

Université de Montréal

Étude de la fonction de l'interleukine-21 dans le système immunitaire

par

Valérie Ostiguy

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
maîtrise ès sciences (M.Sc.) en Sciences biomédicales

Août 2003

© Valérie Ostiguy, 2003



W
4
U58
2003
V.152

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de la fonction de l'interleukine-21 dans le système immunitaire

présenté par :
Valérie Ostiguy

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Claude Perreault
président-rapporteur

Nathalie Labrecque
directeur de recherche

Sylvie Fournier
membre du jury

RÉSUMÉ

Les cytokines de classe I, plus particulièrement celles utilisant la chaîne gamma commune (γ_c), jouent un rôle crucial lors de la différenciation, de la prolifération et de la survie des cellules du système immunitaire. Récemment, une nouvelle cytokine de classe I, l'interleukine 21 (IL-21), a été identifiée. L'IL-21 possède une forte homologie avec l'IL-2 et l'IL-15 et son récepteur (IL-21R) partage la chaîne γ_c . Par ailleurs, l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T. Ceci nous a donc amené à postuler que l'IL-21 régule la prolifération et la survie des cellules T. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons caractérisé le patron d'expression de l'IL-21/IL-21R dans le système immunitaire et déterminé les effets biologiques de l'IL-21 sur les cellules T. Pour ce faire, nous avons produit une protéine de fusion, IL-21Fc, afin d'avoir une source d'IL-21 et un réactif pour détecter l'expression de l'IL-21R. Nous avons ainsi démontré que l'IL-21R est exprimé sur les thymocytes matures, les cellules T et B. Le message de l'IL-21 a été détecté dans les ganglions, la rate et le thymus de souris déficiente en cellules T. Ceci nous a permis de suggérer que l'IL-21 est produite de façon constitutive par les cellules stromales car aucun autre type cellulaire ne produit d'IL-21, mis à part les cellules T CD4⁺. Ces résultats nous ont encouragé à vérifier si l'IL-21 est un facteur de survie pour les cellules T naïves. L'IL-21 permet la survie des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ *in vitro* via le maintien de l'expression de Bcl-2 et l'activation de la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase. De plus, l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T via une augmentation de la survie des cellules T activées. En résumé, l'expression constitutive de l'IL-21/IL-21R et la promotion de la survie des cellules T naïves et activées par l'IL-21 suggère que, tout comme l'IL-7, l'IL-21 est un facteur de survie pour les cellules T.

Mots clés : lymphocyte T, cytokine, récepteur de cytokine, homéostasie.

ABSTRACT

Type I cytokines play crucial roles in the differentiation, proliferation and survival of immune cells. A new type I cytokine, interleukin-21 (IL-21), was recently cloned. IL-21 is closely related to IL-2 and IL-15 and its receptor (IL-21R) shares the common cytokine receptor γ chain. Moreover, IL-21 mediated co-stimulation of T cell. This leads us to postulate that IL-21 regulates T cell proliferation and survival. We have characterized the expression of IL-21/IL-21R in the immune system and determined the biological effects of IL-21 on T cells. To do so, we have produced a fusion protein, IL-21Fc, by linking the Fc portion of IgG to IL-21, to have a source of IL-21 and a reagent to detect IL-21R expression. This had allowed us to detect IL-21R expression on mature thymocytes, B and T cells. Moreover, IL-21 seems to be constitutively produced by stromal cells of lymphoid organs since we were able to detect IL-21 mRNA in lymph nodes, spleen and thymus of T cell deficient mice. These results prompted us to test if IL-21 is a survival factor for naive T cells. As expected, IL-21 enhances the survival of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro* via maintenance of Bcl-2 expression and the activation of PI3-K pathway. Furthermore, IL-21 mediated co-stimulation of T cell proliferation is due to increase survival of activated T cells. In summary, the constitutive expression of IL-21/IL-21R and the promotion of naive T cell survival by IL-21 suggest that IL-21, like IL-7, is a T cell survival factor.

Key words : T lymphocyte, cytokine, cytokine receptor, homeostasis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES.....	VII
Liste des Tableaux.....	vii
Liste des Figures	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
REMERCIEMENTS	X
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 INTRODUCTION.....	2
1.2 RÉPONSE DES CELLULES T	3
1.2.1 Reconnaissance antigénique.....	3
1.2.2 Formation de la mémoire immunologique	4
1.2.3 Homéostasie des cellules T	5
1.3 CYTOKINES	6
1.3.1 Cytokines de classe I et leur récepteur.....	7
1.3.2 Famille des cytokines qui utilise la chaîne γ commune (γc)	8
1.3.3 Rôle des cytokines dans l'homéostasie des cellules T.....	9
1.3.3.1 Développement des cellules T	10
1.3.3.2 Homéostasie des cellules T naïves.....	12
1.3.3.3 Homéostasie des cellules T effectrices.....	13
1.3.3.4 Homéostasie des cellules T mémoires.....	14
1.3.4 Voies de signalisation utilisées par les cytokines	15
1.3.4.1 Voie de Jak/STAT.....	16
1.3.4.2 Activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K).....	18
1.3.4.3 Voie de Bcl-2 et Bcl-x _L	19
1.4 L'INTERLEUKINE 21 ET SON RÉCEPTEUR.....	21
1.4.1 Découverte du IL-21/IL-21R.....	21
1.4.2 Distribution tissulaire de l'IL-21/IL-21R.....	23

1.4.3	Transmission des signaux via l'IL-21R	24
1.4.4	Effets biologiques de l'IL-21.....	24
1.4.4.1	Effets de l'IL-21 sur les cellules T	24
1.4.4.2	Effets de l'IL-21 sur les cellules NK.....	25
1.4.4.3	Effets de l'IL-21 sur les cellules B.....	26
1.4.4.4	Effets de l'IL-21 sur les cellules de myélome	27
	PROBLÉMATIQUE	28
	CHAPITRE 2. MÉTHODOLOGIE	30
2.1	MÉTHODES UTILISÉES	31
2.1.1	Production de l'IL-21Fc	31
2.2.2	Marquage de l'IL-21R en utilisant l'IL-21Fc.....	32
2.2.3	RT-PCR pour déterminer l'expression de l'IL-21	33
2.3.4	Stimulation des cellules T	33
2.3.5	Survie des cellules T <i>in vitro</i>	34
2.3.6	Marquage intracellulaire pour détecter l'expression de Bcl-2	34
2.3.7	Immunobuvardage de type Western	34
	CHAPITRE 3. ARTICLE.....	36
	IL-21 PROMOTES T LYMPHOCYTE SURVIVAL.....	37
	CHAPITRE 4. DISCUSSION.....	81
	DISCUSSION	82
	Patron d'expression de l'IL-21 et de l'IL-21R	82
	Co-stimulation de la prolifération via une augmentation de la survie	84
	Survie des cellules T naïves via l'activation de la PI3-K et le maintien de l'expression de Bcl-2.....	86
	Rôle différentiel de l'IL-21 chez les cellules T et B	87
	Rôles de l'IL-21 dans le système immunitaire	87
	CONCLUSION	89
	RÉFÉRENCES.....	90

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Liste des Tableaux

Tableau I. Cytokines de classe I	6
Tableau II. Rôle des cytokines de la famille γ_c	10
Tableau III. Jak/STAT activées par les cytokines γ_c	17

Liste des Figures

Figure 1. Structure 3D des cytokines de classe I à chaîne courte.....	7
Figure 2. Rôle des cytokines dans l'homéostasie des cellules T.....	14
Figure 3. Voies de signalisation activées par les cytokines.....	16
Figure 4. Famille des cytokines de classe I utilisant la chaîne γ_c	22
Figure 5. Schéma représentant la production de la protéine de fusion IL-21Fc.....	32
Figure 6. Rôle de l'IL-21 dans la réponse des cellules T.....	88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- a.a. : acides aminés
Ac : anticorps
Ag : antigène
Cytokine γ c : cytokine dont le récepteur utilise la chaîne γ c
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
 γ c : chaîne gamma commune
IFN : interféron
IL : interleukine
IL-R : récepteur d'interleukine
Ig : immunoglobuline
Jak : Janus kinase
PI3-K : phosphatidylinositol 3-kinase
RCT : récepteur des cellules T
STAT : signal de transduction et d'activation de la transcription
 T_E : cellule T effectrice
 T_{H1} : cellule T « helper » 1 ou cellule T $CD4^+$ inflammatoire
 T_{H2} : cellule T « helper » 2 ou cellule T $CD4^+$ auxiliaire
 T_M : cellule T mémoire
 T_{MC} : cellule T mémoire centrale
 T_{ME} : cellule T mémoire effectrice

À Jean-François,
merci pour ton encouragement constant.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement ma directrice de recherche, Nathalie Labrecque, pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire et pour m'avoir offert le projet sur l'étude du rôle de l'IL-21 dans le système immunitaire. J'ai beaucoup apprécié sa disponibilité, nos discussions et ses conseils qui m'ont permis de mener à terme ce fabuleux projet.

Je voudrais également remercier Julie Rooney pour son assistance technique et nos discussions, ainsi que tous les membres du laboratoire. Je tiens aussi à remercier Sophie Ouellet pour tous les tris cellulaires.

Finalement, un gros merci à ma famille qui m'a toujours encouragé tout au long de mes études.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 INTRODUCTION

Le système immunitaire défend l'organisme contre les pathogènes (virus, bactéries, champignons, parasites) grâce à l'immunité naturelle et acquise. L'immunité naturelle est la première ligne de défense de l'organisme. Elle comprend les barrières épithéliales (la peau, les muqueuses, les enzymes, la flore intestinale) et les phagocytes (macrophage, monocyte, granulocyte). Toutefois, les mécanismes de l'immunité naturelle sont non-spécifiques et ne peuvent pas toujours éliminer les agents infectieux. Lorsque ceci arrive, les lymphocytes de l'immunité acquise entrent en jeu afin d'éliminer les pathogènes. Deux groupes de lymphocytes, soit les lymphocytes T (ou cellules T) et les lymphocytes B, jouent ce rôle. Lors de la reconnaissance du pathogène, les lymphocytes reconnaissent spécifiquement le pathogène ce qui enclenche leur prolifération et différenciation. Suite à la prolifération et la différenciation, les cellules T $CD4^+$ auxiliaires et inflammatoires, ainsi que cellules T $CD8^+$ cytotoxiques vont éliminer le pathogène. Les cellules T $CD4^+$ auxiliaires vont activer les macrophages et les lymphocytes B. Les macrophages activés vont fusionner plus efficacement leurs lysosomes aux phagosomes pour augmenter l'efficacité antibactérienne, alors que les cellules B vont produire des anticorps (Ac), plus précisément des immunoglobulines (Ig) de différentes classes pour éliminer le pathogène en circulation. Les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques, quant à elles, vont éliminer par cytolysse les cellules infectées par un pathogène.

Dans ce mémoire, il sera principalement question de la réponse de cellules T et des cytokines qui régulent leur homéostasie et fonctions. La réponse des cellules T, les cytokines et plus particulièrement, l'interleukine-21 et son récepteur seront introduits dans les prochaines sections.

1.2 RÉPONSE DES CELLULES T

Lorsqu'une cellule T naïve rencontre un antigène (Ag), il y a prolifération et différenciation de celle-ci en cellules T effectrices (T_E). Les lymphocytes T_E $CD4^+$ (auxiliaires et inflammatoires) et $CD8^+$ (cytotoxiques) peuvent alors éliminer le pathogène. Suite à l'élimination du pathogène, il y a apoptose de la majorité des lymphocytes T_E et différenciation de la population restante en lymphocytes T mémoires (T_M) (1, 2). Les cellules T_M vont survivre à long terme et pourront répondre plus rapidement lors d'une deuxième rencontre avec le même pathogène (3).

1.2.1 Reconnaissance antigénique

La reconnaissance antigénique a lieu lorsqu'une cellule T reconnaît un Ag présenté par les cellules présentatrices d'Ag (CPA). Le lymphocyte T lie l'Ag via son récepteur spécifique de cellule T (RCT). En fait, le RCT reconnaît spécifiquement un fragment peptidique de l'Ag associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), de classe I ou II, exprimées par les CPA. Les molécules du CMH de classe I (CMH-I) présentent les fragments peptidiques de protéines synthétisées dans le cytosol, alors que les molécules du CMH-II présentent les fragments peptidiques antigéniques provenant des vésicules intracellulaires. Les molécules du CMH-I vont présenter l'Ag aux cellules T $CD8^+$ et les CMH-II, aux cellules T $CD4^+$ (4). Ayant reçu un signal via leur RCT, les cellules T vont pouvoir proliférer et se différencier. Cependant, pour y arriver, les lymphocytes T ont besoin d'un deuxième signal qui provient des molécules de co-stimulation B7.1 ou B7.2 (CD80 et CD86) exprimées par les CPA matures (5). La reconnaissance antigénique peut toutefois mener à différentes réponses (délétion des lymphocytes spécifiques à l'Ag, tolérance ou production d'un grand nombre de T_E) tout dépendant de la force du signal que la cellule T reçoit (6). La force du signal dépend de trois facteurs : la concentration de complexe CMH-peptide (qui détermine le nombre de RCT engagé),

la concentration des molécules de co-stimulation (qui détermine l'étendu de l'amplification du signal) et la durée de l'interaction entre la cellule T et les CPA (3).

Lorsque les cellules T reçoivent les deux signaux (du RCT et des molécules de co-stimulation), elles peuvent alors proliférer et se différencier (2). Dès que le lymphocyte T prolifère, il peut alors se différencier pour acquérir des fonctions effectrices. Les cellules T $CD4^+$ vont devenir des cellules T « helper » 1 (T_H1) ou T_H2 sous l'influence de l'interleukine 12 (IL-12) ou de l'IL-4, respectivement (7). Les cellules T_H1 (inflammatoire) et T_H2 (auxiliaire), ayant acquis leurs fonctions effectrices, pourront alors migrer au site d'infection. Les cellules T $CD8^+$, quant à elles, vont proliférer et se différencier en cellules T cytotoxiques (1, 2). Ayant acquis des fonctions effectrices, les cellules T_E $CD4^+$ et $CD8^+$ pourront éliminer le pathogène et enrayer l'infection.

1.2.2 Formation de la mémoire immunologique

Suite à l'élimination du pathogène, la plupart (95 à 99%) des lymphocytes T_E qui ont proliféré lors de la réponse immunitaire vont mourir. Cette mort par apoptose se produit avec une cinétique si précise qu'elle est considérée comme étant programmée (8). Toutefois, environ 1 à 5% des cellules T_E vont persister et se différencier en lymphocytes T_M (9-11). Ces lymphocytes T_M vont persister à long terme dans l'organisme et vont continuer à se diviser lentement en absence d'Ag (12-14). Les cellules T_M sont formées des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et comprennent deux classes principales, soit les cellules T mémoires centrales (T_{MC}) et effectrices (T_{ME}). Les cellules T_{MC} ont un phénotype $CCR7^+$ et possèdent la caractéristique de migrer aux ganglions. Elles produisent de faible quantité d'interféron γ (IFN- γ) et d'IL-4 et ne contiennent pas de perforine (permettant de lyser les cellules infectées). Au contraire, les lymphocytes T_{ME} ont un phénotype $CCR7^-$ et migrent dans les tissus périphériques. Par ailleurs, elles produisent de grande quantité de cytokines effectrices et expriment la perforine (13). Les cellules T_M peuvent ainsi protéger l'organisme à long terme en éliminant les cellules infectées.

1.2.3 Homéostasie des cellules T

L'homéostasie des cellules T permet le maintien, dans un espace limité, de chacune des populations de lymphocytes T. Malgré l'arrivée d'environ 10^6 nouveaux émigrants du thymus à chaque jour, la population de lymphocytes T naïfs doit maintenir son nombre à environ 20×10^6 cellules (15). Ceci signifie que 5% de la population de lymphocytes T naïfs doit mourir pour être remplacée par de nouveaux émigrants thymiques à chaque jour. La population de cellules T_M provient de la différenciation des quelques lymphocytes T_E restants suite à la phase de contraction. Les cellules T_M vont maintenir leur nombre grâce à une prolifération faible et constante. Ainsi, l'homéostasie des cellules T est maintenue par une balance entre le développement, la mort et la prolifération des lymphocytes T (16, 17).

De plus, le contrôle de la réponse des cellules T est aussi important pour l'homéostasie des cellules T. Il faut tout d'abord qu'il y ait un maintien des cellules T naïves afin de conserver un répertoire varié et la capacité de répondre à l'Ag de façon maximale. Lors de la reconnaissance antigénique, les cellules T naïves doivent proliférer et se différencier en lymphocytes T_E . Il y a alors une expansion massive de 10^4 à 10^5 du nombre de lymphocytes antigènes spécifique représentant une augmentation de 2 à 10 fois du nombre total de cellules T (18, 19). Les lymphocytes T_E occupent, par le fait même, une grande partie de l'espace disponible. Suite à l'élimination du pathogène, la majorité des cellules T_E vont mourir par apoptose pour rétablir le ratio homéostatique des populations. Toutefois, quelques cellules T_E vont survivre et se différencier pour permettre la formation de lymphocytes T_M . Cependant, ce n'est pas seulement l'espace limitée qui contrôle l'homéostasie des cellules T mais plusieurs autres facteurs, incluant les interactions RCT-CMH, les cytokines et les effets métaboliques de certaines molécules pro- et anti-apoptotiques (16, 17, 20). En conséquence, les cytokines jouant un rôle dans l'homéostasie et la réponse des cellules T seront introduites dans la prochaine section.

1.3 CYTOKINES

Les cytokines sont des protéines sécrétées par les cellules et qui agissent sur elle-même (action autocrine) ou sur des cellules cibles (action paracrine). Elles comprennent les interleukines (IL), les interférons (IFN) et plusieurs autres protéines. Les cytokines agissent en se liant à un récepteur spécifique à la surface cellulaire (récepteur de cytokine) et en transmettant des signaux via ce récepteur. Les cytokines sont regroupées en deux familles, soit les cytokines de classe I et de classe II. Les cytokines de classe I se divisent en deux sous-familles, chaîne courte ou longue (Tableau I). À l'intérieur de cette sous-famille à chaîne courte, certaines cytokines vont se lier sur une chaîne de récepteur commune gamma (γ c), formant la famille des cytokines qui utilisent γ c (cytokines γ c). Les cytokines de classe II comprennent les IFN (α , β , γ , ω , δ), ainsi que l'IL-10 (21). Notre étude s'est concentrée sur les cytokines de classe I et leur récepteur, plus particulièrement ceux de la famille des cytokines γ c puisqu'elles forment la famille la plus importante pour la régulation de l'homéostasie et de la réponse des cellules T.

TABLEAU I. CYTOKINES DE CLASSE I

Cytokines à chaîne courte	Cytokines à chaîne longue
IL-2	IL-6
IL-3	IL-11
IL-5	Oncostatin M
IL-4	Facteur inhibiteur de leucémie (LIF)
IL-7	Facteur neurotrophique ciliaire
IL-9	Cardiotropine-1
IL-13	Hormone de croissance
IL-15	Prolactine
IL-21	Erythropoïétine
GM-CSF ¹	Thrombopoïétine
M-CSF	Leptine
Facteur des cellules souches (SCF)	G-CSF

¹ GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocyte-macrophage; M-CSF : monocyte-CSF, G-CSF : granulocyte-CSF

1.3.1 Cytokines de classe I et leur récepteur

Les cytokines de classe I jouent plusieurs rôles lors de la différenciation, de la prolifération et de la survie des cellules immunitaires. Cette famille possède environ 24 membres regroupés dans deux sous-familles, à chaîne courte ou longue (Tableau I). Les cytokines à chaîne courte incluent, de plus, les membres de la famille γ_c . Toutes les cytokines de classe I possèdent une structure tridimensionnelle semblable qui contient quatre hélices α à chaîne courte (Figure 1) ou à chaîne longue. Les quatre hélices α (A, B, C, D) sont reliées selon une topologie haut-haut-bas-bas (22). Les deux premières hélices (AB) et les deux dernières hélices (CD) sont réunies par une longue boucle, puis des liens disulfures entre les hélices stabilisent la structure (21). De plus, les cytokines de classe I à chaîne courte possèdent sept feuillets β dans la boucle entre les hélices AB et CD. Toutefois, même si les cytokines de classe I possèdent une forte similarité de structure, elles possèdent très peu de similarité dans leur séquence en acides aminés (a.a.). La seule région conservée consiste en une séquence de résidus chargés positivement qui se situe dans le site de liaison au récepteur (22).

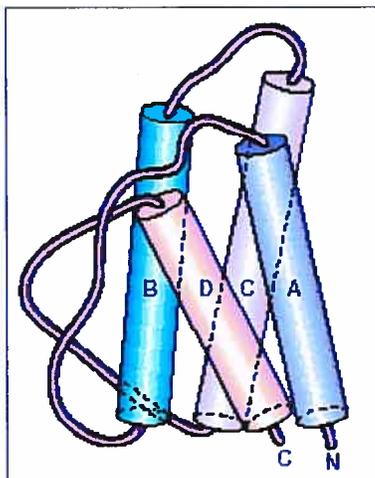


Figure 1. Structure 3D des cytokines de classe I à chaîne courte.

Les quatre hélices α sont reliées par une topologie haut-haut-bas-bas et reliées entre elles par des boucles plus ou moins longues qui déterminent le type de cytokines de classe I (à chaîne courte ou longue).

