

**Université de Montréal**

**Étude du développement des lymphocytes T mémoires**

**par**

**Marie-Hélène Lacombe**

**Département de médecine**

**Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures**

**en vue de l'obtention du grade de maîtrise**

**en sciences biomédicales**

**Octobre 2003**

**© Marie-Hélène Lacombe, 2003**



W

4

U58

2004

V.070

## **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 du développement des lymphocytes T mémoires**

**présenté par :**  
**Marie-Hélène Lacombe**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Dr. Jacques Thibodeau**  
**président-rapporteur**

**Dr. Nathalie Labrecque**  
**directrice de recherche**

**Dr. Claude Daniel**  
**membre du jury**

## RÉSUMÉ

La reconnaissance antigénique par les lymphocytes T induit leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices. Suite à l'élimination du pathogène par les lymphocytes T effecteurs, il y a une phase de contraction durant laquelle la majorité d'entre eux meurent tandis que ceux qui survivent se différencient en lymphocytes T mémoires. Ce sont les lymphocytes T mémoires qui confèrent une protection à long terme à l'organisme. Nous postulons que les lymphocytes T mémoires dérivent des lymphocytes T effecteurs qui ont modifié l'expression de certains récepteurs de cytokines tels que ceux de l'IL-2, de l'IL-7 et de l'IL-15, trois cytokines impliquées dans la réponse immunitaire. À l'aide d'un modèle de transfert adoptif, nous avons détecté une modulation de l'expression de l'IL-2R $\beta$  et de l'IL-7R $\alpha$  à la surface des lymphocytes T effecteurs durant la réponse antigénique. De plus, nous avons observé que ces deux récepteurs sont plus exprimés à la surface des lymphocytes T effecteurs apoptotiques que sur les non apoptotiques. Dès lors, il y a une disparité dans les signaux reçus par les lymphocytes T effecteurs qui survivent à la phase de contraction et par ceux qui meurent. De plus, nous avons détecté une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  dans les lymphocytes T effecteurs suite à l'activation et durant la phase de contraction. Nous avons aussi observé que l'utilisation de CFA lors de l'immunisation compense pour l'absence d'aide des lymphocytes T CD4 dans la génération de lymphocytes T CD8 mémoires. La compréhension des mécanismes impliqués dans la production de lymphocytes T mémoires permettra d'élaborer de meilleurs vaccins.

Mots clés: réponse immunitaire, cytokines, récepteurs de cytokines

## ABSTRACT

T lymphocytes undergo massive proliferation and differentiate into effector T cells following antigen encounter. After elimination of the pathogen, most effector T cells die by apoptosis while the remaining ones differentiate into memory T cells, which are responsible for long-term protection of the organism. The mechanism behind the differentiation of effector T cells into memory T cells is not yet understood. In this study, we have investigated the role of cytokine signaling in memory T cell generation. Interestingly, our data showed that the beta chain of the IL-2 receptor along with the alpha chain of the IL-7 receptor are more expressed on apoptotic effector T cells than on non apoptotic effector T cells during the contraction phase. Therefore, there is a disparity in cytokine signaling between effector T cells that are dying and those that are surviving to become memory T cells. Also, we observed increase IL-15 receptor alpha chain mRNA level following immunization and during the contraction phase of the response. Since IL-15 is a survival factor for memory T cells, it is logical that this receptor is up regulated on effector T cells that are becoming memory T cells. These observations suggest that memory T cells develop preferentially from effector T cells that have received IL-7 and IL-15 signals. Moreover, our results also suggest that immunization with antigen emulsified in CFA can compensate for the lack of CD4 T cell for the generation of functional memory CD8<sup>+</sup> T cells. A better understanding of the mechanisms behind memory T cell production will help to elaborate better vaccines.

**Keywords:** memory T cell production, cytokines, cytokine receptors, T cell response, vaccination

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ EN FRANÇAIS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RÉSUMÉ EN ANGLAIS</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xi</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. RÉPONSE IMMUNITAIRE DES LYMPHOCYTES T</b> .....	<b>3</b>
1.1 Reconnaissance antigénique et phases de la réponse immunitaire .....	3
1.1.1 Costimulation .....	4
1.2 Caractéristiques des lymphocytes T mémoires .....	5
1.3 Modèles de production des lymphocytes T mémoires .....	6
1.3.1 Voies de différenciation différentes .....	6
1.3.2 Différenciation linéaire et concept de différenciation programmée .....	9
1.3.3 Programmation de la phase de contraction .....	14
<b>2. LES CYTOKINES</b> .....	<b>16</b>
2.1 Les types de cytokines .....	16
2.2 Les interleukines 2, 7 et 15 .....	17
2.2.1 Patrons d'expression de leurs récepteurs .....	17

