *Eur J Immunol* 36:2849-2856.
805. Sonderegger, I., G. Iezzi, R. Maier, N. Schmitz, M. Kurrer, and M. Kopf. 2008. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *The Journal of experimental medicine* 205:2281-2294.
806. Eriksson, U., M. O. Kurrer, I. Sonderegger, G. Iezzi, A. Tafuri, L. Hunziker, S. Suzuki, K. Bachmaier, R. M. Bingisser, J. M. Penninger, and M. Kopf. 2003. Activation of dendritic cells through the interleukin 1 receptor 1 is critical for the induction of autoimmune myocarditis. *The Journal of experimental medicine* 197:323-331.
807. Afanasyeva, M., Y. Wang, Z. Kaya, E. A. Stafford, K. M. Dohmen, A. A. Sadighi Akha, and N. R. Rose. 2001. Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon-gamma-independent pathway. *Circulation* 104:3145-3151.
808. Rangachari, M., N. Mauermann, R. R. Marty, S. Dirnhofer, M. O. Kurrer, V. Komnenovic, J. M. Penninger, and U. Eriksson. 2006. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *The Journal of experimental medicine* 203:2009-2019.
809. Iezzi, G., I. Sonderegger, F. Ampenberger, N. Schmitz, B. J. Marsland, and M. Kopf. 2009. CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:876-881.
810. Sad, S., R. Marcotte, and T. R. Mosmann. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2:271-279.
811. Mosmann, T. R., L. Li, and S. Sad. 1997. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 9:87-92.
812. Seder, R. A., J. L. Boulay, F. Finkelman, S. Barbier, S. Z. Ben-Sasson, G. Le Gros, and W. E. Paul. 1992. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol* 148:1652-1656.
813. Croft, M., L. Carter, S. L. Swain, and R. W. Dutton. 1994. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *The Journal of experimental medicine* 180:1715-1728.
814. Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, S. Altuwajiri, W. Szeliga, J. Kolls, A. Chang, and W. Zou. 2007. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol* 178:6730-6733.

815. Liu, S. J., J. P. Tsai, C. R. Shen, Y. P. Sher, C. L. Hsieh, Y. C. Yeh, A. H. Chou, S. R. Chang, K. N. Hsiao, F. W. Yu, and H. W. Chen. 2007. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol* 82:354-360.
816. Intlekofer, A. M., A. Banerjee, N. Takemoto, S. M. Gordon, C. S. Dejong, H. Shin, C. A. Hunter, E. J. Wherry, T. Lindsten, and S. L. Reiner. 2008. Anomalous type 17 response to viral infection by CD8⁺ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* 321:408-411.
817. Ciric, B., M. El-behi, R. Cabrera, G. X. Zhang, and A. Rostami. 2009. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8⁺ T cells. *J Immunol* 182:5296-5305.