(Figure modifiée d'après le Box1, réf. 37)

Malgré le fait que les cytokines de classe I possèdent surtout une homologie structurale, leurs récepteurs possèdent plusieurs homologies de séquence. Les récepteurs de cytokine de classe I ont été regroupés en une famille suite à l'identification d'homologie entre le récepteur de l'érythropoïétine et la chaîne β du récepteur de l'IL-2 (IL-2R β) (23). Ces récepteurs se retrouvent sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère. De plus, ces récepteurs utilisent parfois des chaînes communes. Les récepteurs pour l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF partagent la chaîne β c alors que les récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 partagent la chaîne γ c (21). Les récepteurs de cytokine de classe I sont des glycoprotéines ayant leur portion extracellulaire en N-terminal et leur portion intracellulaire en C-terminal (21). Plusieurs homologies se retrouvent dans le domaine extracellulaire dont les quatre résidus cystéines conservés impliqués dans les liens disulfures intra- et inter-chaîne, le résidu tryptophane, à deux a.a. en C-terminal de la seconde cystéine conservée, le motif trp-ser-X-trp-ser (WSXWS) dans la région proximale de la membrane et le domaine fibronectine de type III. Le domaine intracellulaire renferme deux régions nommées Box1 et Box2. La région Box1 est riche en proline et est impliquée dans l'interaction avec les tyrosines kinases de la famille Janus (Jak) (24), importantes pour la signalisation via les récepteurs de cytokine de classe I.

1.3.2 Famille des cytokines qui utilise la chaîne γ commune (γ c)

Les cytokines γ c sont très importantes dans l'homéostasie des cellules T, mais elles régulent aussi les fonctions de plusieurs types cellulaires du système immunitaire. Ces cytokines incluent l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21 (cette dernière est présentée à la section 1.4). Chacun des récepteurs de ces cytokines est formé d'une ou deux chaînes spécifiques associées à la chaîne γ c. En plus de la chaîne γ c, les récepteurs de l'IL-2 et l'IL-15 partagent aussi la même chaîne β (IL-2R β) et ont chacune une chaîne α spécifique. Les récepteurs des interleukines 4, 7, 9

et 21 sont formés d'une chaîne α spécifique associée à la chaîne γ c (voir Figure 4, page 22) (25-30). La majorité de ces récepteurs sont seulement exprimés suite à l'activation cellulaire. Toutefois, même si les cytokines γ c s'associent toutes la chaîne γ c de leurs récepteurs, elles jouent toutes des rôles plus ou moins différents dans l'homéostasie des cellules T, incluant la survie, la prolifération, la différenciation et l'apoptose de ces dernières.

L'importance de ces cytokines et de leurs récepteurs a été découverte en 1993, lorsqu'il a été démontré qu'une mutation dans le gène codant pour γ c résultait en une immunodéficiência humaine combinée sévère liée au chromosome X (XSCID : « X-linked Severe Combined Immunodeficiency Disease ») (31). Le XSCID est caractérisé par une absence ou un nombre profondément diminué de cellules T, une absence de cellules « natural killer » (NK) et un nombre normal de cellules B mais qui ne sont pas fonctionnelles (32-35). Les défauts du système immunitaire associés à la mutation du gène codant pour γ c sont liés à un problème dans la transduction des signaux intracellulaires. La chaîne γ c est importante pour la transduction des signaux et ce via l'activation de la Janus kinase 3 (Jak3) (36) (introduit à la section 1.3.4.1). Chacun des récepteurs de ces cytokines utilise donc la chaîne γ c pour la transduction des signaux en plus d'utiliser leur chaîne spécifique. Malgré le fait que ces cytokines utilisent toutes la chaîne γ c dans leur récepteur, chacun des phénotypes de la maladie provient d'un défaut dans la signalisation de un ou plusieurs de ces récepteurs. Chacune des cytokines joue donc un rôle dans la réponse immunitaire et l'homéostasie des cellules T (37).

1.3.3 Rôle des cytokines dans l'homéostasie des cellules T

Les cytokines de la famille γ c agissent principalement dans la réponse des cellules T et par le fait même, elles préservent l'homéostasie des lymphocytes T (Tableau II). Les cytokines de la famille γ c les plus importantes sont l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15. Ces trois cytokines contrôlent la majorité de l'homéostasie des cellules T.

L'importance de ces cytokines a été découverte suite à la production de souris déficiente pour la cytokine ou pour son récepteur. Ainsi, le rôle de ces cytokines a été déterminé pour le développement des cellules T, pour la survie des cellules T naïves, leur prolifération et différenciation en lymphocytes T_E, pour la différenciation des cellules T_E en T_M et la survie de ces dernières.

TABLEAU II. RÔLE DES CYTOKINES DE LA FAMILLE γ_C

Cytokine	Source	Rôles
IL-2	Cellules T _E CD4 ⁺ (T _{H1})	- Facteur de prolifération des cellules T - Induit la mort par apoptose suite à l'activation cellulaire - Augmente l'activité cytolytique des cellules NK
IL-4	Cellules T _E CD4 ⁺ (T _{H2})	- Facteur de prolifération des cellules B - Développement des cellules T _{H2} - Commutation de classes des Ig
IL-7	Cellules stromales	- Développement des cellules T et B - Survie des cellules T naïves - Différenciation des T _E en T _M CD8 ⁺
IL-9	Cellules T _E CD4 ⁺	- Induit la production de mucus - Facteur de prolifération des mastocytes
IL-15	Monocytes et plusieurs types cellulaires non immunologique	- Développement des cellules NK - Facteur de prolifération des cellules T - Homéostasie des cellules T _M CD8 ⁺

Adapté à partir des réf. (21, 37).

1.3.3.1 Développement des cellules T

Le développement des cellules T a lieu dans le thymus, plus précisément dans le cortex et la médulla thymique. Les cellules T immatures (ou thymocytes) commencent leur développement au stade double négatif (DN) où elles n'expriment ni le complexe CD3-RCT, ni les co-récepteurs CD4 ou CD8. Environ 20% des DN vont réarranger les gènes du RCT pour devenir des cellules T $\gamma\delta$, alors qu'environ 75% des DN vont devenir des cellules T $\alpha\beta$. Les DN se subdivisent en quatre populations (DN1, 2, 3, 4), selon l'expression de la molécule d'adhésion CD44 et de la chaîne α de l'IL-2R (CD25), permettant de déterminer leur niveau de maturation.

Au stade DN1 (CD44⁺CD25⁻), les thymocytes n'expriment que la molécule CD44 et n'ont pas encore débuté le réarrangement du gène de la chaîne β du RCT. Dès le début du réarrangement du gène de la chaîne β , les thymocytes expriment alors le CD25 et sont considérés comme des DN2 (CD44⁺CD25⁺). Suite à un réarrangement fonctionnel de la chaîne β , les cellules T immatures perdent l'expression de CD44 et deviennent des DN3 (CD44⁻CD25⁺). La chaîne β fonctionnelle peut alors se lier à un substitue de chaîne α (pT α) associé à la molécule CD3. Le thymocytes perd alors rapidement l'expression de CD25 et la cellule est maintenant considérée comme une DN4 (CD44⁻CD25⁻). Par la suite, la chaîne α est réarrangée pour former un RCT $\alpha\beta$, puis les co-récepteurs CD4 et CD8 sont exprimés. Le thymocyte est maintenant une cellule double positive (DP) qui poursuit sa maturation selon sa capacité de lier le complexe CMH-peptide du soi via son RCT (sélection positive) sans que son affinité soit trop élevée (sélection négative). Selon la classe de CMH du soi reconnu (CMH-I ou -II), le thymocyte DP va poursuivre son développement en exprimant un seul co-récepteur (CD4 ou CD8). Les cellules simples positives (SP) CD4⁺ ou CD8⁺ peuvent alors terminer leur maturation dans la médulla thymique avant de rejoindre la périphérie (19).

Les cytokines γc sont critiques pour le développement des cellules T. L'importance de cette famille de cytokines a été démontrée chez la souris déficiente pour la chaîne γc ($\gamma c^{-/-}$) (38). La souris $\gamma c^{-/-}$ a une atrophie thymique liée à une absence de thymocytes RCT $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$. Cette souris possède toutefois quelques thymocytes CD4SP et CD8SP. Il y a donc un défaut sévère dans le développement des lymphocytes T, surtout lors de la transition DN2-DN3 (38). La déficience pour la chaîne γc affecte principalement les DN et les CD8⁺SP en diminuant de 40 fois leur nombre par rapport à une souris normale. Les DP et les CD4⁺SP sont également affectées par cette déficience. Conséquemment, leur nombre est diminué de 20 fois par rapport à une souris normale (39). Cependant, les défauts liés à l'absence de la γc sont principalement attribuables à une déficience pour l'IL-7 (IL-7^{-/-}) ou pour son récepteur (IL-7R $\alpha^{-/-}$) (40, 41). Les souris IL-7^{-/-} et IL-7R $\alpha^{-/-}$ ont un développement des cellules T très similaire à celui de la souris $\gamma c^{-/-}$, mais elles possèdent un nombre

relativement normal de CD8⁺SP. Ces souris ont une déficience principalement en DN, avec un défaut de transition DN2-DN3 et une très faible proportion de DN3 et DN4 (40, 41). Par ailleurs, l'IL-7 induit la survie des thymocytes DN2 et ce via l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (42-44) (introduit à la section 1.3.4.3). De plus, l'IL-7 est crucial pour le développement des thymocytes RCT $\gamma\delta$, vu l'absence totale de ces cellules chez la souris IL-7^{-/-} ou IL-7R α ^{-/-} (45, 46). Cependant, la déficience en IL-7 ou pour l'IL-7R α n'explique pas complètement le phénotype de la souris $\gamma\text{c}^{-/-}$. Conséquemment, il est possible de recréer la déficience en CD8⁺SP de la souris $\gamma\text{c}^{-/-}$ en ajoutant un Ac anti- γc aux souris IL-7^{-/-} et IL-7R α ^{-/-} (42). Ceci suggère qu'il y a probablement une autre cytokine γc responsable du développement des cellules T en plus de l'IL-7.

1.3.3.2 Homéostasie des cellules T naïves

Suite à leur développement, les cellules T matures et naïves migrent en périphérie où elles recirculent dans les organes lymphoïdes secondaires en attente de rencontrer leur Ag. Toutefois, si elles ne rencontrent pas d'Ag, elles vont finir par mourir selon une demi-vie de quelques années (47). Pour survivre en périphérie, les cellules T naïves requièrent des signaux. Les facteurs qui permettent la survie des cellules T naïves sont l'interaction du RCT avec les molécules du CMH (48-51) et les cytokines, plus particulièrement l'IL-7 (52-54). Récemment, il a été démontré que l'IL-15 favorise la survie des cellules T naïves CD8⁺ *in vitro* via l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (55). L'IL-4 et l'IL-6 peuvent aussi permettre la survie des cellules T naïves *in vitro* (56, 57), mais seul l'IL-7 est nécessaire pour leur survie *in vivo* (53). Suite à une thymectomie et l'injection d'un Ac anti-IL-7R α , il a été démontré que l'IL-7 était essentielle pour la survie des cellules T, plus particulièrement pour les lymphocytes T CD4⁺. L'IL-7 permet la survie des cellules T naïves via le maintien des fonctions métaboliques de celles-ci (52, 54). En présence d'IL-7, les cellules T naïves métabolisent activement le glucose et conservent leur taille cellulaire (54). De plus, l'IL-7 favorise la prolifération

homéostatique des cellules T naïves afin de remédier à une déficience en lymphocytes T (52). Cependant, l'IL-7 n'est probablement pas la seule cytokine impliquée dans l'homéostasie des cellules T naïves, car elle ne semble pas critique pour la survie des lymphocytes T CD8⁺ (53).

1.3.3.3 Homéostasie des cellules T effectrices

Suite à la rencontre d'un Ag, les cellules T naïves prolifèrent et se différencient en cellules T_E. Jusqu'à maintenant, deux cytokines γ c sont connues pour réguler cette étape de la réponse des cellules T (Figure 2). L'IL-2 et l'IL-15 stimulent la prolifération et la différenciation des cellules T naïves en cellules T_E *in vitro* (1, 58). De plus, l'IL-2 permet la différenciation des cellules T naïves en cellules T_E, en favorisant la formation des cellules T CD8⁺ cytotoxiques (59). Cependant, leurs rôles *in vivo* sont légèrement différents. Il a été démontré que les cellules T d'une souris déficiente pour l'IL-2 ou son récepteur prolifèrent normalement en réponse à l'Ag (60, 61). Par ailleurs, même si l'IL-15 semble être un facteur de croissance important pour l'initiation de la prolifération des cellules T *in vivo*, elle est dispensable (58, 62, 63). Les souris déficientes pour l'IL-15 (IL-15^{-/-}) ou pour l'IL-15R α (IL-15R α ^{-/-}) répondent normalement lors d'une infection à LCMV (64). Il est donc probable que la prolifération soit dépendante de l'IL-2 ou de l'IL-15 ou d'une autre cytokine. L'IL-2, quant à elle, limite l'expansion continue des lymphocytes T_E via une diminution de l'expression de γ c, nécessaire pour la survie cellulaire (63). Suite à l'élimination du pathogène, 95 à 99% des cellules T_E vont mourir par apoptose. En diminuant l'expression de γ c, l'IL-2 va favoriser l'initiation du programme de mort cellulaire par apoptose (65-67). La phase de contraction suite à l'élimination du pathogène est extrêmement importante, car celle-ci permet aux populations de cellules T de se maintenir en nombre adéquat en périphérie.

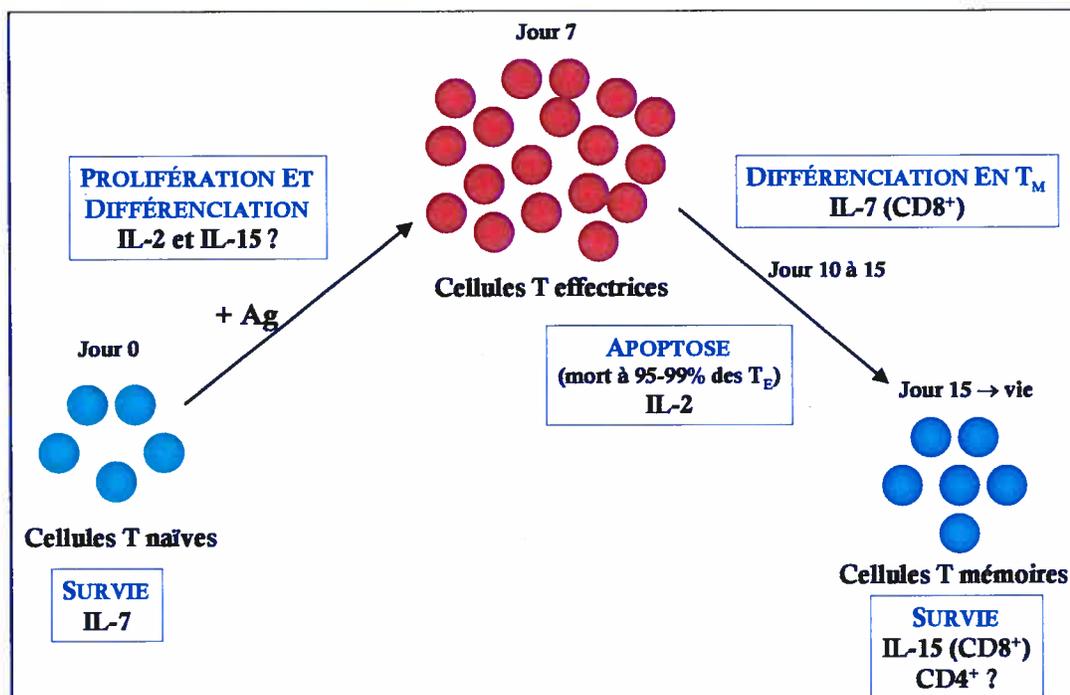


Figure 2. Rôle des cytokines dans l'homéostasie des cellules T

Lors de la réponse des cellules T, les cytokines jouent plusieurs rôles. L'IL-7 est importante pour la survie des cellules T naïves, l'IL-2 et l'IL-15 au niveau de la prolifération et de la différenciation des cellules naïves en (T_E). Suite à l'élimination du pathogène, l'IL-2 va induire l'apoptose de la majorité des T_E, alors que l'IL-7 va induire la différenciation de ces cellules (CD8⁺) en T_M. Les T_M (CD8⁺) vont survivre grâce à l'IL-15.

1.3.3.4 Homéostasie des cellules T mémoires

Suite à l'élimination de la majorité des cellules T_E, les quelques lymphocytes T_E restants vont se différencier en cellules T_M (1). Les lymphocytes T_M vivent beaucoup plus longtemps et n'ont pas besoin de l'interaction RCT-CMH pour survivre (11, 68). Les cellules T_M prolifèrent lentement et de façon constante ce qui permet de maintenir leur nombre au cours du temps. Encore une fois, les cytokines γ c sont aussi importantes pour la génération et le maintien des lymphocytes T_M à long terme. La génération de souris IL-15^{-/-} et IL-15R α ^{-/-} a permis de démontrer que l'IL-15 est requise pour la survie des cellules T_M CD8⁺ (58, 62, 69). Elle permet le maintien des lymphocytes T_M CD8⁺ via leur prolifération lente et constante. L'IL-7,

quant à elle, assure la génération des lymphocytes $T_M CD8^+$ (9, 70, 71). L'IL-7 peut aussi induire la prolifération homéostatique des cellules $T_M CD8^+$ lors d'une déficience en cellules T (10, 72). Cependant, l'IL-15 et/ou l'IL-7 ne sont pas nécessaire pour la génération ou la survie des lymphocytes $T_M CD4^+$ (58, 62). De plus, la prolifération homéostatique de ces cellules est indépendante de l'IL-7 et de l'IL-15 (73). Jusqu'à maintenant, aucune cytokine de la famille γc n'est connue pour réguler l'homéostasie des cellules $T_M CD4^+$, ce qui suggère qu'une autre cytokine joue ce rôle.

Les cytokines γc régulent toutes les phases de la vie d'un lymphocyte. Toutefois, il reste encore plusieurs mystères à résoudre, surtout en ce qui concerne l'homéostasie des cellules $T_M CD4^+$.

1.3.4 Voies de signalisation utilisées par les cytokines

Pour pouvoir agir sur l'homéostasie des cellules T, les cytokines γc doivent transmettre des signaux via leur récepteur spécifique. Ces signaux se transmettent par la queue cytoplasmique du récepteur de cytokine via les motifs consensus box1 et box2 impliqués dans la transduction des signaux (24). Lors de l'oligomérisation du récepteur, il y a une activation de plusieurs cascades intracellulaires, dont la cascade de la voie de Jak/STAT (signal de transduction et d'activation de la transcription) et la cascade de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) (37, 74). Suite à l'activation de ces deux cascades, il y aura une stimulation de la prolifération cellulaire et une production de molécules anti-apoptotiques (dont Bcl-2 et Bcl-x_L) pour protéger la cellule de l'apoptose (17). L'activation de toutes ces voies permettra aux cytokines d'agir sur l'homéostasie et la survie des cellules T (Figure 3). Chacune des ces voies sera donc introduite plus en détail.

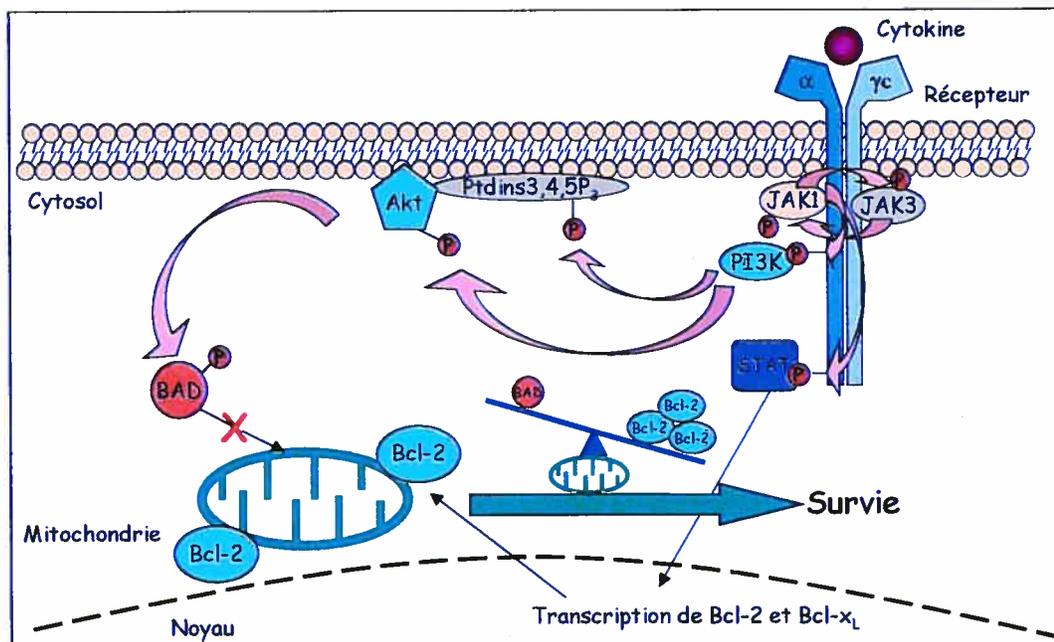


Figure 3. Voie de signalisation activées par les cytokines

Lorsqu'une cytokine lie son récepteur spécifique, il y a activation des Jak par auto- ou trans-phosphorylation, ce qui permet l'activation de la voie de PI3-K ou la phosphorylation (P) de STAT. STAT phosphorylé peut se transloquer au noyau pour augmenter la transcription des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L. La phosphorylation de PI3-K mène à la phosphorylation d'Akt qui va inactiver la molécule pro-apoptotique BAD, via sa phosphorylation. Lorsque BAD est phosphorylé, il ne peut plus se lier à la mitochondrie. Le ratio positif entre le nombre de molécule anti-apoptotique et pro-apoptotique à la mitochondrie permet à la cellule de survivre.

Inspiré des réf. # 37 et 74

1.3.4.1 Voie de Jak/STAT

La voie de Jak/STAT est impliquée dans la signalisation des récepteurs de cytokines de classe I (75, 76). Les Jak sont de protéines tyrosines kinases de 116 à 140 kDa, composées de quatre membres : Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2, pour tyrosine kinase 2 (21). Jak1, Jak2 et Tyk2 sont exprimées de façon ubiquitaire, alors que Jak3 est exprimée seulement par les cellules hématopoïétiques (77, 78). Les Jak se retrouvent au cytoplasme et s'associent aux récepteurs de cytokine en se liant à la région riche en proline Box1 (24). Lorsque la cytokine lie son récepteur spécifique, il a y oligomérisation du récepteur et activation des Jak par une auto- ou trans-phosphorylation (75). Toutefois, ce ne sont pas toutes les Jak qui sont activées en

même temps. Il a été démontré que les cytokines γ_c activent principalement Jak3 qui s'associe à γ_c , mais aussi Jak1 qui lie la chaîne spécifique du récepteur (Tableau III) (36, 79). Une fois activée, les Jak phosphorylent des tyrosines sur le récepteur des cytokines. Ces tyrosines phosphorylées vont par la suite servir de site d'ancrage pour des molécules contenant des domaines SH2 (SRC-homologie 2), dont les protéines STAT, des protéines adaptatrices (Shc) et PI3-K (37, 75, 76, 80).

TABLEAU III. JAK/STAT ACTIVÉES PAR LES CYTOKINES γ_c

Cytokine γ_c	Jak	STAT
IL-2	Jak1, Jak2, Jak3	STAT5a, STAT5b, STAT3
IL-4	Jak1, Jak3	STAT6
IL-7	Jak1, Jak3	STAT5a, STAT5b, STAT3
IL-9	Jak3	STAT5a, STAT5b, STAT3
IL-15	Jak1, Jak3	STAT5a, STAT5b, STAT3

Adapté à partir de la réf. (75).

Les protéines STAT sont des facteurs de transcription qui se retrouvent dans le cytosol. Leur phosphorylation est nécessaire pour leur translocation au noyau et leurs activités (76, 80). La famille des STAT comprend 7 membres, soit : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a et STAT5b (21, 75). Le domaine le plus important des STAT est le domaine SH2. Ce domaine a deux fonctions principales, soit un rôle d'ancrage au récepteur et un rôle dans la dimérisation des STAT (75). Cependant, le motif reconnu par le domaine SH2 varie d'un STAT à l'autre. Chaque STAT reconnaît donc un motif particulier, par exemple STAT3 reconnaît le motif YXXQ; STAT5, les motifs YLSLQ, YCTFP, YFFFH (IL-2R), YVTMS (IL-7R) et YLPQE (IL-9R) et STAT6 reconnaît les motifs YKAFS et YKPFQ (IL-4R) (81-83). Les cytokines γ_c recrutent principalement STAT3 et STAT5a/b, mis à part l'IL-4 qui recrute STAT6 (Tableau III). Une fois que STAT est ancré au récepteur de la cytokine suite à sa liaison via une tyrosine phosphorylée, une tyrosine de STAT conservée autour de la position 700 est phosphorylée, ce qui permet la dimérisation des STAT via le domaine SH2 (75, 84). Suite à la dimérisation, ceux-ci peuvent se

transloquer au noyau. Le dimère STAT/STAT va ensuite reconnaître un motif TTCNmGAA ($m = 3$ ou 4) sur l'ADN, puis activer la transcription de gène (85).

En activant la voie Jak/STAT, les cytokines peuvent activer certains gènes et par le fait même, réguler l'homéostasie des cellules T.

1.3.4.2 Activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)

La PI3-K est aussi activée lors de la liaison des cytokines γc à leur récepteur. En réponse aux cytokines, les phosphatidylinositols à la membrane cellulaire sont phosphorylés en position 3 de l'anneau inositol par la PI3-K (86, 87). En phosphorylant les phosphatidylinositols à la membrane, la PI3-K peut former trois produits, le phosphatidylinositol-3-monophosphate (PI-3P), le phosphatidyl-inositol-3,4-diphosphate (PI-3,4-P₂) et le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI-3,4,5-P₃) (86). Toutefois, le produit obtenu suite à l'action de la PI3-K dépend de la classe de PI3-K engagée. Il y a quatre classes de PI3-K, la I_A, I_B, II et III. La classe la mieux connue est la I_A et est celle utilisée par les cytokines. La PI3-K de classe I_A contient une sous-unité catalytique p110 (p110 α , p110 β ou p110 δ) et une sous-unité régulatrice (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β ou p55 γ). Suite à l'engagement du récepteur, la tyrosine de la séquence YXXM du récepteur est phosphorylée (88). Cette tyrosine phosphorylée permet le recrutement de la PI3-K via le domaine SH2 de ses sous-unités p85 α et p85 β . Suivant la production de PI-3,4,5-P₃ par la PI3-K activée, les molécules de signalisation contenant des domaines d'homologie à la pleckstrine vont s'accumuler au site d'activation en se liant au PI-3,4,5-P₃.

La molécule de signalisation la plus importante recrutée par l'activation de la PI3-K est Akt (ou PKB pour protéine kinase B). Akt est une protéine sérine-thréonine kinase qui s'associe au PI-3,4,5-P₃ à la membrane cellulaire pour être ensuite phosphorylée par la PI3-K. La phosphorylation d'Akt en Thr308 et Ser473 (89) stimule son activité catalytique et résulte en la phosphorylation d'autres

protéines ayant la séquence consensus RXXRXXS/T (90). Les protéines dont l'activité est régulée par Akt affectent la croissance cellulaire, l'entrée dans le cycle cellulaire et la survie. Akt régule donc la caspase 9 (facteur de mort cellulaire impliqué dans l'apoptose), le facteur de transcription « Forkhead », les I κ B qui séquestrent en temps normal le facteur NF- κ B (facteur de transcription ubiquitaire) et la protéine pro-apoptotique Bad (91). Les protéines ciblées par Akt sont inactivées suite à la phosphorylation d'une ou plusieurs sérine contenue dans la séquence consensus reconnue par Akt. Lors de cette étude, l'intérêt a surtout été porté sur l'inactivation de Bad. Lorsque Bad est déphosphorylée et active, elle se lie à la mitochondrie pour inhiber les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L. Akt inactive donc Bad en la phosphorylant en Ser112 ou Ser136, avec une préférence pour la Ser136 (92, 93). Par ailleurs, suite à sa phosphorylation, Bad s'associe avec la protéine adaptatrice 14-3-3. Cette association protège Bad de la déphosphorylation, la séquestre dans le cytosol et ainsi, l'inactive en l'empêchant de se lier à la mitochondrie. En inhibant la protéine pro-apoptotique Bad, Akt favorise donc la survie cellulaire.

1.3.4.3 Voie de Bcl-2 et Bcl-x_L

L'homéostasie des cellules T est aussi régulée par une balance entre la survie et l'apoptose de celles-ci. L'apoptose est un programme de suicide cellulaire qui est exécuté par des protéases appelées caspases. La famille Bcl-2 comprend des protéines intracellulaires qui sont au centre de la régulation de l'activation des caspases en opposant les membres pro- et anti-apoptotique pour que la décision entre la mort ou la vie cellulaire soit prise (94). En activant les voies de Jak/STAT et de la PI3-K, les cytokines agissent sur la voie de Bcl-2 et Bcl-x_L en augmentant ou non leur expression et en régulant les molécules pro-apoptotiques. Il existe deux voies principales de l'apoptose : la voie reliée au stress cellulaire (lié à la mitochondrie) et la voie des récepteurs de mort cellulaire. La voie de stress cellulaire est activée lorsqu'il y a une privation en cytokine ou un dommage génotoxique. Cette voie de stress implique la famille Bcl-2.

La famille Bcl-2 comprend des membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques (94). Les membres anti-apoptotiques sont formés de la sous-famille Bcl-2 et comprennent les molécules Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et plusieurs autres (95, 96). Les membres pro-apoptotiques sont formés de deux sous-familles, Bax et BH3 (97, 98). La sous-famille Bax comprend les molécules Bax, Bak et Bok, alors que la sous-famille BH3 comprend les molécules Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim_L, Bad, Bid et EGL-1. La décision entre la mort ou la survie cellulaire dépend donc du ratio entre le nombre de molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques à la mitochondrie. Les cytokines pourront aussi influencer la balance en inhibant des molécules pro-apoptotiques telles que Bad via sa phosphorylation par Akt (92) ou en favorisant l'augmentation de l'expression des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-x_L via l'IL-7 ou l'activation de Jak3 (54, 99).

Les cytokines agissent donc sur l'homéostasie des cellules T en activant les voies de Jak/STAT et de la PI3-K, puis en régulant les molécules pro- ou anti-apoptotiques pour pouvoir régir sur la survie ou la mort des cellules T, selon les cas.

1.4 L'INTERLEUKINE 21 ET SON RÉCEPTEUR

L'avènement du projet du génome humain a permis la découverte d'une multitude de nouveaux gènes. Toutefois, ces gènes étaient pour la plupart inconnus. Vu l'importance des cytokines de classe I, de nombreux chercheurs se sont mis à la recherche de nouvelles cytokines parmi ces gènes. Suite à ces études, plusieurs nouvelles cytokines ont été identifiées dont l'interleukine 21 (IL-21) et son récepteur (IL-21R).

1.4.1 Découverte du IL-21/IL-21R

En 2000, un nouveau récepteur de cytokine de classe I a été identifié par deux groupes indépendants (100, 101). Ce nouveau récepteur de cytokine de classe I a été appelé l'IL-21R (101). L'IL-21R a été découvert par prédiction de gène en comparant les séquences typiques des récepteurs de cytokine de classe I aux séquences de la banque du génome humain. Ainsi, un gène virtuel, comprenant 568 a.a. réparti dans 9 exons codant, a été identifié. Ce gène est adjacent au gène de l'IL-4R α situé sur le chromosome humain 16p11(101). L'IL-21R contient les motifs typiques des récepteurs de cytokine de classe I soit : séquence signal putative, domaine transmembranaire, quatre résidus cystéine conservés dans la région extracellulaire et motif WSXWS (100). Au niveau du domaine intracellulaire, l'IL-21R possède les motifs de signalisation intracellulaire, incluant les motifs box 1 et box 2 importants pour la liaison des Jak (101). De plus, l'IL-21R est hautement similaire à la chaîne β de l'IL-2R (27% en a.a.) (100) et à la chaîne α de l'IL-4R (101). L'IL-21R humain possède un homologue chez la souris et ces deux protéines sont à 72% identiques au niveau de la séquence nucléique et à 62% identique en a.a. (100). Malgré le fait que l'IL-21R est hautement similaire à l'IL-2R β et à l'IL-4R α , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7 et l'IL-15 sont incapable de lier l'IL-21R. Ceci suggérait que le ligand de l'IL-21R était une nouvelle cytokine (100).

Sachant que le ligand de l'IL-21R est une nouvelle cytokine, un clonage fonctionnel a été effectué pour permettre son identification. Ainsi, l'IL-21, le ligand de l'IL-21R a été cloné. Tout comme son récepteur, l'IL-21 humaine possède un homologue murin et ces deux protéines sont à identiques à 57% en a.a. (101). Il s'agit donc d'une protéine de 15 kDa, contenant 131 a.a. L'IL-21 possède un domaine de 4 hélices α typique des cytokines de classe I ainsi qu'une homologie significative avec l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-15. L'IL-21 et l'IL-15 partagent deux paires de résidus cystéine en position identique, une paire conservée pour l'IL-2, l'IL-4 et le GM-CSF et une unique à l'IL-21 et l'IL-15. L'IL-21 est donc hautement reliée à l'IL-15 si on compare la structure et l'homologie en a.a. Ainsi, l'IL-21 et son récepteur font donc parti de la famille des cytokines de classe I qui partagent la chaîne γ (Figure 4).

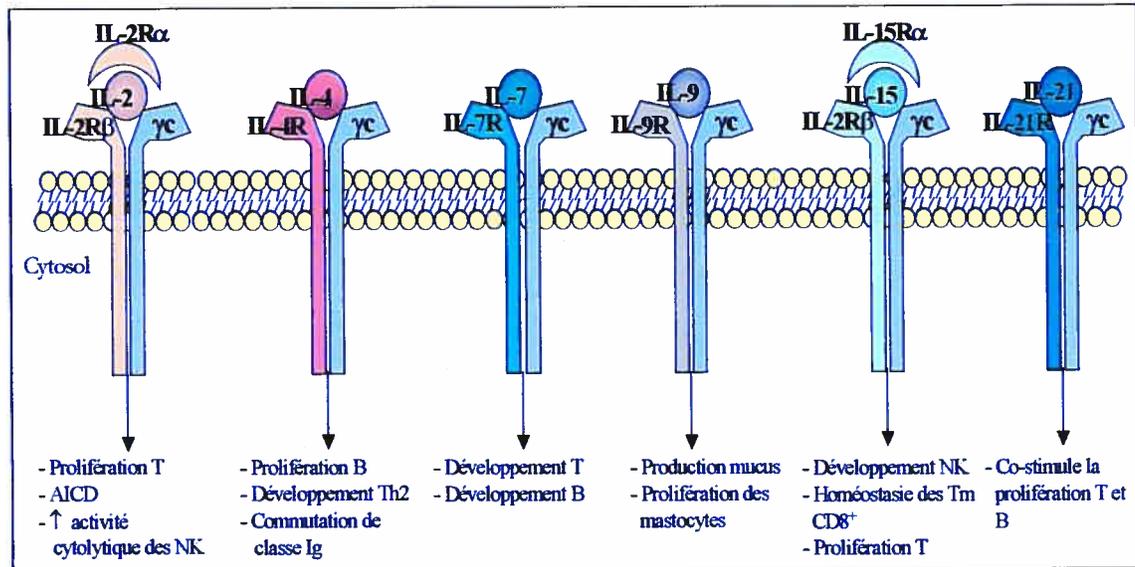


Figure 4. Famille des cytokines de classe I utilisant la chaîne γ .

Schématisation des récepteurs de cytokines de types I utilisant la chaîne γ , ainsi que l'IL-21R, un nouveau membre de cette famille.

1.4.2 Distribution tissulaire de l'IL-21/IL-21R

Pour pouvoir établir le rôle de l'IL-21 et de son récepteur dans le système immunitaire, il est important de connaître leur distribution tissulaire et cellulaire. Ainsi, un patron d'expression a été effectué pour pouvoir connaître la distribution tissulaire de l'IL-21 et de son récepteur pour pouvoir, par la suite, établir ses effets biologiques dans le système immunitaire.

Lors de différentes études chez l'humain et la souris, il a été démontré que le messenger de l'IL-21R est présent au niveau de la moelle osseuse, de la rate, du thymus, des ganglions, des leucocytes, du placenta, des poumons et de la peau (100-102). Toutefois, l'expression la plus forte de l'IL-21R se retrouve au niveau des tissus lymphoïdes. Le messenger de l'IL-21R est aussi exprimé par les lymphocytes du sang périphérique, les cellules B et très faiblement, par les cellules T naïves. Cependant, cette expression augmente suite à l'activation cellulaire (100-102). Le messenger de l'IL-21R est également exprimé par des lignées de cellules T activées, NK et B (100). Par ailleurs, l'expression de l'IL-21R a été déterminée à la surface des cellules B naïves CD23⁺, des lignées cellulaires B humaines (IM-9), NK (NK-92) et T humaines leucémiques (Jurkat, HUT-102B2, Raji) par cytométrie en flux à l'aide d'une protéine IL-21 biotinylée ou par Western Blot à l'aide d'un anti-sérum anti-IL-21R (100, 101).

En ce qui concerne le messenger de l'IL-21, lors d'analyse par Northern Blot, aucune expression du messenger n'était détectable dans les tissus normaux. Toutefois, suite à une activation anti-CD3, les cellules T expriment le messenger de l'IL-21, plus particulièrement les cellules T CD4⁺ (101). Par ailleurs, certaines évidences suggèrent que l'IL-21 est produite principalement par les cellules T « helper » 2 (T_H2) (103). L'IL-21 est donc exprimée par les cellules T activées, alors que l'IL-21R est exprimé par les cellules B, les cellules NK et les cellules T activées.

1.4.3 Transmission des signaux via l'IL-21R

Pour que l'IL-21 puisse jouer un rôle dans le système immunitaire, elle doit pouvoir activer des voies de signalisation en se liant à l'IL-21R. Toutefois, l'IL-21 ne lie pas seulement l'IL-21R, mais aussi la chaîne γc (30, 104), également impliquée dans la transduction des signaux. L'IL-21 est donc une nouvelle cytokine de classe I qui utilise la chaîne γc pour la transduction des signaux (30). Suite à une stimulation de l'IL-21R par l'IL-21, il y a phosphorylation des tyrosines de Jak1, associée à l'IL-21R (100) et des tyrosines de Jak3, associée à γc (36, 79). Par la suite, il y a une induction de la prolifération et/ou de la survie cellulaire, mais les facteurs en aval de Jak1 et Jak3 sont encore inconnus (105). En plus d'activer les Jak, l'IL-21 induit aussi la phosphorylation des tyrosines de STAT1, de STAT3 et plus faiblement celles de STAT5 (104).

1.4.4 Effets biologiques de l'IL-21

Suite à la caractérisation de la distribution tissulaire de l'IL-21 et de son récepteur, il était primordial d'étudier les effets biologiques possibles de l'IL-21. Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés aux effets biologiques de l'IL-21 sur les cellules T, les cellules B et les cellules NK.

1.4.4.1 Effets de l'IL-21 sur les cellules T

Tout d'abord, les effets biologiques de l'IL-21 ont été analysés *in vitro*. Étant donné que les cytokines de classe I sont connues pour jouer un rôle important dans la réponse des cellules T (16), les effets biologiques de l'IL-21 ont été analysés. Il a été démontré que l'IL-21 co-stimule la prolifération des thymocytes, des cellules T humaines et murines lorsqu'elles sont activées par un Ac anti-CD3. Toutefois, contrairement aux autres cytokines (IL-2, IL-7 et IL-15), l'IL-21 n'a aucun effet de

prolifération significatif sur les cellules T en absence d'activation (101). Toutefois, lors de cette analyse, il n'a pas été déterminé si des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ étaient impliquées dans la co-stimulation. Il serait donc intéressant de vérifier quelle population (CD4⁺ et/ou CD8⁺) répond à l'IL-21.

Récemment, il a été démontré que l'addition d'IL-21 inhibe l'expansion *in vitro* des cellules T CD8⁺CD44⁺, soit les cellules ayant un phénotype mémoire/activé (106). Cette inhibition pourrait être un moyen de réguler l'homéostasie des cellules T_M CD8⁺. Par ailleurs, l'IL-21 inhibe la production d'IFN γ chez les cellules T_H1 en développement chez la souris (103). Toutefois, aucune analyse approfondie n'a été effectuée quant au rôle de l'IL-21 sur les cellules T, même chez la souris déficiente pour l'IL-21R (IL-21R^{-/-}) (106). Il aurait été intéressant de vérifier la prolifération des lymphocytes T suite à la reconnaissance antigénique *in vivo*, étant donné qu'il a été démontré que l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T *in vitro* (101).

1.4.4.2 Effets de l'IL-21 sur les cellules NK

Par la suite, les effets biologiques de l'IL-21 ont été analysés chez les cellules NK, puisqu'elles expriment l'IL-21R. Tout d'abord, des analyses *in vitro* concernant le développement des cellules NK ont été effectuées. Il a été démontré que l'IL-21, en combinaison avec l'IL-15, favorise le développement des cellules NK à partir des progéniteurs de la moelle osseuse (101). De plus, l'IL-21 augmente l'activité lytique des cellules NK, mais à un niveau moindre que l'IL-2 ou l'IL-15.

Cependant, les effets les plus importants de l'IL-21 sur les cellules NK ont été observés chez la souris IL-21R^{-/-}. Il a été démontré que l'IL-21 n'interfère pas avec la génération des cellules NK et ne supporte pas leur expansion *in vitro*. En fait, l'IL-21 inhibe plutôt l'expansion des cellules NK médiée par l'IL-15. Il est important de noter que l'IL-15 est connue pour augmenter les fonctions effectrices, la survie et la prolifération des cellules NK (107). L'IL-21 agit donc comme un antagoniste lors de l'induction de la prolifération des cellules NK par l'IL-15. En conséquence, en

inhibant la réponse des cellules NK de l'immunité innée, l'IL-21 favorise probablement la transition vers l'immunité acquise.

1.4.4.3 Effets de l'IL-21 sur les cellules B

Lors de l'analyse des effets biologiques de l'IL-21 sur les cellules B, il a été démontré que l'IL-21 peut co-stimuler *in vitro* la prolifération des cellules B humaines lorsque celles-ci sont stimulées par un anti-CD40 (101). Toutefois, l'IL-21 est incapable de co-stimuler les cellules B murines en présence du même stimulus (108). Cependant, lorsque l'IL-21 est en présence d'IL-4, en combinaison avec un Ac anti-IgM, il y a inhibition de la prolifération des cellules B humaines et murines *in vitro* (101, 108). Ceci suggère que l'IL-21 inhibe probablement les effets de l'IL-4 lors de l'activation des cellules B.

Récemment, les effets les plus importants de l'IL-21 sur les cellules B ont été obtenus lors de l'analyse de la souris IL-21R^{-/-}. Malgré le fait que les populations de cellules B ne soient pas affectées, les quantités d'Ig dans le sérum sont anormales. Le sérum de la souris IL-21R^{-/-} contient 3 fois moins d'IgG1, 2 fois moins d'IgG2b et 3 fois plus d'IgE (106, 109). La présence élevée d'IgE chez la souris IL-21R^{-/-} est probablement dépendante de l'IL-4 vu que chez une souris IL-4^{-/-}IL-21R^{-/-}, les quantités d'IgE sont relativement normales. Toutefois, les quantités d'IgG restent faibles même chez la souris IL-4^{-/-}IL-21R^{-/-}. En conséquence, il est probable que l'IL-4 et l'IL-21 coopèrent ensemble dans la régulation de l'homéostasie des cellules B, ce qui est contraire aux résultats obtenus *in vitro*. De plus, un défaut de signalisation de ces deux cytokines pourrait expliquer l'anomalie des cellules B dans le syndrome XSCID (109). En plus d'agir sur la production d'Ig, l'IL-21 agit aussi sur l'apoptose des cellules B *in vitro* en augmentant de deux fois le nombre de cellules apoptotiques via une diminution de l'expression de Bcl-2 et Bcl-x_L (108). Malgré le fait qu'il n'y ait pas de différence dans le nombre de cellules B chez la souris IL-21R^{-/-} (106, 109) il est possible que l'induction de l'apoptose des cellules B *in vitro* soit due à la forte concentration (200 ng/mL) d'IL-21 utilisée lors de cette

étude (108). En conséquence, l'IL-21 est probablement importante pour la fonctionnalité des cellules B et pour le contrôle de leur nombre dans le système immunitaire.

1.4.4.4 Effets de l'IL-21 sur les cellules de myélome

Les effets de l'IL-21 ont été analysés récemment sur les cellules de myélome étant donné que les myélomes multiples sont une néoplasie de lymphocytes B totalement différenciés et que ces cellules expriment l'IL-21R. Il a été démontré que l'IL-21 peut stimuler la prolifération de différentes lignées de myélome. De plus, l'IL-21 augmente la viabilité des cellules de myélome. Par ailleurs, pour environ 40% des échantillons de myélome, une stimulation avec l'IL-21 entraîne une augmentation de la synthèse de l'ADN. L'IL-21 peut également remplacer l'IL-6 en agissant comme facteur de croissance à long terme et agir en synergie avec le TNF pour induire la prolifération des cellules de myélome. L'IL-21 agit sur les cellules du myélome en phosphorylant les tyrosines de Jak1, Stat3, ainsi que Erk1/2 (kinase régulant les signaux extracellulaires). Une dérégulation dans l'expression de l'IL-21 pourrait en conséquence être responsable de la formation des myélomes (110).

En résumé, l'IL-21 agit sur plusieurs populations cellulaires du système immunitaire, dont les cellules T, NK et B. L'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T, mais inhibe l'expansion des lymphocytes T CD8⁺CD44⁺. De plus, l'IL-21 favorise probablement la transition de l'immunité innée à acquise en inhibant l'expansion des cellules NK. Par ailleurs, l'IL-21 inhibe la prolifération des lymphocytes B *in vitro* lorsqu'elles sont en présence d'IL-4, en combinaison avec un Ac anti-IgM. L'IL-21 affecte aussi les quantités d'Ig dans le sérum et induit l'apoptose des cellules B. L'IL-21 semble donc importante pour l'homéostasie du système immunitaire.

PROBLÉMATIQUE

Les cytokines de la famille γc jouent plusieurs rôles dans la réponse des cellules T. Il est connu que l'IL-7 est un facteur de survie pour les cellules T naïves. L'IL-2 et l'IL-15, quant à elles, stimulent la prolifération des lymphocytes T lors de la reconnaissance antigénique même si elles sont dispensables. Par ailleurs, l'IL-2 induit la mort par apoptose de la majorité des cellules T_E suite à l'élimination du pathogène, alors que l'IL-7 permet la différenciation des lymphocytes T_E restants en cellules T_M ($CD8^+$). De plus, l'IL-15 favorise la survie des cellules T_M $CD8^+$. Toutefois, aucune cytokine n'est connue pour la génération et la survie des lymphocytes T_M $CD4^+$. Ainsi, dès la découverte de l'IL-21 et de l'IL-21R, un intérêt particulier a été porté sur cette nouvelle cytokine de la famille γc (30, 100, 101, 104). Il a été démontré que l'IL-21 possède une forte homologie avec l'IL-2 et plus particulièrement avec l'IL-15. Par ailleurs, il a été démontré que l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T activées par un Ac anti-CD3.

Au départ, la similitude entre l'IL-21 et l'IL-15, puis le fait que l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T nous ont incité à postuler que l'IL-21 est un facteur de prolifération et de survie pour les lymphocytes T_M $CD4^+$. Pour répondre à notre hypothèse, nous avons trois objectifs. Premièrement, de produire une protéine de fusion, IL-21Fc, pour avoir une source d'IL-21 et un moyen de détecter l'expression de l'IL-21R. Deuxièmement, de caractériser le patron d'expression de l'IL-21 et de l'IL-21R dans le système immunitaire et finalement, d'étudier les effets de l'IL-21 sur les cellules T_M $CD4^+$.

Toutefois, lors de la caractérisation du patron d'expression de l'IL-21 et de l'IL-21R, nous avons déterminé que l'IL-21R est exprimé constitutivement par les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$, tout comme l'IL-7 α . Par ailleurs, nous avons déterminé que l'IL-21 est aussi produite de façon constitutive par les cellules stromales, comme l'IL-7. Le patron d'expression de l'IL-21 et de l'IL-21R suggérait que l'IL-21 puisse agir sur la survie des cellules T naïves. En conséquence, nous avons émis une

nouvelle hypothèse stipulant que l'IL-21 est un nouveau facteur de survie pour les cellules T et qu'elle augmente la prolifération des cellules T lors d'une reconnaissance antigénique. Pour répondre à cette nouvelle hypothèse, nous avons modifié le troisième objectif pour finalement étudier les effets de l'IL-21 sur les lymphocytes T naïfs et activés.

CHAPITRE 2. MÉTHODOLOGIE

2.1 MÉTHODES UTILISÉES

Pour pouvoir répondre à notre hypothèse, il fallait produire une protéine de fusion, IL-21Fc, pour avoir une source d'IL-21 et un moyen pour suivre l'expression de l'IL-21R. Par la suite, les effets biologiques ont été analysés, ainsi que les voies de signalisation.

2.1.1 Production de l'IL-21Fc

Pour produire l'IL-21Fc, l'ADNc de l'IL-21 murine a été obtenu suite à une RT-PCR sur l'ARNm extrait de splénocytes stimulés pour 16h par un Ac anti-CD3 (1 µg/mL) pré-adhéré sur une plaque. Des amorces spécifiques pour l'IL-21 murine ont été utilisées pour amplifier l'ADNc de l'IL-21 (amorce 5' : 5'-AAC TGC AGG GTG GCA TGG AGA GGA CCC TT-3', incluant le site de restriction *Pst*I et les nucléotides 48 à 68 de l'IL-21 et l'amorce 3' : 5'-CGG GGT ACC GGA GAG ATG CTG ATG AAT CAT-3', comprenant les nucléotides 471 à 491 de l'IL-21 et le site de restriction *Kpn*I). L'amplification par PCR a été effectuée suite à 35 répétitions du cycle suivant : 94°C, 30s; 55°C, 30s; et 72°C, 30s. Le produit de PCR a été digéré par *Pst*I et *Kpn*I, puis ligué dans le vecteur CosFcLink prédigéré *Pst*I et *Kpn*I (Figure 5). Le vecteur CosFcLink est conçu pour produire des protéines de fusion liées à la portion Fc de l'IgG humain. La construction a ensuite été séquencée pour s'assurer de l'intégrité de la séquence et du maintien du cadre de lecture entre l'IL-21 et la portion Fc. Par une co-précipitation au phosphate de calcium, la protéine de fusion, IL-21Fc, a été produite en transfectant de façon transitoire des cellules Cos7 avec 10 µg du plasmide CosFcLink-IL-21. 24h après la transfection, les cellules ont été incubées pour 5 min dans 10% DMSO-PBS 1X, lavées et incubées pour 72h en milieu sans en sérum, opti-MEM (sans rouge phénol). Après 72h, le surnageant contenant l'IL-21Fc a été récupéré, puis quantifié par dot blot. De plus, la taille (45kDa) de l'IL-21Fc a aussi été confirmée par Western Blot.

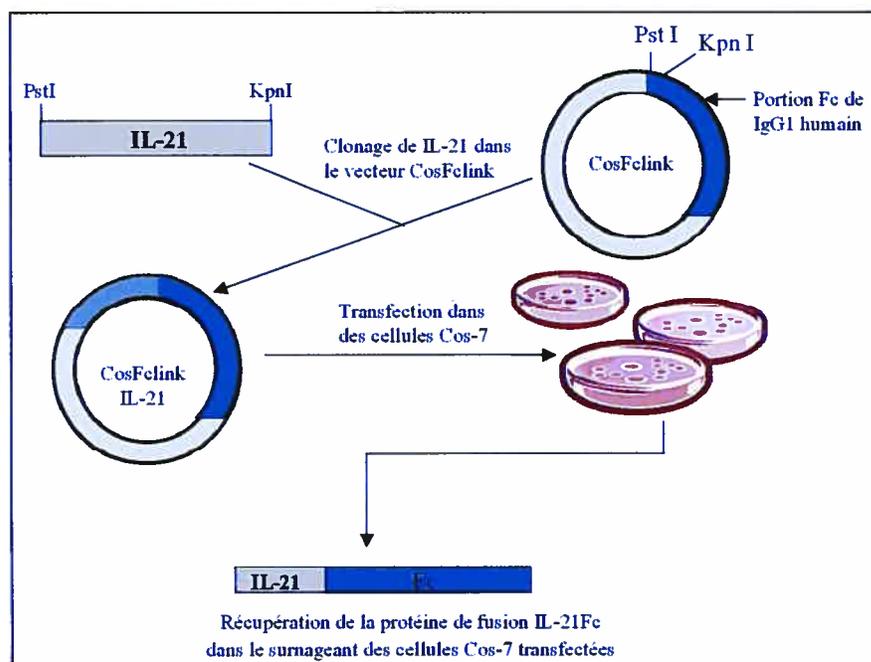


Figure 5. Schéma représentant la production de la protéine de fusion IL-21Fc. L'IL-21 (digérée PstI et KpnI) a été clonée dans le vecteur CosFclink (digéré PstI et KpnI). Le nouveau vecteur CosFclink-IL-21 a ensuite été transfecté dans des cellules Cos-7 pour permettre la production de la protéine de fusion IL-21Fc sécrétée dans le surnageant.

2.2.2 Marquage de l'IL-21R en utilisant l'IL-21Fc

Le marquage cellulaire a été effectué sur glace dans du FACSwash (DMEM sans rouge phénol enrichi de 3% de sérum de cheval inactivé à la chaleur, 0,03 M d'Hepes, et 0,1% de NaN₃). Pour déterminer l'expression de l'IL-21R, 10⁶ cellules de ganglions, de rate, de thymus ou de moelle osseuse ont été incubées avec 50 ng d'IL-21Fc ou d'IgG humain (contrôle négatif) pour 30 min sur glace. La liaison de l'IL-21Fc à l'IL-21R a été révélée suite à une incubation de 30 min avec un Ac anti-IgG (Fc spécifique) humain couplé à la biotine révélé avec de la streptavidine couplé à un fluorochrome.

2.2.3 RT-PCR pour déterminer l'expression de l'IL-21

20 000 cellules de différentes sous-populations ont été triées directement dans 1 mL de solution de TRIzol en utilisant le trieur de cellules FACSVantage SE. Dans quelques expériences, 200 000 cellules ont été triées dans 1 mL de sérum de veau fœtal (4°C), centrifugées à 300g pour 10 min et resuspendues dans 1 mL de TRIzol. L'ARN a été extrait selon les instructions du fabricant (Invitrogen). L'ADNc a été synthétisé par transcription inverse, puis la PCR a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques pour l'IL-21 murine (amorce 5' : 5'-AAC TGC AGG GTG GCA TGG AGA GGA CCC TT-3' et amorce 3' : 5'-CGG GGT ACC GGA GCG ATG CTG ATG AAT CAT-3') ou pour le contrôle interne HPRT (amorce 5' : 5'-GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC-3' et amorce 3' : 5'-CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA-3'). La réaction de PCR a été effectuée dans du tampon Taq 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,075 mM dNTPs, 10 pmol de chaque amorce et 0,5 U d'ADN polymérase Taq. L'amplification par PCR a été effectuée suite à 35 répétitions du cycle suivant : 94°C, 30s; 55°C, 30s; et 72°C, 30s.

2.3.4 Stimulation des cellules T

Avant la stimulation, les cellules de ganglions de souris C57BL/6 ont été resuspendues à 10⁷ cellules/mL. Par la suite, les cellules ont été incubées avec 0,5 µM de carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE) à 37°C pour 10 min, lavées dans du sérum de veau fœtal, puis resuspendues à 10⁶ cellules/mL dans du RPMI 1640 complet (enrichi de 10% de sérum de veau fœtal, 1 mM sodium pyruvate, 0,1 mM acides aminés non-essentiels, 10 mM Hepes, 10 µM β-mercaptoéthanol et de la pénicilline-streptomycine) (111). 2 x 10⁶ cellules marquées au CFSE ont été stimulées dans une plaque de 24 puits pré-adhérée de différentes concentrations (0,3, 0,6, 0,9 µg/mL) d'Ac anti-CD3, en présence ou non de 50 ng/mL d'IL-21Fc. Après 72h, les cellules ont été marquées avec les Ac anti-CD4 et anti-CD8 et analysées en cytométrie en flux.

2.3.5 Survie des cellules T *in vitro*

2 x 10⁶ cellules de ganglions ont été mises en culture sans stimulation dans du RPMI 1640 complet pour 24, 48 et 72h à 37°C en présence ou non de 25 ng/mL d'IL-21 recombinante (rIL-21) de souris ou de 1 ng/mL de rIL-7 de souris dans une plaque de 24 puits. À chaque temps, les cellules ont été récupérées, marquées avec des Ac anti-CD4, anti-CD8 et le 7-AAD, puis analysées en cytométrie en flux pour déterminer leur viabilité. Dans quelques expériences, les cellules T ont été purifiées en déplaçant les cellules B220⁺ et CMH de classe II⁺ à l'aide de billes magnétiques. Aussi, pour les expériences en présence d'un inhibiteur de la PI3-K, 10 μM de LY294002 a été ajouté à la culture (112). La taille des cellules a été analysée à l'aide de la moyenne du « Foward light scatter » en cytométrie en flux.

2.3.6 Marquage intracellulaire pour détecter l'expression de Bcl-2

Les lymphocytes ont été perméabilisés dans 0,1% de saponine diluée dans du FACSwash et marqués avec l'Ac anti-Bcl-2 FITC (clone 3F11) ou avec l'isotype contrôle FITC (clone A19-3) dilué dans 0,1% saponine/FACSwash pour 30 min à la température de la pièce. Après le marquage Bcl-2, les cellules ont été lavées une fois avec 0,1% saponine/FACSwash et deux fois en FACSwash seulement, puis le marquage de surface a été effectué.

2.3.7 Immunobuvardage de type Western

Les lymphocytes ont été mis en culture à 10⁶ cellules/mL sans stimulation en présence ou absence de 25 ng/mL de rIL-21 ou 1 ng/mL de rIL-7 pour 2h, 4h, 8h, 24h et 48h ou fraîchement isolés. À chaque temps, les cellules ont été récupérées et lysées dans un tampon de lyse (0,5% Nonidet P-40, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes, 1 mM PMSF et 1 μg/mL aprotinine) (113). Le lysat a été

clarifié par une centrifugation à 12 000 g pour 10 min à 4°C. Le lysat équivalent à 3×10^6 cellules a migré sur un gel de 15% de SDS-PAGE et les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été marquées avec des Ac anti-Bcl-x_L, anti-Akt, anti-phospho-Akt (Ser473), anti-phospho-Bad (ser112) et anti-GAPDH puis par la suite, avec un Ac anti-lapin ou souris conjugué à la peroxydase (HRP). Toutes les membranes ont été révélées en utilisant les réactifs pour Western Blot ECL et exposées sur un film Kodak.

CHAPITRE 3. ARTICLE

IL-21 PROMOTES T LYMPHOCYTE SURVIVAL

Valérie Ostiguy* and Nathalie Labrecque*²

*Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medicine, University of Montreal.

Running title: IL-21 is a survival factor for T cells

Keyword list: T lymphocytes

Cytokine Receptors

Cytokines

Cellular Activation

Apoptosis

¹ This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health and Research and Valorisation Recherche Québec to NL. NL is supported by a Canadian Institutes of Health Research new investigator scholarship and VO received a studentship from University of Montreal.

²Address correspondence and reprint requests to: Nathalie Labrecque,

Guy-Bernier Research Center,
Maisonneuve-Rosemont Hospital,
5415 boul. de l'Assomption,
Montreal, Qc, Canada HIT 2M4

E-mail address: XXXXXXXXXX

Abstract

IL-21 is a member of the type I cytokine family which uses the common gamma chain (γ_c) in their receptor. Since type I cytokines play crucial roles in the immune system, we have characterized the expression pattern of IL-21 and IL-21R in the mouse immune system in order to gain insight into the biological role of IL-21 in the immune system. IL-21R expression is tightly regulated during T and B cell development, and all mature T cells and B cells constitutively express IL-21R. During T cell development IL-21R is expressed by DN1 thymocytes and SP thymocytes. Interestingly, the expression pattern of IL-21R generally parallels that of IL-7R. Moreover, like IL-7, IL-21 is constitutively produced by stromal cells in lymphoid organs. The constitutive expression of IL-21 in lymphoid organs and of its receptor on mature T cells suggests a role for IL-21 in T cell homeostasis. Our results show that IL-21 is indeed a survival factor for resting CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Moreover, the co-stimulatory effect of IL-21 during T cell activation is mediated by an enhancement of T cell viability. Although IL-21 and IL-7 use γ_c in their receptors, their survival effect is dependent on the activation of different signaling molecules. IL-21 induced survival is dependent on the induction of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade while IL-7 effect is due to its ability to up-regulate Bcl-2 level. Our data provide evidence for a new role for IL-21 in the immune system which might be used to improve T cell homeostasis in immuno-compromised patients.

Introduction

Cytokines are crucial for T, B and NK cell development, survival and activation. Of particular importance are type I cytokine family members that signal through receptors containing γ_c^3 , which include interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 and the recently identified IL-21 (γ_c cytokines). Each of these cytokines binds to a receptor composed of one or two specific chain(s) (IL-2R α and β for IL-2, IL-4R α for IL-4, IL-7R α for IL-7, IL-9R α for IL-9, IL-15R α and IL-2R β for IL-15 and IL-21R α for IL-21) associated with γ_c (1). Importantly, most of these cytokines and receptors are not expressed constitutively on T lymphocytes but rather are induced following activation.

The development and life of lymphocytes are regulated by discrete γ_c cytokines that orchestrate homeostasis of the immune system. The use of mice deficient in cytokines and receptors of the γ_c family have revealed the importance of this family for lymphoid development, survival and activation. In particular, γ_c cytokines play pivotal roles in T cell development and in regulating mature T cell homeostasis. For example, IL-7 is essential for T cell development in the thymus (2-6). Moreover, the maintenance of the naïve T cell pool is tightly regulated by IL-7 which promotes naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cell survival (7-9) and allows homeostatic expansion of naïve T cells in lymphopenic situation (8-10). Interestingly, the survival and maintenance of CD8⁺ memory T lymphocytes (T_m) require another γ_c cytokine member, IL-15 (10-15), while no cytokine involved in the maintenance of CD4⁺ T_m cells have been identified yet. Distinct γ_c cytokines are involved in the regulation of T cell proliferation and differentiation following Ag encounter. Although γ_c

cytokines, like IL-2 and IL-15, are potent inducers of T cell proliferation during *in vitro* stimulation, they are dispensable *in vivo* (13, 14, 16-22). It is still unclear which cytokines drive *in vivo* expansion of Ag specific T cells. However, IL-2 is critical in the re-establishment of T cell homeostasis after Ag clearance (20, 21, 23). Concomitant with T cell death occurring at the end of the T cell response to Ag, some T lymphocytes further differentiate into T_m cells, and this process is again dependent on cytokines of the γ_c family. IL-7 was shown to promote CD8⁺ T_m generation (9) while no cytokines important for CD4⁺ T_m differentiation have been recognized yet. We postulated that the identification of a new member of this family, IL-21, may fill these aforementioned gaps.

IL-21R α was identified in the human genome database based on the presence of motifs common to type I cytokine receptors. IL-21R α has homology to IL-2R β , IL-4R α and IL-9R α chains (1, 24, 25). Moreover, IL-21R associates with γ_c which is required for signal transduction following ligand binding (26, 27). The ligand for IL-21R, IL-21, was identified by functional cloning (24), and sequence analysis predicted a four-helix-bundle type I cytokine related to IL-2, IL-4 and IL-15. IL-21R mRNA was detected in the thymus and spleen in both humans and mice (24, 25). Surface expression of IL-21R was detected on human B and NK cells (24). Resting human T cells were negative for IL-21R but expression could be up-regulated (at the mRNA level) following T cell activation (25). IL-21 mRNA was only detected by RT-PCR in activated CD4⁺ T cells and was absent in resting and activated human B lymphocytes and monocytes (24). Moreover, IL-21 production seems to be restricted to Th2 cells (28). IL-21 was shown to enhance T cell proliferation as well as B cell

and NK cell activation *in vitro* (24, 29). In addition, IL-21 inhibited IL-15 driven *in vitro* expansion of CD8⁺CD44⁺ memory-like T cells (24, 29).

Recently, mice deficient in IL-21R α have been generated (29, 30) and no obvious defect in T lymphocytes were observed in these mice. A recent paper has demonstrated a critical role for IL-21 in the regulation of B cell function since IL-21R α ^{-/-} mice have higher production levels of IgE, but lower IgG1, than wild-type animals following immunization (30). However, T cell homeostasis and T cell responses to Ag were not evaluated in IL-21R α deficient mice.

Since type I cytokines play crucial roles in the immune system, we undertook to better characterize the expression pattern of IL-21 and IL-21R in the immune system in order to gain insight into the biological role of IL-21 in the immune response. Interestingly, we have shown that there is a constitutive source of IL-21 in lymphoid organs while IL-21R is constitutively expressed by mature T lymphocytes. Moreover, we have shown that IL-21 efficiently promotes T cell survival of both resting and activated T cells. The ability of IL-21 to promote survival is mainly due to the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway.

Materials and Methods

Mice

Wild type C57BL/6 (B6) mice were bred under specific pathogen free conditions (SPF) at the Guy-Bernier Research Center or were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Quebec, Canada). Mice deficient for the TCR α chain ($C\alpha^{-/-}$) on a B6 background were bred at Guy-Bernier Research Center and have been described previously (31). All mice were analyzed between 6 and 10 weeks of age.

Production of IL-21Fc

Murine IL-21 cDNA was amplified by RT-PCR on mRNA extracted from anti-CD3 stimulated splenocytes as follows. Splenocytes were stimulated with anti-CD3 Abs (1 μ g/ml) coated on plates for 16h and RNA extracted using TRIzol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). cDNA was obtained by reverse transcription with the Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). PCR was then performed on cDNA using mouse IL-21 specific primers: 5' primer, 5'-AAC TGC AGG GTG GCA TGG AGA GGA CCC TT-3' (*Pst*I restriction site and nucleotides 48 to 68 of IL-21); 3' primer, 5'-CGG GGT ACC GGA GAG ATG CTG ATG AAT CAT-3' (nucleotides 471-491 of IL-21 and *Kpn*I restriction site). PCR amplification was done using 35 cycles: 94°C, 30s; 55°C, 30s; and 72°C, 30s. The PCR product was digested with *Pst*I and *Kpn*I and ligated into the *Pst*I-*Kpn*I digested CosFcLink vector. The CosFcLink vector is designed for production of fusion protein linked to the Fc portion of human IgG (kindly provided by R.-P. Sékaly). The construct was then sequenced to confirm IL-21 sequence identity and proper in frame fusion to IgG-Fc. IL-21Fc fusion protein was produced as follows. Cos-7 cells were transiently transfected with 10 μ g of

CosFcLink-IL21 by calcium phosphate co-precipitation. 24h after transfection, cells were incubated for 5 minutes in PBS-10% DMSO, washed and incubated for 72h in opti-MEM reduced-serum medium (w/o phenol red) (Invitrogen). After 72h, the supernatant containing IL-21Fc was recovered and quantified by dot blot analysis using human IgG as control. The dot blot was revealed with polyclonal anti-human IgG (Fc specific) and anti-rabbit IgG (whole molecule) coupled to peroxidase (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). The size of IL-21Fc (45 kDa) was confirmed by Western blot.

Antibodies and flow cytometry

The following Abs were used: anti-CD4 (clone L3/T4, Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada and clone CT-CD4, Caltag), anti-CD8 (clone 53.6.7, BD Biosciences, San Jose, CA and clone CT-CD8a, Caltag), anti-CD3 (clone 145-2C11, BD Biosciences), anti-TCR $\gamma\delta$ (clone GL3, BD Biosciences), anti-B220 (clone RA3-6B2, Caltag), anti- mouse IgM (Caltag), anti-IL7R α (clone A7R34, eBioscience, San Diego, CA), anti-CD25 (clone PC61 5.3, Caltag and clone 2541, Cedarlane), anti-CD44 (clone 1M7.8.1, Caltag), anti-CD62L (clone Mel-14, Caltag), anti-CD45RB (clone 16A, BD Biosciences), biotinylated goat F(ab')₂ anti-human IgG (Fc specific) (Cedarlane Laboratories), anti Bcl-2 (clone 3F11, BD Biosciences), anti-IA (clone AF16-120.1, BD Biosciences). Streptavidin-APC, streptavidin-PE-Cy7 or streptavidin-PerCP (BD Biosciences) was used to detect biotinylated Abs.

Cell stainings were performed on ice in FACSwash (DMEM without phenol red supplemented with 3% heat inactivated horse serum, 0.03M HEPES and 0.1% NaN₃). Samples were analyzed on a FACSCalibur or a FACScan using CellQuest software

(Becton Dickinson, Mountain View, CA) or WinMDI software (from Joseph Trotter, Scripps Clinic, La Jolla, CA)

Detection of IL-21R expression using IL-21Fc

To determine IL-21R expression, 10^6 cells were incubated with 50 ng of IL-21Fc or human IgG (as negative control) for 30 min on ice. Binding of IL-21Fc to IL-21R was detected by incubation for 30 minutes with biotin goat F(ab')₂ anti-human IgG (Fc specific) followed by streptavidin-APC or streptavidin-PerCP.

Intracellular Bcl-2 staining

Lymphocytes were permeabilized in 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) diluted in FACSwash and stained with FITC-conjugated anti-mouse Bcl-2 mAb (clone 3F11, BD Biosciences) or FITC-conjugated isotype control (clone A19-3) diluted in 0.1% saponin/FACSwash for 30 min at room temperature. After Bcl-2 staining, cells were washed once in 0.1% saponin/FACSwash and twice in FACSwash without saponin before surface staining.

RT-PCR

Lymphocytes subpopulations (20,000 cells) were sorted directly in 1 ml of TRIzol (Invitrogen) using a FACSVantage SE cell sorter (BD Biosciences). In some experiments, 200 000 cells were sorted in 1 ml fetal bovine serum (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) at 4°C, then centrifuged at 300 g for 10 min and resuspended in 1 ml of TRIZOL. RNA was also prepared from various organs using TRIzol. RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) and synthetic oligo(dT) oligonucleotides (Invitrogen). PCR was then performed using the following mouse IL-21 primers: forward, 5'-AAC TGC AGG GTG GCA TGG AGA GGA CCC TT-

3' and reverse, 5'-CGG GGT ACC GGA GCG ATG CTG ATG AAT CAT-3'. The primers used for the internal control HPRT were: forward, 5'-GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC-3' and reverse 5'-CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA-3'. PCR reactions were done in 1X Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.075 mM dNTPs, 10 pmol of each primer and 0.5 U Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich). PCR reactions were performed using 35 cycles: 94°C, 30s; 55°C, 30s, 72°C, 30s.

T cell stimulation

Before *in vitro* stimulation, lymph node cells from B6 mice were resuspended at 10⁷ cells/ml in PBS and incubated with 0.5 mM CFSE (Molecular probes, Eugene, OR) at 37°C for 10 min and then washed in fetal bovine serum (32). CFSE-labeled cells were resuspended at 10⁶ cells/ml in complete RPMI 1640 (supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 10 mM HEPES, 10 μM β-mercaptoethanol and penicillin-streptomycin, Invitrogen). 2 X 10⁶ CFSE-labeled cells were stimulated in 24-wells plate coated with different concentrations (0.3, 0.6, 0.9 μg/ml) of purified anti-CD3 Abs (clone 145-2C11, Cedarlane Laboratories) in presence or absence of IL-21Fc (50 ng/ml). After 72h, cells were stained with anti-CD4 and anti-CD8 Abs and samples run on a FACSCalibur (Becton Dickinson). The proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was analyzed using CellQuestPro software (Becton Dickinson). To obtain the number of cells present at each division, the total number of cells was multiplied by the percentage of cells in each division peak. Cell viability was determined using the death exclusion dye Trypan Blue (Invitrogen).

In vitro T cell survival assay

2 X 10⁶ lymph node cells were cultured in complete RPMI 1640 (Invitrogen) without stimulation for 24, 48 and 72h at 37°C in the presence or absence of 25 ng/ml mouse rIL-21 (R&D Systems, Minneapolis, MN) or 1 ng/ml mouse rIL-7 (Medicorp, Montreal, QC, Canada) in 24-wells plate. At each time point, cells were harvested and stained with anti-CD4 Abs, anti-CD8 Abs and 7-AAD (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry to determine cell viability. In some experiments, T cells were enriched by depletion of B220⁺ and MHC class II⁺ cells as follows. 10⁸ cells were incubated with Abs against B220 (RA3-6B2) and MHC class II (M5/114) for 30 min on ice, then washed and incubated with magnetic beads coated with anti-rat Abs (DynaL, Lake Success, NY or Medicorp) for 30 min. Cells coated with beads were then magnetically removed. After depletion, at least 95% of the cells were T lymphocytes. In some experiments, 10 µM of the PI3K inhibitor, LY294002 (Calbiochem, La Jolla, CA), was added to the culture (33).

Western blotting

Lymphocytes were cultured at 10⁶ cells/ml without stimulation for 2h, 4h, 8h, 24h and 48h in the presence or absence of rIL-21 25 ng/ml or rIL-7 1 ng/ml, or were freshly isolated. At various time, cells were harvested and lysed in 0.5% Nonidet P-40, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes, 1 mM PMSF and 1 µg/ml aprotinin (34). Lysates were cleared by centrifugation at 12 000g for 10 min at 4°C. Volume of lysates containing 3 X 10⁶ cells were run on 15% SDS-PAGE and proteins were transferred to Hybond ECL Nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences Inc., Baie d'Urfé, Quebec, Canada). Blots were probed with polyclonal anti-Bcl-x_L (BD Biosciences), anti-Akt (Cell Signaling Technology, Pickering,

Ontario, Canada), anti-phospho-Akt (Ser⁴⁷³; Cell Signaling Technology), anti-phospho-BAD (Ser¹¹²; Cell Signaling Technology) and anti-GAPDH Abs (Chemicon International Inc., Mississauga, ON, Canada) and subsequently, with anti-rabbit or mouse HRP-conjugated Abs (Cell Signaling Technology or Sigma-Aldrich). All blots were developed using ECL Western Blotting reagents (Amersham) and exposed to film (Amersham).

Results

Production and characterization of IL-21Fc

To better understand the role of IL-21 in immune responses it was critical to delineate the expression pattern of IL-21 and IL-21R. Unfortunately, no Ab against murine IL-21R is available and at the time we started this study no rIL-21 was commercially available. To have a source of IL-21 and a reagent to detect cell surface expression of IL-21R by flow cytometry, we produced a chimeric murine IL-21 protein fused to the Fc portion of human IgG (IL-21Fc) in Cos-7 cells. 96 h following transient transfection of Cos-7 cells, culture supernatants were tested for the presence of the fusion protein by Western blot using an anti-human Fc specific monoclonal Ab. The IL-21Fc chimeric protein had the expected molecular weight and the supernatant of Cos-7 cells typically yielded around 10-15 $\mu\text{g/ml}$ of IL-21Fc (data not shown). Before using this reagent to determine which cell types expressed the IL-21R, we tested that our IL-21Fc fusion protein had retained the biological activity of IL-21. Our IL-21Fc could effectively co-stimulate T cell proliferation when used at concentrations in the range of 10 ng/ml (data not shown). This reagent was then used to study the expression pattern of the IL-21R in immune cells and to delineate the biological effect of IL-21 on T cells.

Determination of the expression pattern of IL-21R

To identify which immune cells express IL-21R, we used our IL-21Fc protein since the binding of this protein to its receptor can be measured by FACS using Abs against the Fc portion of the fusion protein. First, we tested whether our IL-21Fc fusion protein can be used to detect IL-21R on B lymphocytes, a cell type known to express this receptor (24, 25). As shown in Fig 1A, our IL-21Fc reagent could efficiently

detect IL-21R on splenic B cells. We then asked whether mature T cells from lymph nodes or spleen expressed IL-21R. We were surprised to easily detect IL-21R expression by all T cells, including CD4⁺, CD8⁺ and $\gamma\delta^+$ T lymphocytes (Fig.1A). A previous report was unable to detect IL-21R expression by resting human T cells using a biotinylated form of IL-21 as a reagent to detect IL-21R expression (24). To make sure that our staining on T lymphocytes was not an artifact of our IL-21Fc fusion protein we sorted CD4⁺ and CD8⁺ T cells to determine if these cells transcribed the IL-21R gene. We could detect IL-21R mRNA by RT-PCR on RNA extracted from CD4⁺ or CD8⁺ sorted cells (data not shown) thus validating our observations that IL-21R is expressed by all subsets of T lymphocytes. Moreover, the binding of IL-21Fc to T cells was totally inhibited by the addition of rIL-21 (not shown). It is important to note that our IL-21Fc chimeric protein is dimeric and thus probably more avid than biotinylated IL-21 previously used by others to detect IL-21R expression. Furthermore, we have used two amplification steps to detect the binding of IL-21Fc, biotinylated anti-Fc Abs followed by fluorescently labeled-streptavidin. Knowing that mature T lymphocytes expressed IL-21R we then sought to determine at which step of their differentiation IL-21R expression originated on T cells. As shown in Fig. 1B, IL-21R expression was up-regulated in thymocytes at the single positive (SP) stage of T cell maturation. Interestingly, the expression of IL-21R on T cells is reminiscent of what is observed for IL-7R. The comparison of IL-7R and IL-21R expression on T cell subsets (Fig. 1A, and 1B) confirmed parallel expression of IL-21R and IL-7R during T cell differentiation. Since IL-7R expression is also tightly regulated during the different stages of maturation of double-negative (DN) immature thymocytes, we further investigated if IL-21R expression was also

occurring in immature thymocytes. Fig. 1D shows that the early immature DN1 (CD44⁺CD25⁻) subset of thymocytes expressed IL-21R at low level while expression is shut-off at the DN2 stage. The observation that IL-21R expression is tightly regulated like IL-7R during T cell maturation prompted us to determine if a similar phenomenon was occurring during B cell development in the bone marrow. Interestingly, IL-21R is present at every stage of B cell development in the bone marrow from pre/pro B cells (B220^{low}, surface IgM⁻) to mature B cells (B220⁺, surface IgM⁺) as illustrated in Fig 1C. In contrast to IL-7R expression, IL-21R expression is not down-regulated on mature bone marrow B lymphocytes (Fig 1C). Since others have reported up-regulation of IL-21R expression following T cell activation, we further investigated if IL-21R expression was increased on T lymphocytes following anti-CD3 stimulation. As shown in Fig. 1E, IL-21R expression is increased in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells after stimulation, contrasting with IL-7R down-regulation (53).

Determination of the pattern of expression of IL-21

In order to get a hint on a possible role for this cytokine in T cell survival and regulation of immune responses we then determined which cell types are expressing the cytokine IL-21. Until now, IL-21 has been detected only in activated CD4⁺ T cells (24, 25) and this expression is probably further restricted to the Th2 subset (28). However, the similarity in the expression pattern of IL-21R and IL-7R and the constitutive expression of IL-21R by mature thymocytes and T lymphocytes suggest that IL-21 might be important for T cell survival or for the rapid induction of naïve T cell proliferation following Ag recognition. However, in order to attribute these functions to IL-21, constitutive expression of IL-21 in the immune system must be

demonstrated. Moreover, the identification of the cell types secreting IL-21 will help to understand the *in vivo* function of this cytokine. We therefore undertook the characterization of IL-21 expression in the mouse immune system. At first, we were puzzled with the observation that IL-21 message could be readily detected in the lymph nodes of non-immunized mice kept in SPF (data not shown). This observation prompted us to analyze IL-21 expression in CD4⁺, CD8⁺ and B lymphocytes from non-immunized mice kept in SPF; Fig. 2A shows that IL-21 message was only detected in CD4⁺ T cells. We then sorted CD4⁺ T cells with a naïve (CD25⁻CD44⁻CD62L⁺) or activated/memory (CD25⁺CD44⁺) phenotype and detected IL-21 mRNA only in cells with an activated/memory phenotype (Fig. 2B). As shown in Fig. 2C, other CD4⁺ T cell subsets also express IL-21 message, these included memory (CD25⁻CD45RB^{low}) and regulatory (CD25⁺CD45RB^{low}) CD4⁺ T lymphocytes. At this stage, it is still not clear if IL-21 is constitutively expressed by these subsets or if they are currently responding to environmental Ags.

Although the expression of IL-21 by different subsets of CD4⁺ T lymphocytes of non-immunized mice kept in SPF could account for the detection of IL-21 message in the lymph nodes of these mice, it was still important to determine if other cell types could express IL-21. Since we knew that CD4⁺ T lymphocytes were positive for IL-21 mRNA, we have analyzed IL-21 expression in lymph nodes coming from mice deficient in $\alpha\beta$ T cells ($C\alpha^{-/-}$) and thus lacking CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. As shown in Fig. 2D, IL-21 mRNA was easily detected in lymph nodes of $C\alpha^{-/-}$ mice. We could also detect IL-21 mRNA in lymph nodes derived from RAG deficient animals (lacking $\alpha\beta^{+}$ T cells, $\gamma\delta^{+}$ T cells and B cells, data not shown). These results strongly suggest that IL-21 is constitutively made by lymph node stromal cells since

we know that IL-21 message is undetectable in B cells (Fig. 2A), $\gamma\delta$ T cells, monocytes and dendritic cells (Fig. 2E). We were also able to detect IL-21 mRNA in spleen and thymus, but not kidneys, from $C\alpha^{-}$ mice (Fig. 2D) and RAG deficient mice (not shown) suggesting that stromal cells of all lymphoid organs are positive for IL-21 mRNA expression.

IL-21 enhances T cell stimulation via survival

Previous reports have shown that IL-21 co-stimulates T cell proliferation to anti-CD3 Abs (24) but it is still unknown if T cell proliferation of both $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells is enhanced by IL-21. Since this is an important issue, we evaluated if IL-21 can co-stimulate proliferation of both $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells using CFSE-labeled lymph node cells. As reported by others, we detected enhanced thymidine incorporation when IL-21 was added to lymph node cells stimulated with anti-CD3 Abs (not shown). Interestingly, this was not associated with an increase in the number of cell divisions when we used CFSE-labeled cells to track $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cell proliferation (Fig. 3A). This apparent discrepancy was reconciled when we estimated the total T cell number, the number of cells present at each division and the viability of cells at the end of the culture (Fig. 3B-D). As shown in Fig. 3B, there were more cells at each division when IL-21 was added to the culture. This was statistically significant ($p < 0.05$) for division 1 to 3 in $CD4^{+}$ T cells and for division 1-2 in $CD8^{+}$ T lymphocytes. Moreover, the number of recovered cells at the end of the culture was higher when IL-21 was added (Fig. 3C) and the percentage of viable cells was also increased in the presence of IL-21 when sub-optimal dose of anti-CD3 Abs was used (Fig. 3D). These results suggest that the principal effect of IL-21 on T cells

stimulated with sub-optimal dose of anti-CD3 Abs consists in enhancing T cell survival but not proliferation.

IL-21 promotes naïve T cell survival via activation of the PI3K signaling pathway

The ability of IL-21 to promote T cell survival during T cell activation and the constitutive expression of IL-21R by T cells prompted us to evaluate if IL-21 can also promote the *in vitro* survival of naïve T lymphocytes. Purified T cells were cultured without stimulation in complete RPMI with or without rIL-21 (25 ng/ml) and cell viability was followed over 72h using 7-AAD. The addition of IL-21 to the culture significantly enhanced T cell survival (Fig. 4A). After 72h of culture, only 20% of CD4⁺ T cells were viable while 60% of viable cells were observed in presence of rIL-21. The survival effect was even better in CD8⁺ T lymphocytes, where after 72h T cell viability was reduced to 30% in the absence of IL-21 while 85% of the cells were alive when IL-21 was added to the culture. This effect is not due to the induction of T cell proliferation by IL-21 since we could not detect any increase in BrdU incorporation in these experiments (data not shown).

We then investigated by which biochemical pathway IL-21 mediates T cell survival. It is known that signaling via cytokine receptors can activate the PI3K pathway which is known to enhance survival signal. We therefore tested whether the addition of a highly specific PI3K inhibitor (33), LY294002, to the culture could inhibit the effect of IL-21 on T cell survival. In the presence of LY294002 (10 μ M), IL-21 was unable to promote the survival of CD4⁺ and CD8⁺ T cell indicating that signaling via the IL-21R leads to the activation of the PI3K pathway (Fig. 4B). Interestingly, addition of LY294002 had no effect on IL-7 mediated T cell survival (Fig. 4B) suggesting that signaling via IL-7R differs from IL-21R. This was somewhat unexpected since both

IL-7R and IL-21R share the γ_c chain in their receptors. One possibility is that the survival effect of IL-7 is due to its known ability to increase Bcl-2 expression level (35). To determine if Bcl-2 was up-regulated in the presence of IL-21, cells were cultured for 72h in the presence or absence of IL-21 or IL-7. At 72h, cells were harvested and Bcl-2 expression was measured by intracellular staining followed by flow cytometry analysis. Bcl-2 expression was maintained to the level of freshly isolated *ex vivo* T cells when cells were cultured with IL-21 while its expression decreases when no cytokine was added (Fig. 5A). A different picture was seen with IL-7, where Bcl-2 expression was increased 2.5-fold compared to the level observed in freshly isolated T cells (Fig. 5A). These results suggest that IL-21 mediates T cell survival by activating the PI3K pathway and maintaining Bcl-2 level while IL-7 survival signals depend mainly on the up-regulation of Bcl-2 level independently of PI3K activation.

Signaling via cytokine receptors utilizing γ_c can also lead to an increase in Bcl-X_L level but in our hands neither IL-7 nor IL-21 led to up-regulation of this anti-apoptotic protein (Fig. 5B). We have also confirmed that the PI3K pathway is induced in T cells cultured in the presence of IL-21 by looking at the level of Akt and Bad phosphorylation which are downstream targets of PI3K. As shown in Fig. 5C and D, the level of Akt and Bad phosphorylation were both increased in presence of IL-21 and IL-7. Interestingly, IL-21 induced phosphorylation of Akt is faster and stronger than for IL-7 (Fig. 5C). Moreover, Bad phosphorylation is more sustained with IL-21 than IL-7 (Fig. 5D). The induction of the PI3K signaling pathway by IL-7 in T cells is well documented (35-39) and is not essential for IL-7 mediated T cell survival (35). However, the induction of the PI3K signaling pathway by IL-7 is

critical for the maintenance of the metabolic state of the cell and thus of its size (known as the trophic effect) (35). Since IL-21 activates the PI3K signaling pathway, we have also determined if IL-21 can maintain the size of T cells and if this effect was dependent on the activation of the PI3K signaling cascade. As shown in Fig. 6, IL-21 is able to maintain cellular size and this effect was lost when LY294002 was added to the culture.

Discussion

We show that IL-21R is constitutively expressed by mature T cells and that IL-21 is also constitutively produced in lymphoid organs. This is reminiscent of the situation for IL-7, a key cytokine involved in T cell development and T cell homeostasis. Our data indicate that IL-21 co-stimulatory activity during T cell activation is mediated via an enhancement of T lymphocyte survival. Furthermore, we have shown that IL-21 is able to promote naïve T cell survival and size maintenance by inducing the activation of the PI3K signaling pathway.

IL-21 and IL-21R expression

Our data elucidate the expression pattern of IL-21/IL-21R which will help to understand the role of IL-21 in the immune system. We have shown that IL-21R expression is tightly regulated during T cell development which leads to constitutive expression of IL-21R by mature T lymphocytes (in the thymus and secondary lymphoid organs). This expression pattern of IL-21R is similar to that of IL-7R α . The constitutive expression of IL-21R by mature thymocytes suggests a potential role for IL-21 in CD4SP and CD8SP thymocyte survival or differentiation during their prolonged stay in the thymic medulla. It is interesting to note that the phenotype of T cell differentiation in the γ_c -deficient mice is more severe than in IL-7- or IL-7R α -deficient mice; $\gamma_c^{-/-}$ mice have a more severe reduction in the number of CD8SP thymocytes than IL-7 $^{-/-}$ or IL-7R $\alpha^{-/-}$ mice (4, 40-42) suggesting that IL-21 may promote the survival of CD8SP thymocytes in IL-7 $^{-/-}$ and IL-7R $\alpha^{-/-}$ mice. No defect in thymocyte differentiation has been reported in IL-21R-deficient mice although detailed analyses of their thymic phenotype have not been published yet (29, 30). It is

nonetheless possible that IL-7 compensates for the lack of IL-21 signaling during T cell differentiation in IL-21R deficient mice. Moreover, our observation that IL-21 message is also present in the thymus suggests a possible role for IL-21 in thymocyte differentiation and/or survival. Interestingly, we have observed that CD8⁺SP thymocytes can be kept alive in culture for over 6 days in the presence of IL-21. However, IL-21 did not have an effect on CD4⁺SP thymocytes (data not shown). Thus, it is very likely that IL-21 will play an important role in the survival, and maybe differentiation, of SP thymocytes during their prolonged stay in the thymic medulla before their exit to the periphery. Furthermore, the only cytokines expressed in the thymus are IL-7 and IL-21 and IL-7R α and IL-21R are the only γ_c cytokine receptors expressed by mature SP thymocytes (8, 43, 44).

The constitutive expression of IL-21R by CD4⁺ and CD8⁺ T cells is intriguing since most type I cytokine receptors are induced following T cell activation. IL-21R expression is similar to another type I cytokine receptor, IL-7R α , that plays a critical role in T cell survival and in the induction of homeostatic proliferation in lymphopenic mice (7-10). The expression of IL-21R by T cells is probably important for their survival and/or to allow them to be responsive to IL-21 as soon as an immune response is elicited. It is very likely that IL-21R signals participate in T cell survival since IL-21 is constitutively produced in lymphoid organs. Interestingly, we have shown that IL-21 can prolong T cells life *in vitro*. No defect in the number of T cells in lymphoid organs has been reported in IL-21R^{-/-} mice but T cell survival was never assessed directly in those mice (i.e. determination of the half-life of peripheral T cells in the absence of thymic output).

IL-21 co-stimulates T cells via survival

Our study also highlights the mechanism by which IL-21 co-stimulates T cell proliferation. Unlike other type I cytokines, IL-21 does not increase the number of cell divisions but increases the clonal burst size by enhancing T cell viability. It will be interesting to investigate if IL-21 promotes only the survival of resting T cells or also enhances the survival of activated T cells in these cultures. Although IL-21 does not increase the proliferation rate of T cells, the ability of IL-21 to promote T cell survival might be beneficial towards increasing T cell expansion and differentiation of effector cells into memory cells during an immune response.

IL-21 promotes naive T cell survival via the PI3K pathway while IL-7 mediates survival via up-regulation of Bcl-2

We also determined the intracellular signaling pathway involved in the promotion of T cell survival by IL-21. We show for the first time that IL-21 binding to its receptor on T cells leads to the activation of the PI3K signaling pathway. Interestingly, IL-21 mediated survival of T cells is dependent of a different biochemical pathway than IL-7. The inhibition of the PI3K pathway, using the highly specific inhibitor LY294002, abrogates the survival effect of IL-21 on T lymphocytes while it does not interfere with T cell survival mediated by IL-7. Since both IL-21 and IL-7 induce the phosphorylation of Akt and Bad which are downstream targets of PI3K, it indicates that the activation of PI3K is not necessary for the induction of T cell survival by IL-7 while it is absolutely necessary for IL-21. IL-7 is probably able to induce T cell survival without the induction of the PI3K pathway due to its ability to up-regulate Bcl-2 level in T cells while IL-21 will only maintain normal levels of Bcl-2 in T cells. Moreover, like IL-7, IL-21 was able to prevent cellular atrophy suggesting that IL-21

not only promotes survival but also metabolic activity of T cells. The concomitant survival and trophic effects of IL-21 on T lymphocytes is probably crucial for the maintenance of a pool of metabolically active T cells that are ready to respond rapidly to antigenic challenge. These properties render IL-21 very attractive to use as a therapeutic agent to help maintain the T cell pool in patients with thymic atrophy.

Our results on the ability of IL-21 to promote T cell survival contrasts with the recently described effect of IL-21 on B lymphocytes (45). It was shown that IL-21 promotes apoptosis of purified B cells when they are cultured *in vitro* without stimulation. The apoptosis of B cells in presence of IL-21 correlates with a decrease in the level of Bcl-X_L. The differential effect of IL-21 on T cells versus B cells could also be due to the use of different doses of IL-21 in the assay. For T cells, we used from 5 to 20 ng/ml of IL-21 while 200 ng/ml of IL-21 was used for B cells. It is thus possible that IL-21 would induce T cell death if used at higher doses, but we could not see any induction of T cell death when we used IL-21 at 200 ng/ml. The ability of IL-21 to induce either T cell survival or B cell death probably results from the differential coupling of the IL-21R to the signaling machinery in B cells versus T lymphocytes. Moreover, another type I cytokine, IL-2, can induce either T cell growth or promote death of activated T cells (46-48) suggesting that signaling via cytokine receptor will differ between cell types and activation status. Further studies should help to resolve how IL-21 induces death in B cells and survival in T cells.

The ability of IL-21 to promote T cell survival should be helpful in the treatment of immunodeficient patients in order to maintain a pool of T cells. IL-21 might be a better therapeutic agent than IL-7 since it was recently shown that treatment of naïve T cells with IL-7 render them permissive to HIV infection (49, 50). Moreover, the use

of IL-7 in therapy might be hampered by its ability to increase Bcl-2 expression in T cells which might be detrimental to T cell activation by inhibiting cell cycle progression and NFAT activation (51, 52).

Acknowledgements

We thank Julie Rooney for technical assistance and the members of the laboratory for helpful discussions. We thank Sophie Ouellet for cell sorting and R.-P. Sékaly for kindly providing the plasmid CosFclink. We are grateful to Claude Perreault and Elliot Drobetsky for critical reading of the manuscript.

References

1. Vosshenrich, C. A., and J. P. Di Santo. 2001. Cytokines: IL-21 joins the gamma(c)-dependent network? *Curr Biol* 11:R175.
2. Peschon, J. J., P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, and et al. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955.
3. von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach, and R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519.
4. Maki, K., S. Sunaga, Y. Komagata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K. Yokomuro, J. I. Miyazaki, and K. Ikuta. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7172.
5. Moore, T. A., U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, and A. Zlotnik. 1996. Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 $-/-$ mice. *J Immunol* 157:2366.
6. He, Y. W., and T. R. Malek. 1996. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* 184:289.
7. Vivien, L., C. Benoist, and D. Mathis. 2001. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 13:763.
8. Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8732.

9. Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426.
10. Goldrath, A. W., P. V. Sivakumar, M. Glaccum, M. K. Kennedy, M. J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E. A. Butz. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 195:1515.
11. Lodolce, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669.
12. Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce, and J. J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191:771.
13. Schluns, K. S., K. Williams, A. Ma, X. X. Zheng, and L. Lefrancois. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168:4827.
14. Becker, T. C., E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma, and R. Ahmed. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195:1541.
15. Ku, C. C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Murrack. 2000. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288:675.

16. Leonard, W. J., E. W. Shores, and P. E. Love. 1995. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* 148:97.
17. Smith, K. A. 1984. Interleukin 2. *Annu Rev Immunol* 2:319.
18. Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, and R. Gallo. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193:1007.
19. Kundig, T. M., H. Schorle, M. F. Bachmann, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, and I. Horak. 1993. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 262:1059.
20. Khoruts, A., A. Mondino, K. A. Pape, S. L. Reiner, and M. K. Jenkins. 1998. A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism. *J Exp Med* 187:225.
21. Kneitz, B., T. Herrmann, S. Yonehara, and A. Schimpl. 1995. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 25:2572.
22. Li, X. C., P. Roy-Chaudhury, W. W. Hancock, R. Manfro, M. S. Zand, Y. Li, X. X. Zheng, P. W. Nickerson, J. Steiger, T. R. Malek, and T. B. Strom. 1998. IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection. *J Immunol* 161:890.
23. Willerford, D. M., J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F. W. Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521.

24. Parrish-Novak, J., S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J. L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S. R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F. J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R. D. Holly, and D. Foster. 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408:57.
25. Ozaki, K., K. Kikly, D. Michalovich, P. R. Young, and W. J. Leonard. 2000. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11439.
26. Asao, H., C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, and K. Sugamura. 2001. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167:1.
27. Habib, T., S. Senadheera, K. Weinberg, and K. Kaushansky. 2002. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* 41:8725.
28. Wurster, A. L., V. L. Rodgers, A. R. Satoskar, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins, and M. J. Grusby. 2002. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into Interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* 196:969.
29. Kasaian, M. T., M. J. Whitters, L. L. Carter, L. D. Lowe, J. M. Jussif, B. Deng, K. A. Johnson, J. S. Witek, M. Senices, R. F. Konz, A. L. Wurster, D.

- D. Donaldson, M. Collins, D. A. Young, and M. J. Grusby. 2002. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16:559.
30. Ozaki, K., R. Spolski, C. G. Feng, C. F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H. C. Morse, 3rd, C. Liu, P. L. Schwartzberg, and W. J. Leonard. 2002. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298:1630.
31. Philpott, K. L., J. L. Viney, G. Kay, S. Rastan, E. M. Gardiner, S. Chae, A. C. Hayday, and M. J. Owen. 1992. Lymphoid development in mice congenitally lacking T cell receptor alpha beta-expressing cells. *Science* 256:1448.
32. Bird, J. J., D. R. Brown, A. C. Mullen, N. H. Moskowitz, M. A. Mahowald, J. R. Sider, T. F. Gajewski, C. R. Wang, and S. L. Reiner. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9:229.
33. Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241.
34. Vella, A. T., S. Dow, T. A. Potter, J. Kappler, and P. Murrack. 1998. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3810.
35. Rathmell, J. C., E. A. Farkash, W. Gao, and C. B. Thompson. 2001. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* 167:6869.
36. Pallard, C., A. P. Stegmann, T. van Kleffens, F. Smart, A. Venkitaraman, and H. Spits. 1999. Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5

- pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity* 10:525.
37. Corcoran, A. E., F. M. Smart, R. J. Cowling, T. Crompton, M. J. Owen, and A. R. Venkitaraman. 1996. The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *Embo J* 15:1924.
38. Venkitaraman, A. R., and R. J. Cowling. 1994. Interleukin-7 induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the alpha chain of the interleukin-7 receptor. *Eur J Immunol* 24:2168.
39. Dadi, H. K., and C. M. Roifman. 1993. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by ligation of the interleukin-7 receptor on human thymocytes. *J Clin Invest* 92:1559.
40. Di Santo, J. P., I. Aifantis, E. Rosmaraki, C. Garcia, J. Feinberg, H. J. Fehling, A. Fischer, H. von Boehmer, and B. Rocha. 1999. The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development. *J Exp Med* 189:563.
41. Cao, X., E. W. Shores, J. Hu-Li, M. R. Anver, B. L. Kelsall, S. M. Russell, J. Drago, M. Noguchi, A. Grinberg, E. T. Bloom, and et al. 1995. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2:223.
42. Kee, B. L., G. Bain, and C. Murre. 2002. IL-7Ralpha and E47: independent pathways required for development of multipotent lymphoid progenitors. *Embo J* 21:103.

43. Maraskovsky, E., L. A. O'Reilly, M. Teepe, L. M. Corcoran, J. J. Peschon, and A. Strasser. 1997. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* 89:1011.
44. Sudo, T., S. Nishikawa, N. Ohno, N. Akiyama, M. Tamakoshi, and H. Yoshida. 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9125.
45. Mehta, D. S., A. L. Wurster, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins, and M. J. Grusby. 2003. IL-21 Induces the Apoptosis of Resting and Activated Primary B Cells. *J Immunol* 170:4111.
46. Lenardo, M. J. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858.
47. Van Parijs, L., Y. Refaeli, J. D. Lord, B. H. Nelson, A. K. Abbas, and D. Baltimore. 1999. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11:281.
48. Kelly, E., A. Won, Y. Refaeli, and L. Van Parijs. 2002. IL-2 and related cytokines can promote T cell survival by activating AKT. *J Immunol* 168:597.
49. Ducrey-Rundquist, O., M. Guyader, and D. Trono. 2002. Modalities of interleukin-7-induced human immunodeficiency virus permissiveness in quiescent T lymphocytes. *J Virol* 76:9103.
50. Steffens, C. M., E. Z. Managlia, A. Landay, and L. Al-Harthi. 2002. Interleukin-7-treated naive T cells can be productively infected by T-cell-adapted and primary isolates of human immunodeficiency virus 1. *Blood* 99:3310.

51. Linette, G. P., Y. Li, K. Roth, and S. J. Korsmeyer. 1996. Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9545.
52. Shibasaki, F., E. Kondo, T. Akagi, and F. McKeon. 1997. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* 386:728.
53. Franchimont, D., J. Galon, M.S. Vacchio, S. Fan, R. Visconti, D.M. Frucht, V. Geenen, G.P. Chrousos, J.D. Ashwell, and J.J. O'Shea. 2002. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor α . *J Immunol* 168:2212.

Footnotes

³ Abbreviations used in this paper: γ_c , common gamma chain; IL-21R, IL-21 receptor; Tm, memory T cell; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; B6, C57BL/6; SPF, specific pathogen free; $C\alpha^{-/-}$, TCR α chain deficient; 7-AAD, 7-amino-actinomycin D; SP, single positive; DN, double negative; BrdU, bromo-deoxyuridine; DP, double positive.

Figure Legends

FIGURE 1. IL-21R expression on lymphocyte subsets. *A*, IL-21R and IL-7R α expression on CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ ⁺ and B cells. Lymph node cells or splenocytes were stained with IL-21Fc fusion protein or with anti-IL-7R α Ab in combination with anti-CD4, anti-CD8, anti-TCR $\gamma\delta$, anti-CD3, anti-B220 and anti-IgM Abs. IL-21R and IL-7R α surface expression (thick lane) is shown for the different subsets relatively to isotype control staining (thin lane, human IgG for IL-21R and rat IgG2a for IL-7R α). *B*, IL-21R and IL-7R α expression on double negative (DN), double positive (DP), CD4⁺ single positive (CD4SP) and CD8⁺ single positive (CD8SP) thymocytes. Thymocytes were stained for surface IL-21R or IL-7R α in combination with anti-CD4 and anti-CD8 mAbs. *C*, IL-21R and IL-7R expression on bone marrow small pre, immature, and mature B cells. Bone marrow cells were stained for surface IL-21R or IL-7R α in combination with anti-B220 and anti-IgM Abs. *D*, IL-21R and IL-7R α expression on DN thymocyte sub-populations. DN thymocyte subsets were analyzed by excluding lineage positive cells and stained with anti-CD44 and anti-CD25 Abs. IL-21R and IL-7R α expression is shown on DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) and DN4 (CD44⁻CD25⁻). *E*, IL-21R expression on activated T cells. T cells were activated with 1 μ g/ml of anti-CD3 Abs coated on plate for 72h and then stained for IL-21R expression using IL-21Fc.

FIGURE 2. IL-21 expression in lymphoid cells and organs. *A*, IL-21 mRNA expression by CD4⁺, CD8⁺ and B cells. IL-21 and HPRT specific RT-PCRs were performed on RNA extracted from sorted CD4⁺, CD8⁺ or B220⁺ lymph node cells. *B*,

Expression of IL-21 by CD4 memory/activated CD4⁺ T cells. IL-21 and HPRT specific PCRs were performed on RNA extracted from CD4⁺CD25⁻CD44⁻CD62L⁻ (naive) and CD4⁺CD44⁺, CD4⁺CD25⁻CD44⁺, CD4⁺CD25⁺CD44⁺ (memory/activated) sorted cells. *C*, IL-21 mRNA expression by different subsets of CD4⁺ T lymphocytes. IL-21 and HPRT specific PCRs were performed on RNA extracted from 10 000 CD4⁺CD25⁻C45RB^{low} (memory) and CD4⁺CD25⁺C45RB^{low} (regulatory) sorted cells. *D*, Constitutive expression of IL-21 by non-lymphoid cells. RNA was extracted from lymph node (LN), spleen (S), thymus (T) and kidney (K) of B6 and C α ^o mice using TRIZOL. *E*, Lack of expression of IL-21 by dendritic cells, monocytes and $\gamma\delta$ T cells. RNA was extracted from 20 000 sorted dendritic cells (CD11c⁺ClassII⁺), monocytes (CD11b⁺ClassII⁺) and $\gamma\delta$ T cells. RT-PCRs were performed using specific IL-21 and HPRT primers. Data are representative of at least 3 independent experiments.

FIGURE 3. Effect of IL-21 on T cell proliferation is mediated by enhanced cell survival. *A*, Proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells stimulated with anti-CD3 Abs in presence or absence of IL-21Fc. CFSE-labeled lymph node cells were *in vitro* stimulated with anti-CD3 Abs (0.6 μ g/ml) for 72h in presence or absence of IL-21Fc (50 ng/ml). CFSE profiles gated on CD4⁺ or CD8⁺ T cells are shown for cells stimulated in the presence of IL-21Fc (bold line) or absence (thin line). The data are representative of eight independent experiments. *B*, Number of cells present at each division in absence or presence of IL-21Fc (50 ng/ml). The number of cells in each division was obtained by multiplying the total number of cells by the percentage of cells in each division. *C*, Total cell number recovery at the end of the 72h of anti-CD3

stimulation in the presence or not of IL-21Fc. *D*, Cell viability following anti-CD3 stimulation in presence or absence of IL-21. The percentage of viability in the presence or absence of IL-21Fc was obtained with Trypan blue staining. Statistical differences were determined with a Student's *t* test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

FIGURE 4. IL-21 promotes T cell survival by activating the PI3K pathway. *A*, Viability of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the presence or absence of rIL-21 or rIL-7. Purified T cells from B6 mice were cultured *in vitro* for 72h without stimulation in the presence or absence of rIL-21 (25 ng/ml) or rIL-7 (1 ng/ml). The percentage of viability was obtained by staining with 7-AAD in combination with anti-CD4 and anti-CD8 Abs at different time points. *B*, Viability of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the presence of the PI3K pathway inhibitor, LY294002 (LY). Total lymph node cells were cultured *in vitro* for 72h without stimulation in the presence or absence of rIL-21 (25 ng/ml) or rIL-7 (1 ng/ml) and in the presence or absence of LY294002 (10 μ M). The percentage of viability was obtained by staining with 7-AAD in combination with anti-CD4 and anti-CD8 Abs at different time points. Each experiment was done in triplicate and the data are representative of at least three independent experiments. Statistical differences were evaluated with a Student's *t* test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

FIGURE 5. IL-21 biochemical pathway promoting T cell survival. *A*, Bcl-2 expression by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the presence or absence of rIL-21 or rIL-7. Total lymph node cells were cultured *in vitro* for 72h without stimulation in the presence or absence of rIL-21 (25 ng/ml) or rIL-7 (1 ng/ml). Bcl-2 expression was

determined by intracellular staining with anti-Bcl-2 FITC or isotype control FITC Abs followed by surface staining with anti-CD4 and anti-CD8 Abs. *B*, Bcl-x_L expression by lymphocytes in the presence or absence of rIL-21 or rIL-7. *C*, Phosphorylation of Ser⁴⁷³ of Akt in the presence or absence of rIL-21 or rIL-7. *D*, Phosphorylation of Bad (Ser¹¹²) in the presence or absence of rIL-21 or rIL-7. *B*, *C*, *D*, Levels of Bcl-x_L, phospho-Akt (p-Akt) and phospho-Bad (p-Bad) were determined by Western blot on cell lysates that were made from total lymph node cells cultured *in vitro* for the indicated time in the presence or absence of rIL-21 (25 ng/ml) or rIL-7 (1 ng/ml), or from freshly isolated lymphocytes. Membranes were then stripped and re-hybridized with Abs against GAPDH or Akt to control for loading.

FIGURE 6. IL-21 promotes cell size maintenance. Total lymph node cells were cultured *in vitro* for 72h without stimulation in the presence or absence of rIL-21 (25 ng/ml) or rIL-7 (1 ng/ml) and in the presence or absence of LY294002 (10 μM). The size of cells was determined by analysis of the mean forward light scatter by FACS. This experiment was done in duplicate and is representative of at least three independent experiments. Statistical differences were evaluated with a Student's *t* test (***p* < 0.01).

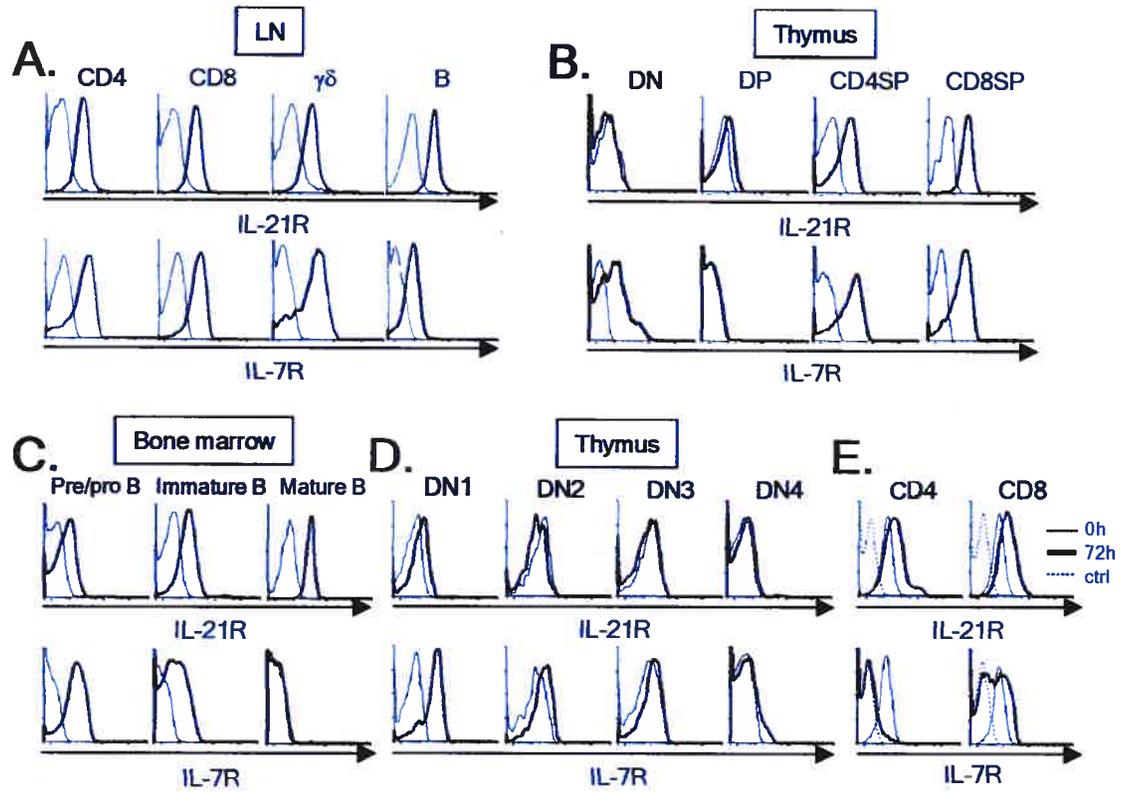


FIGURE 1

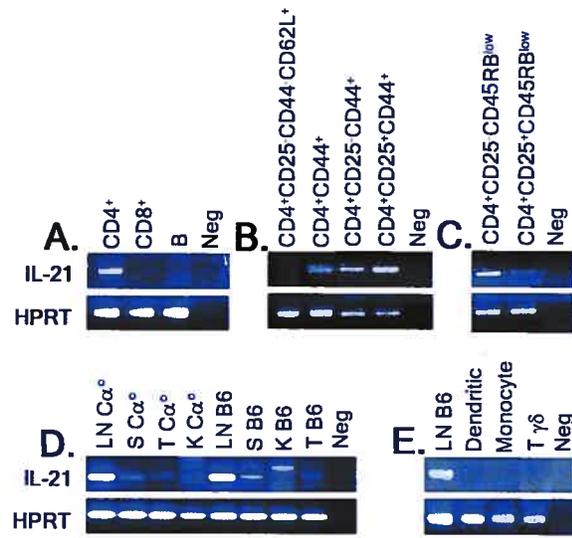


FIGURE 2

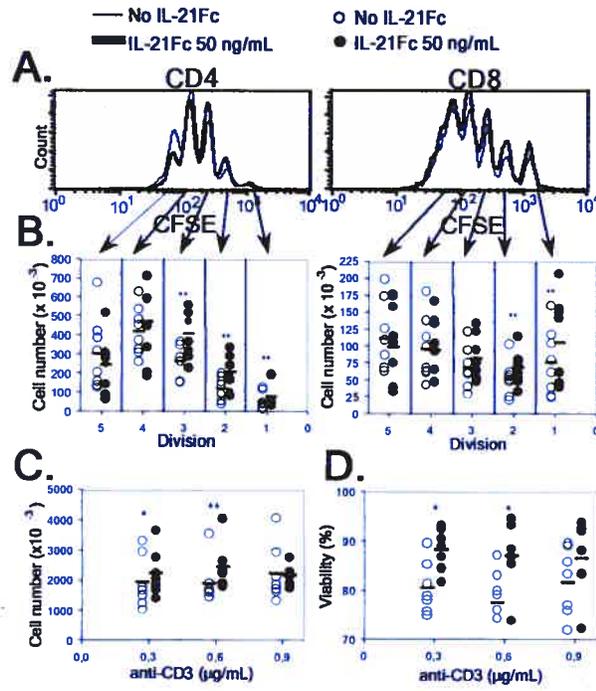


FIGURE 3

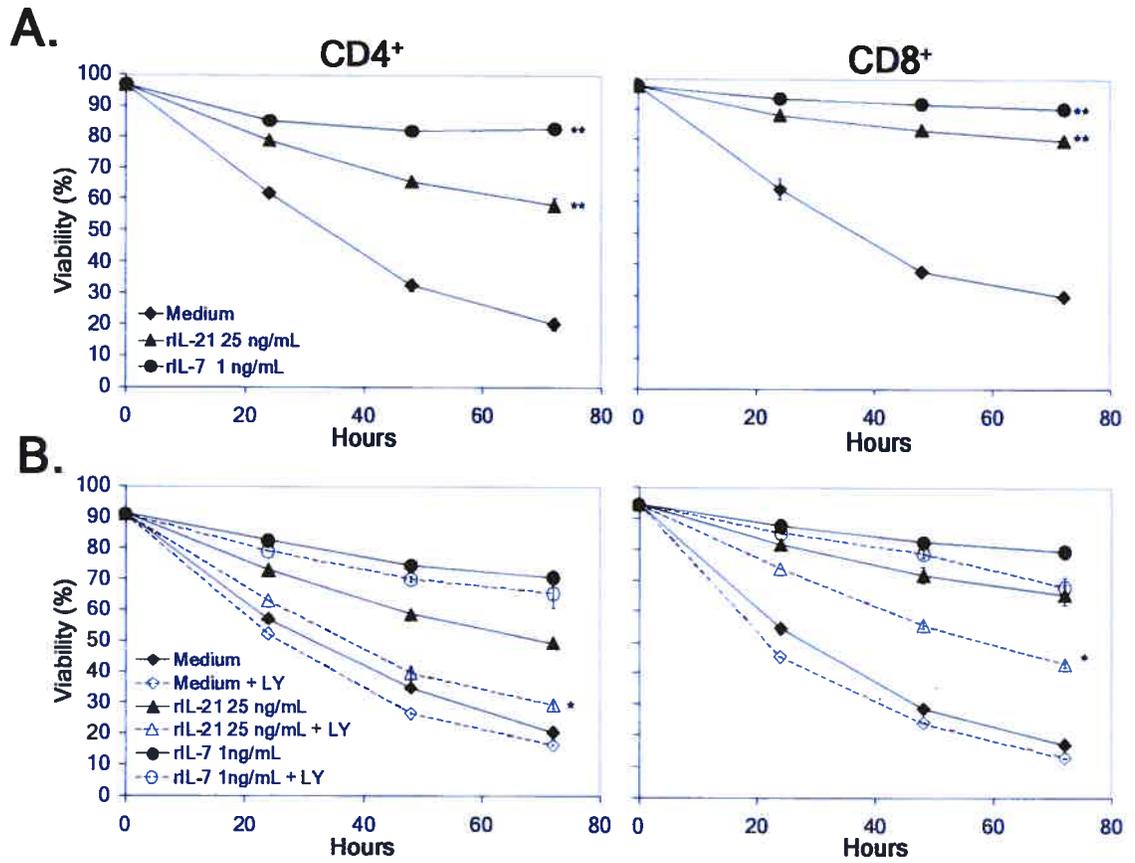


FIGURE 4

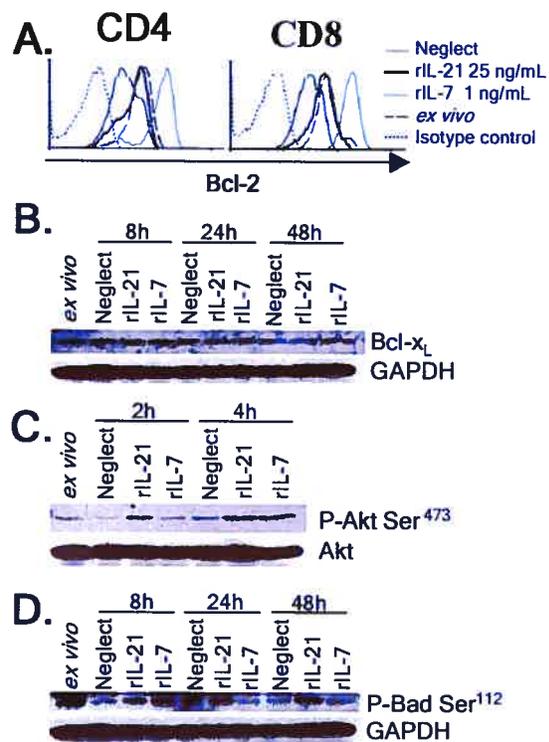


FIGURE 5

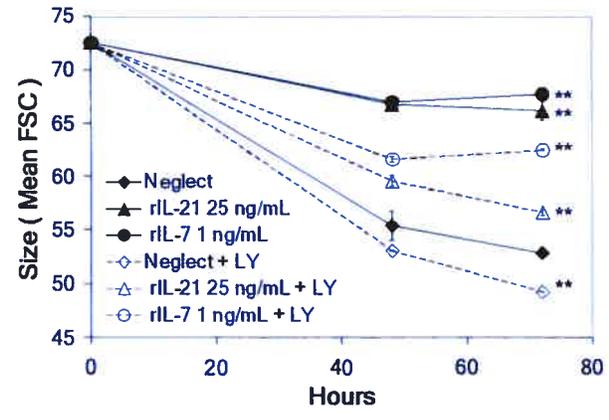


FIGURE 6

CHAPITRE 4. DISCUSSION

DISCUSSION

L'étude de toute nouvelle cytokine de la famille γ c permettra de mieux comprendre la régulation de la réponse du système immunitaire. Notre étude a permis de démontrer que l'IL-21R est exprimé constitutivement par les cellules T matures. De plus, l'IL-21 est aussi produite de façon constitutive dans les organes lymphoïdes. Par ailleurs, nos résultats ont permis de démontrer que l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T via une augmentation de la survie des lymphocytes T. Finalement, l'IL-21 induit la survie des cellules T naïves en activant la voie de la PI3-K et en maintenant l'expression de Bcl-2.

Patron d'expression de l'IL-21 et de l'IL-21R

Le patron d'expression d'une cytokine et de son récepteur permet de mieux caractériser son rôle dans le système immunitaire. Précédemment, il avait été démontré que l'IL-21R est présent sur les cellules T activées, les cellules B et NK (100, 101). Toutefois, dans notre étude, nous avons démontré que l'IL-21R est exprimé par les cellules T matures, ainsi que lors du développement des lymphocytes T. Cette différence dans les résultats concernant l'expression de l'IL-21R est probablement due à l'utilisation, dans notre étude, d'une méthode plus sensible. L'IL-21Fc étant une protéine dimérique, il est possible qu'elle soit plus avide pour l'IL-21R que la protéine IL-21 biotinylée ou le sérum anti-IL-21R utilisés préalablement (100, 101). Par contre, lors de l'analyse plus approfondie du Western Blot utilisant le sérum anti-IL-21R (100), il a été possible d'observer une bande correspondante à l'expression de l'IL-21R chez les cellules T naïves. L'expression constitutive de l'IL-21R est très surprenante, car la majorité des récepteurs de cytokine de classe I sont exprimés par les lymphocytes T suite à l'activation cellulaire. En fait, avant la découverte de l'IL-21R, il existait seulement un récepteur de cytokine de classe I exprimé constitutivement par les cellules T, soit l'IL-7R α . L'expression constitutive de l'IL-21R est donc très intéressante. Par ailleurs, le

patron d'expression similaire de l'IL-21R et de l'IL-7R α sur les lymphocytes T naïfs suggère que l'IL-21 puisse avoir, tout comme l'IL-7, un rôle dans le développement et la survie de ces cellules. De plus, le fait que l'IL-21 soit produite de façon constitutive par le thymus et par les organes lymphoïdes secondaires supporte cette idée. Toutefois, il faudrait confirmer la production d'IL-21 par les cellules stromales en effectuant soit des immunofluorescences ou des hybridations *in situ* sur des coupes d'organes lymphoïdes.

Nos travaux nous ont permis de démontrer que l'IL-21 permet la survie des cellules T naïves CD4⁺ et CD8⁺ *in vitro*. Le pourcentage de viabilité observé est plus important pour les lymphocytes T CD8⁺ que pour les cellules T CD4⁺. Cependant, chez la souris IL-21R^{-/-}, aucune différence n'a été observée dans les populations de cellules T (106, 109). L'absence de différence est probablement due à l'arrivée continue, en périphérie, de nouvelles cellules T provenant du thymus. De plus, le déclin des lymphocytes T naïfs *in vivo* est habituellement visible après quelques semaines suivant une thymectomie. Par ailleurs, aucune analyse détaillée des populations de lymphocytes T et aucun essai de survie n'a été effectué chez la souris IL-21R^{-/-}. Par conséquent, il est possible que l'IL-21 agisse sur la survie des cellules T naïves *in vivo*. Il est connu que l'IL-7 est crucial pour la survie des lymphocytes T *in vivo* et plus particulièrement pour les cellules T CD4⁺ (53). Lors de cette expérience, le déclin en cellules T, suite à une thymectomie et à l'ajout d'un Ac anti-IL-7R α , était plus important pour les lymphocytes T CD4⁺ que pour les CD8⁺. Il est donc possible que l'IL-21 soit importante pour la survie des cellules T et plus particulièrement pour les lymphocytes T CD8⁺ *in vivo*. Ceci pourrait correspondre aux résultats obtenus lors des essais de survie *in vitro* effectués en présence d'IL-21. L'IL-21 et l'IL-7 pourraient donc coopérer ensemble pour la survie des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ *in vivo*. Conséquemment, il serait intéressant de vérifier l'effet de survie de l'IL-21 sur les cellules T *in vivo*, plus particulièrement pour les lymphocytes T CD8⁺, en effectuant une thymectomie sur les souris IL-21R^{-/-} et en analysant le déclin des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ au cours du temps.

D'autre part, l'expression de l'IL-21R est régulée durant le développement des cellules T. Ce résultat est très intéressant, car il pourrait expliquer la différence phénotypique entre la souris $\gamma c^{-/-}$ et la souris IL-7 $^{-/-}$ ou IL-7R $\alpha^{-/-}$ (39-41). En fait, la souris $\gamma c^{-/-}$ possède beaucoup moins de thymocytes CD8 $^{+}$ SP que la souris IL-7 $^{-/-}$ ou IL-7R $\alpha^{-/-}$. Par ailleurs, l'IL-21 pourrait donc être responsable de la survie des thymocytes CD8 $^{+}$ SP chez la souris IL-7 $^{-/-}$ ou IL-7R $\alpha^{-/-}$. Bref, l'IL-21 est probablement importante pour la survie des cellules T CD8 $^{+}$ SP et des lymphocytes T CD8 $^{+}$ matures.

L'IL-21R est exprimé à tous les stades de développement des cellules B dans la moelle osseuse, ce qui suggère que l'IL-21 puisse avoir un rôle durant le développement des cellules B. Encore une fois, aucune différence dans les populations de cellules B n'a été observée chez la souris IL-21R $^{-/-}$ (106, 109). Cependant, aucune étude détaillée n'a été effectuée concernant le rôle possible de l'IL-21 dans le développement des lymphocytes B. Il est connu que l'IL-7 transmet des signaux de survie aux précurseurs des cellules B n'exprimant pas encore le pRCB (pré-récepteur de cellules B). Néanmoins, dès que les cellules B deviennent pRCB $^{+}$, l'IL-7 n'est plus nécessaire pour supporter la survie de celle-ci (114-116). Par ailleurs, chez les souris IL-7 $^{-/-}$ et IL-7R $^{-/-}$, la lymphopénie en cellules B est le résultat d'un défaut de transition du stade pro-B au stade pré-RCB. Toutefois, il y a quelques cellules qui échappent à l'arrêt du développement B (40, 41). Ceci suggère qu'il y ait une autre cytokine responsable du développement des cellules B. De plus, nos résultats concernant l'expression de l'IL-7R et de l'IL-21R au cours du développement B supporte cette idée. Suite au stade « pre-B », il y a une diminution de l'expression de l'IL-7R et une augmentation de l'expression de l'IL-21R. Par conséquent, il est possible que l'IL-21 fournisse les signaux de survie nécessaires au développement spécifique des précurseurs pRCB $^{+}$ jusqu'au stade de cellules B matures.

Co-stimulation de la prolifération via une augmentation de la survie

Le groupe de Parrish-Novak avait démontré que l'IL-21 co-stimule la prolifération des cellules T *in vitro* (101). En voulant distinguer quelles populations (cellules T CD4⁺ ou CD8⁺) répondent à l'IL-21, nous avons démontré que l'IL-21 n'augmente pas le nombre de divisions cellulaires des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, comme le font les autres cytokines de classe I. En fait, l'IL-21 accroît la population des cellules T_E en augmentant la viabilité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Cependant, il n'est toujours pas connu si l'IL-21 augmente seulement la viabilité des cellules T naïves ou également celle des cellules T activées. Même si nous avons démontré que l'expression de l'IL-21R augmente suite à l'activation cellulaire, ceci n'implique pas que l'IL-21 favorise aussi la survie des cellules T activées. Pour répondre à cette question, il faudrait activer des lymphocytes T et les restimuler en présence ou en absence d'IL-21 pour vérifier si l'IL-21 médie aussi la survie des cellules T activées.

Par contre, même si l'IL-21 n'augmente pas la prolifération des cellules T, elle permet néanmoins un accroissement de la taille de la population des cellules T_E via la survie cellulaire. Cette augmentation de la population des lymphocytes T_E en présence d'IL-21 pourrait expliquer la réponse des cellules T en absence d'IL-15 ou d'IL-2. Il est connu que l'IL-15 est importante pour la prolifération et pour la différenciation des cellules T naïves en T_E suite à la reconnaissance antigénique (58, 62). Toutefois, même si les souris IL-15^{-/-} ou IL-15R α ^{-/-} (62) ne peuvent avoir une réponse protectrice contre le virus vaccinia, elles peuvent produire une réponse spécifique contre le virus choriomeningitis lymphocytaire (LCMV) (64). Par ailleurs, les lymphocytes T des souris IL-2^{-/-} ou IL-2R^{-/-} peuvent aussi répondre à l'Ag (60, 61). Cette différence entre les deux réponses pourrait être attribuable à l'effet de l'IL-2 chez les souris IL-15^{-/-} ou IL-15R α ^{-/-} et vice-versa ou à l'effet de survie médié par l'IL-21 qui, dans le cas de LCMV, pourrait permettre d'obtenir une expansion suffisante de cellules T_E pour enrayer l'infection. Par ailleurs, cette

augmentation de la population de lymphocytes T_E pourrait favoriser la formation de cellules T_M lors d'une réponse immunitaire.

Survie des cellules T naïves via l'activation de la PI3-K et le maintien de l'expression de Bcl-2

Dans notre étude, le mécanisme permettant la survie des cellules T naïves en présence d'IL-21 a été étudié. Nous avons démontré que la liaison de l'IL-21 à son récepteur active la voie de signalisation de la PI3-K. Par ailleurs, l'activation de la PI3-K a probablement lieu sur la queue cytoplasmique de l'IL-21R. En effet, la queue cytoplasmique de l'IL-21R possède la séquence YPAM qui correspond à la séquence consensus YXXM permettant la liaison de la PI3-K au récepteur de cytokine de classe I (88), alors que la chaîne γ_c ne la possède pas. Ceci suggère donc que l'IL-21 active la PI3-K via l'IL-21R et que la chaîne spécifique du récepteur de l'IL-21 est importante pour la signalisation permettant la survie cellulaire.

Nous avons également établi que l'IL-21 et l'IL-7 maintiennent en vie les cellules T naïves en activant des voies de signalisation différentes. En fait, en présence d'un inhibiteur de la PI3-K, le LY294002, l'IL-21 ne permet plus la survie des cellules T naïves, alors que l'inhibiteur n'a aucune effet sur la survie des lymphocytes T naïfs médiée par l'IL-7. Cependant, l'IL-7, tout comme l'IL-21, induit la phosphorylation d'Akt et de Bad, deux molécules en aval de la PI3-K. Ceci suggère que l'IL-7 permet la survie des cellules T naïves même en absence de l'activation de la PI3-K, probablement via la surexpression de Bcl-2 (54). L'IL-21, quant à elle, ne fait que maintenir l'expression de Bcl-2, ce qui est insuffisant pour permettre la survie des lymphocytes T naïfs en absence de l'activation de la voie de la PI3-K. De plus, l'IL-21 permet le maintien de l'activité métabolique, tout comme l'IL-7 (54), en activant la voie de la PI3-K. L'IL-21 induit donc la survie des cellules T naïves ainsi que le maintien de l'activité métabolique en activant la voie de signalisation de la PI3-K.

Rôle différentiel de l'IL-21 chez les cellules T et B

Récemment, il a été démontré que l'IL-21 induit l'apoptose des cellules B purifiées mises en culture en présence ou en absence de stimulation (108). Ce résultat contraste avec l'effet de survie de l'IL-21 que nous avons observé chez les cellules T naïves. Par ailleurs, lors de certains de nos essais de viabilité, nous avons utilisé des lymphocytes totaux et aucun effet n'a été remarqué chez les lymphocytes non T (CD4⁺CD8⁻) qui sont constituées principalement de cellules B. Cette différence est peut-être due au fait qu'ils avaient purifié les cellules B ou à la différence de concentrations d'IL-21 utilisées. Lors de notre étude, nous avons utilisé des doses de 5 à 25 ng/mL d'IL-21, alors qu'ils ont utilisé une dose de 200 ng/mL. Toutefois, même à 200 ng/mL, nous n'avons pas observé d'apoptose des lymphocytes T ni de déclin plus rapide des autres types cellulaires et par conséquent, des cellules B. Il est possible que la présence des cellules T soit importante pour la survie des lymphocytes B et qu'il nous soit impossible de voir l'effet d'apoptose de l'IL-21 sur les cellules B. Il faudrait, pour s'en assurer, purifier des lymphocytes B et reproduire l'expérience du groupe de Mehta. De plus, l'induction de l'apoptose des cellules B *in vitro* en présence d'IL-21 est contradictoire avec les résultats obtenus chez la souris IL-21R^{-/-} (106, 109). Il a été démontré que l'IL-21 est essentiel pour la production d'Ig, plus particulièrement d'IgG. Il est donc inconcevable que l'IL-21 favorise l'apoptose des cellules B, alors qu'elle est essentielle pour la production d'IgG.

Rôles de l'IL-21 dans le système immunitaire

Au cours de nos travaux, il a été établi que l'IL-21 est importante pour la survie des cellules T naïves et pour l'amplification de la population des cellules T_E (Figure 6). Cependant, l'IL-21 agit aussi sur les lymphocytes B, les cellules NK et les lymphocytes T_M CD8⁺. L'IL-21 agit vraisemblablement au cours de tous les stades de la réponse immunitaire. En premier lieu, l'IL-21 permet, en collaboration avec l'IL-7, la survie des cellules T naïves. En inhibant la réponse des cellules NK de

l'immunité innée (106), l'IL-21 favorise possiblement la transition vers l'immunité acquise. Par la suite, elle supporte la réponse immunitaire acquise en augmentant la survie des cellules T lors de l'activation cellulaire et en soutenant la production d'Ig, plus particulièrement d'IgG, par les lymphocytes B (109). Ceci permet une production d'Ac pour éliminer le pathogène en circulation et une augmentation des lymphocytes T_E $CD8^+$ pour lyser les cellules infectées.

D'autres part, une étude a démontré que l'IL-21 inhibe l'expansion des cellules T $CD8^+CD44^+$, ayant un phénotype mémoire/activé, induit par l'IL-15 (106). Curieusement, les cellules T régulatrices ($CD4^+CD25^+$) inhibent, elles aussi, les lymphocytes T_M $CD8^+$ (117). Par ailleurs, nos travaux ont démontré que les cellules T régulatrices possèdent probablement le messager de l'IL-21. Il serait donc intéressant de vérifier si les cellules T régulatrices peuvent maintenir leur action sur les lymphocytes T_M $CD8^+$ en absence d'IL-21. Conséquemment, l'IL-21 est possiblement une cytokine régulatrice en plus d'être importante pour la survie des lymphocytes naïfs. Cependant, il reste toujours à déterminer si l'IL-21 pourrait être importante pour la survie des cellules T_M $CD4^+$.

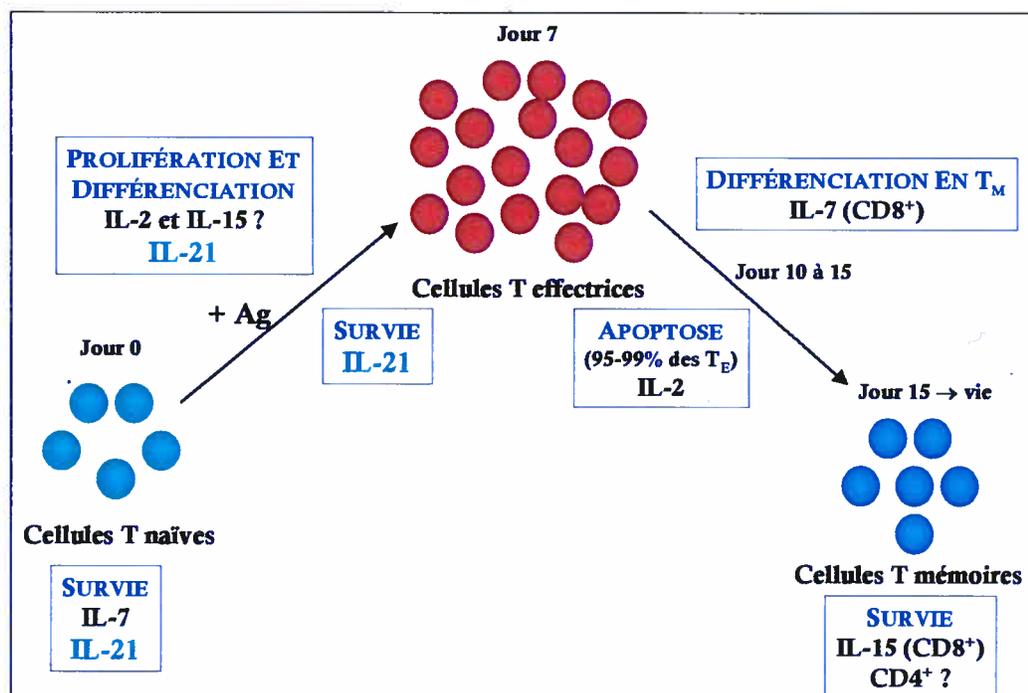


Figure 6. Rôle de l'IL-21 dans la réponse des cellules T.

CONCLUSION

En conclusion, notre étude a permis de révéler une nouvelle fonction de l'IL-21 dans le système immunitaire. L'IL-21 est un facteur de survie pour les cellules T naïves, tout comme l'IL-7. Toutefois, elle favorise la survie cellulaire en activant la voie de la PI3-K et en maintenant l'expression de Bcl-2. Par ailleurs, elle induit la survie des cellules T lors de la reconnaissance antigénique et augmente le nombre de cellules T_E. Étant importante pour la survie des cellules T naïves, l'IL-21 pourrait être utilisée comme agent thérapeutique pour le traitement de personnes atteintes d'immunodéficience (atrophie thymique, chimiothérapie, infection au VIH). Elle pourrait aider au maintien d'une population de lymphocytes T chez ces patients.

Toutefois, avant de pouvoir suggérer une utilisation thérapeutique de l'IL-21, il faut tout d'abord s'assurer que l'IL-21 joue le même rôle de survie pour les cellules T naïves *in vivo* ainsi que chez l'humain. Si l'IL-21 agit aussi sur l'homéostasie des cellules T *in vivo*, il pourra ainsi être envisageable que l'IL-21 soit utilisée dans le traitement d'immunodéficience pour maintenir le réservoir de cellules T. Par ailleurs, l'IL-21 pourrait également être ajoutée à la préparation de vaccin pour augmenter possiblement la réponse T clonogénique et ainsi augmenter le nombre de cellules T_M spécifiques. Peut-être qu'un jour l'IL-21 sera un agent thérapeutique pour augmenter l'efficacité d'un vaccin ou pour traiter une immunodéficience.

RÉFÉRENCES

1. Kaech, S. M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2:415.
2. van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens, and S. P. Schoenberger. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2:423.
3. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2002. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* 2:982.
4. Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287.
5. Slavik, J. M., J. E. Hutchcroft, and B. E. Bierer. 1999. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* 19:1.
6. Gett, A. V., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4:355.
7. O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275.
8. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3:619.
9. Kieper, W. C., J. T. Tan, B. Bondi-Boyd, L. Gapin, J. Sprent, R. Ceredig, and C. D. Surh. 2002. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 195:1533.
10. Goldrath, A. W., P. V. Sivakumar, M. Glaccum, M. K. Kennedy, M. J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E. A. Butz. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 195:1515.
11. Swain, S. L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286:1381.

12. Sprent, J., and C. D. Surh. 2001. Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* 13:248.
13. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708.
14. Kaech, S. M., E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2:251.
15. Tanchot, C., M. M. Rosado, F. Agenes, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol* 9:331.
16. Marrack, P., J. Bender, D. Hildeman, M. Jordan, T. Mitchell, M. Murakami, A. Sakamoto, B. C. Schaefer, B. Swanson, and J. Kappler. 2000. Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol* 1:107.
17. Khaled, A. R., and S. K. Durum. 2002. Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2:817.
18. Butz, E. A., and M. J. Bevan. 1998. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8:167.
19. Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255.
20. Plas, D. R., J. C. Rathmell, and C. B. Thompson. 2002. Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications. *Nat Immunol* 3:515.
21. Leonard, W. J. 1999. Type I Cytokines and Interferons and Their Receptors. In *Fundamental Immunology*. W. E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 741.
22. Wlodawer, A., A. Pavlovsky, and A. Gustchina. 1993. Hematopoietic cytokines: similarities and differences in the structures, with implications for receptor binding. *Protein Sci* 2:1373.
23. D'Andrea, A. D., G. D. Fasman, and H. F. Lodish. 1989. Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor beta chain: a new receptor family. *Cell* 58:1023.

24. Tanner, J. W., W. Chen, R. L. Young, G. D. Longmore, and A. S. Shaw. 1995. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* 270:6523.
25. Takeshita, T., H. Asao, K. Ohtani, N. Ishii, S. Kumaki, N. Tanaka, H. Munakata, M. Nakamura, and K. Sugamura. 1992. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257:379.
26. Russell, S. M., A. D. Keegan, N. Harada, Y. Nakamura, M. Noguchi, P. Leland, M. C. Friedmann, A. Miyajima, R. K. Puri, W. E. Paul, and et al. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 262:1880.
27. Noguchi, M., Y. Nakamura, S. M. Russell, S. F. Ziegler, M. Tsang, X. Cao, and W. J. Leonard. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 262:1877.
28. Kimura, Y., T. Takeshita, M. Kondo, N. Ishii, M. Nakamura, J. Van Snick, and K. Sugamura. 1995. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int Immunol* 7:115.
29. Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman, and D. Anderson. 1994. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 13:2822.
30. Voshenrich, C. A., and J. P. Di Santo. 2001. Cytokines: IL-21 joins the gamma(c)-dependent network? *Curr Biol* 11:R175.
31. Noguchi, M., H. Yi, H. M. Rosenblatt, A. H. Filipovich, S. Adelstein, W. S. Modi, O. W. McBride, and W. J. Leonard. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73:147.
32. Sugamura, K., H. Asao, M. Kondo, N. Tanaka, N. Ishii, K. Ohbo, M. Nakamura, and T. Takeshita. 1996. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 14:179.
33. Leonard, W. J., M. Noguchi, S. M. Russell, and O. W. McBride. 1994. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: the role of

- the interleukin-2 receptor gamma chain as a common gamma chain, gamma c. *Immunol Rev* 138:61.
34. Conley, M. E., A. Lavoie, C. Briggs, P. Brown, C. Guerra, and J. M. Puck. 1988. Nonrandom X chromosome inactivation in B cells from carriers of X chromosome-linked severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3090.
 35. Wengler, G. S., R. C. Allen, O. Parolini, H. Smith, and M. E. Conley. 1993. Nonrandom X chromosome inactivation in natural killer cells from obligate carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 150:700.
 36. Russell, S. M., J. A. Johnston, M. Noguchi, M. Kawamura, C. M. Bacon, M. Friedmann, M. Berg, D. W. McVicar, B. A. Witthuhn, O. Silvennoinen, and et al. 1994. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* 266:1042.
 37. Leonard, W. J. 2001. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* 1:200.
 38. DiSanto, J. P., W. Muller, D. Guy-Grand, A. Fischer, and K. Rajewsky. 1995. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:377.
 39. Di Santo, J. P., I. Aifantis, E. Rosmaraki, C. Garcia, J. Feinberg, H. J. Fehling, A. Fischer, H. von Boehmer, and B. Rocha. 1999. The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development. *J Exp Med* 189:563.
 40. Peschon, J. J., P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, and et al. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955.
 41. von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach, and R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519.

42. He, Y. W., H. Nakajima, W. J. Leonard, B. Adkins, and T. R. Malek. 1997. The common gamma-chain of cytokine receptors regulates intrathymic T cell development at multiple stages. *J Immunol* 158:2592.
43. von Freeden-Jeffry, U., N. Solvason, M. Howard, and R. Murray. 1997. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7:147.
44. Kim, K., C. K. Lee, T. J. Sayers, K. Muegge, and S. K. Durum. 1998. The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol* 160:5735.
45. Moore, T. A., U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, and A. Zlotnik. 1996. Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7 $-/-$ mice. *J Immunol* 157:2366.
46. Maki, K., S. Sunaga, Y. Komagata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K. Yokomuro, J. I. Miyazaki, and K. Ikuta. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7172.
47. Tough, D. F., and J. Sprent. 1995. Life span of naive and memory T cells. *Stem Cells* 13:242.
48. Brocker, T. 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186:1223.
49. Kirberg, J., A. Berns, and H. von Boehmer. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* 186:1269.
50. Seddon, B., and R. Zamoyska. 2002. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* 169:2997.
51. Labrecque, N., L. S. Whitfield, R. Obst, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15:71.
52. Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8732.

53. Vivien, L., C. Benoist, and D. Mathis. 2001. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 13:763.
54. Rathmell, J. C., E. A. Farkash, W. Gao, and C. B. Thompson. 2001. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J Immunol* 167:6869.
55. Berard, M., K. Brandt, S. B. Paus, and D. F. Tough. 2003. IL-15 Promotes the Survival of Naive and Memory Phenotype CD8(+) T Cells. *J Immunol* 170:5018.
56. Teague, T. K., P. Marrack, J. W. Kappler, and A. T. Vella. 1997. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol* 158:5791.
57. Vella, A., T. K. Teague, J. Ihle, J. Kappler, and P. Marrack. 1997. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* 186:325.
58. Lodolce, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669.
59. Malek, T. R. 2002. T helper cells, IL-2 and the generation of cytotoxic T-cell responses. *Trends Immunol* 23:465.
60. Kundig, T. M., H. Schorle, M. F. Bachmann, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, and I. Horak. 1993. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 262:1059.
61. Kneitz, B., T. Herrmann, S. Yonehara, and A. Schimpl. 1995. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 25:2572.
62. Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce, and J. J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191:771.
63. Li, X. C., G. Demirci, S. Ferrari-Lacraz, C. Groves, A. Coyle, T. R. Malek, and T. B. Strom. 2001. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 7:114.

64. Becker, T. C., E. J. Wherry, D. Boone, K. Murali-Krishna, R. Antia, A. Ma, and R. Ahmed. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195:1541.
65. Willerford, D. M., J. Chen, J. A. Ferry, L. Davidson, A. Ma, and F. W. Alt. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521.
66. Lenardo, M. J. 1991. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858.
67. Schluns, K. S., and L. Lefrancois. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 3:269.
68. Murali-Krishna, K., L. L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286:1377.
69. Schluns, K. S., K. Williams, A. Ma, X. X. Zheng, and L. Lefrancois. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168:4827.
70. Prlic, M., L. Lefrancois, and S. C. Jameson. 2002. Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J Exp Med* 195:F49.
71. Ku, C. C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288:675.
72. Schluns, K. S., W. C. Kieper, S. C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426.
73. Tan, J. T., B. Ernst, W. C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent, and C. D. Surh. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J Exp Med* 195:1523.
74. Vosshenrich, C. A., and J. P. Di Santo. 2002. Interleukin signaling. *Curr Biol* 12:R760.

75. Rane, S. G., and E. P. Reddy. 2000. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19:5662.
76. Darnell, J. E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630.
77. Johnston, J. A., M. Kawamura, R. A. Kirken, Y. Q. Chen, T. B. Blake, K. Shibuya, J. R. Ortaldo, D. W. McVicar, and J. J. O'Shea. 1994. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 370:151.
78. Witthuhn, B. A., O. Silvennoinen, O. Miura, K. S. Lai, C. Cwik, E. T. Liu, and J. N. Ihle. 1994. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 370:153.
79. Miyazaki, T., A. Kawahara, H. Fujii, Y. Nakagawa, Y. Minami, Z. J. Liu, I. Oishi, O. Silvennoinen, B. A. Witthuhn, J. N. Ihle, and et al. 1994. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 266:1045.
80. Horvath, C. M., and J. E. Darnell. 1997. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 9:233.
81. Lin, J. X., T. S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J. A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E. T. Bloom, J. Mietz, S. John, and et al. 1995. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2:331.
82. Demoulin, J. B., C. Uyttenhove, E. Van Roost, B. DeLestre, D. Donckers, J. Van Snick, and J. C. Renauld. 1996. A single tyrosine of the interleukin-9 (IL-9) receptor is required for STAT activation, antiapoptotic activity, and growth regulation by IL-9. *Mol Cell Biol* 16:4710.
83. Ryan, J. J., L. J. McReynolds, H. Huang, K. Nelms, and W. E. Paul. 1998. Characterization of a mobile Stat6 activation motif in the human IL-4 receptor. *J Immunol* 161:1811.
84. Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, and G. R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415.

85. Schindler, U., P. Wu, M. Rothe, M. Brasseur, and S. L. McKnight. 1995. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity* 2:689.
86. Vanhaesebroeck, B., S. J. Leevers, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P. C. Driscoll, R. Woscholski, P. J. Parker, and M. D. Waterfield. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70:535.
87. Koyasu, S. 2003. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4:313.
88. Truitt, K. E., G. B. Mills, C. W. Turck, and J. B. Imboden. 1994. SH2-dependent association of phosphatidylinositol 3'-kinase 85-kDa regulatory subunit with the interleukin-2 receptor beta chain. *J Biol Chem* 269:5937.
89. Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 15:6541.
90. Alessi, D. R., F. B. Caudwell, M. Andjelkovic, B. A. Hemmings, and P. Cohen. 1996. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 399:333.
91. Datta, S. R., A. Brunet, and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905.
92. Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231.
93. del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera, and G. Nunez. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687.
94. Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322.
95. Vaux, D. L., S. Cory, and J. M. Adams. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440.
96. Chao, D. T., and S. J. Korsmeyer. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16:395.

97. Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, and S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609.
98. Huang, D. C., and A. Strasser. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103:839.
99. Wen, R., D. Wang, C. McKay, K. D. Bunting, J. C. Marine, E. F. Vanin, G. P. Zambetti, S. J. Korsmeyer, J. N. Ihle, and J. L. Cleveland. 2001. Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol* 21:678.
100. Ozaki, K., K. Kikly, D. Michalovich, P. R. Young, and W. J. Leonard. 2000. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11439.
101. Parrish-Novak, J., S. R. Dillon, A. Nelson, A. Hammond, C. Sprecher, J. A. Gross, J. Johnston, K. Madden, W. Xu, J. West, S. Schrader, S. Burkhead, M. Heipel, C. Brandt, J. L. Kuijper, J. Kramer, D. Conklin, S. R. Presnell, J. Berry, F. Shiota, S. Bort, K. Hambly, S. Mudri, C. Clegg, M. Moore, F. J. Grant, C. Lofton-Day, T. Gilbert, F. Rayond, A. Ching, L. Yao, D. Smith, P. Webster, T. Whitmore, M. Maurer, K. Kaushansky, R. D. Holly, and D. Foster. 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408:57.
102. Parrish-Novak, J., D. C. Foster, R. D. Holly, and C. H. Clegg. 2002. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol* 72:856.
103. Wurster, A. L., V. L. Rodgers, A. R. Satoskar, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins, and M. J. Grusby. 2002. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med* 196:969.
104. Asao, H., C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, and K. Sugamura. 2001. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167:1.
105. Habib, T., S. Senadheera, K. Weinberg, and K. Kaushansky. 2002. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the

- IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* 41:8725.
106. Kasaian, M. T., M. J. Whitters, L. L. Carter, L. D. Lowe, J. M. Jussif, B. Deng, K. A. Johnson, J. S. Witek, M. Senices, R. F. Konz, A. L. Wurster, D. D. Donaldson, M. Collins, D. A. Young, and M. J. Grusby. 2002. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16:559.
 107. Carson, W. E., T. A. Fehniger, S. Haldar, K. Eckhert, M. J. Lindemann, C. F. Lai, C. M. Croce, H. Baumann, and M. A. Caligiuri. 1997. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* 99:937.
 108. Mehta, D. S., A. L. Wurster, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins, and M. J. Grusby. 2003. IL-21 Induces the Apoptosis of Resting and Activated Primary B Cells. *J Immunol* 170:4111.
 109. Ozaki, K., R. Spolski, C. G. Feng, C. F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H. C. Morse, 3rd, C. Liu, P. L. Schwartzberg, and W. J. Leonard. 2002. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298:1630.
 110. Brenne, A. T., T. Baade Ro, A. Waage, A. Sundan, M. Borset, and H. Hjorth-Hansen. 2002. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood* 99:3756.
 111. Bird, J. J., D. R. Brown, A. C. Mullen, N. H. Moskowitz, M. A. Mahowald, J. R. Sider, T. F. Gajewski, C. R. Wang, and S. L. Reiner. 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9:229.
 112. Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241.
 113. Vella, A. T., S. Dow, T. A. Potter, J. Kappler, and P. Marrack. 1998. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3810.
 114. Fleming, H. E., and C. J. Paige. 2002. Cooperation between IL-7 and the pre-B cell receptor: a key to B cell selection. *Semin Immunol* 14:423.

115. Fleming, H. E., and C. J. Paige. 2001. Pre-B cell receptor signaling mediates selective response to IL-7 at the pro-B to pre-B cell transition via an ERK/MAP kinase-dependent pathway. *Immunity* 15:521.
116. Maraskovsky, E., J. J. Peschon, H. McKenna, M. Teepe, and A. Strasser. 1998. Overexpression of Bcl-2 does not rescue impaired B lymphopoiesis in IL-7 receptor-deficient mice but can enhance survival of mature B cells. *Int Immunol* 10:1367.
117. Kursar, M., K. Bonhagen, J. Fensterle, A. Kohler, R. Hurwitz, T. Kamradt, S. H. Kaufmann, and H. W. Mittrucker. 2002. Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196:1585.