2.2.2	Leurs principaux rôles dans la réponse immunitaire .....	20
3.	PROBLÉMATIQUE .....	27
3.1	Hypothèse .....	28
3.2	Objectifs .....	29
3.2.1	Modèle pour l'étude du développement des lymphocytes T mémoires .....	29
3.2.2	Étude du rôle des cytokines dans la formation des lymphocytes T mémoires .....	29
3.2.3	Production d'un réactif permettant de suivre l'expression du récepteur de l'interleukine 15 .....	30
<b>CHAPITRE 2 :</b>	<b>ARTICLE .....</b>	<b>31</b>
<b>CHAPITRE 3 :</b>	<b>PROTÉINE DE FUSION DE L'IL-15 .....</b>	<b>64</b>
1.	MÉTHODOLOGIE .....	66
1.1	IL-15-Fc .....	66
1.1.1	Clonage IL-15-Fc .....	66
1.1.2	Clonage IL-2/IL-15-Fc .....	67
1.1.3	Production IL-15-Fc .....	68
1.2	FLAG-IL-15 .....	69
1.2.1	Clonage FLAG-IL-15 .....	69
1.2.2	Production et purification FLAG-IL-15 .....	70
2.	RÉSULTATS .....	72
2.1	Protéine de fusion IL-15-Fc .....	72
2.1.1	Clonage IL-15-Fc .....	72
2.1.2	Clonage IL2/IL-15-Fc .....	74
2.2	Protéine de fusion FLAG-IL-15 .....	76
<b>CHAPITRE 4 :</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
1.	EXPRESSION DES RÉCEPTEURS DE CYTOKINE .....	82
1.1	Modèle d'étude de la mémoire immunologique .....	82

1.2 Expression de l'IL-2R $\beta$ et de l'IL-7R $\alpha$ durant la phase de contraction .....	86
1.3 Expression de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$ durant la réponse immunitaire .....	89
2. PROTÉINES DE FUSION DE L'IL-15 .....	92
2.1 IL-15-Fc .....	92
2.2 FLAG-IL15 .....	93
3. CONCLUSION .....	96
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>97</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b>	Liste des cytokines .....	17
<b>Tableau II :</b>	Expression des récepteurs de cytokines à la surface des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> durant la réponse antigénique.....	18

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Représentation schématique du modèle de production des lymphocytes T mémoires par voies de différenciation différentes. .... 6
- Figure 2 :** Représentation schématique du modèle de production de lymphocytes T mémoire par différenciation linéaire. .... 9
- Figure 3 :** Représentation schématique des récepteurs de l'IL-2, IL-7 et l'IL-15. .... 20
- Figure 4 :** Représentation schématique de la réponse immunitaire des lymphocytes T. .... 26
- Figure 5 :** Utilisation d'une protéine de fusion de l'IL-15 afin de détecter l'expression de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-15 par cytofluorométrie. .... 73
- Figure 6 :** Production de l'IL-15-Fc. (A) Production de la protéine de fusion avec CosFclink/IL-15. .... 75
- Figure 7 :** Production de la protéine de fusion FLAG-IL-15..... 77
- Figure 8 :** Pureté de la protéine de fusion FLAG-IL-15..... 79

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\gamma$ c :	chaîne commune gamma
Ag :	antigène
AFC :	adjuvant de Freund complet
AFI :	adjuvant de Freund incomplet
AICD :	activation-induced cell death
APCs :	cellules présentatrices d'antigène
CFSE :	carboxyl fluorescein succinimidyl ester
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CTLA-4 :	cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4
HSA :	heat-stable antigen
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule
IELs :	intestinal intraepithelial cells
IL-2 :	interleukine-2
IL-7 :	interleukine-7
IL-15 :	interleukine-15
IL-2R $\alpha$ :	chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-2
IL-2R $\beta$ :	chaîne bêta du récepteur de l'interleukine-2
IL-7R $\alpha$ :	chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-7
IL-15R $\alpha$ :	chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-15
IPTG :	isopropylthio-B-D-galactoside
LCMV :	lymphocytic choriomeningitis virus
NK :	natural killer cell
OVA :	ovalbumine
RAG :	recombination activation gene
RCT :	récepteur des cellules T
SEA et SEB :	straphylococcal enterotoxin A et B
VSV :	vesicular stomatitis virus

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Nathalie Labrecque pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire et de travailler sur un projet de recherche très intéressant. Elle m'a ainsi permis d'approfondir mes connaissances dans plusieurs domaines dont l'immunologie et la biologie moléculaire. J'aimerais aussi remercier tous les membres de mon laboratoire pour leurs conseils et pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans un environnement agréable. J'aimerais remercier Sophie Ouellet pour son aide avec le tri cellulaire. De plus, j'aimerais remercier le Dr. Jacques Thibodeau et le Dr. Claude Daniel pour avoir accepté de consacrer de leur temps à la correction de mon mémoire.

Finalement, j'aimerais remercier les membres de ma famille pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté lors de mes études.

# **Chapitre 1**

## **Introduction**

## INTRODUCTION

Le système immunitaire protège l'organisme contre les pathogènes. Il se divise en deux parties : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme et confère une résistance non spécifique à la présence d'un corps étranger. Pour sa part, l'immunité acquise est une réponse spécifique à la présence d'un pathogène donné. Tandis que l'immunité non spécifique est innée à l'organisme, l'immunité acquise se développe au cours des expositions aux différents pathogènes. Les lymphocytes B et les lymphocytes T constituent les cellules effectrices de l'immunité spécifique. Les lymphocytes B produisent des anticorps qui permettent l'élimination des pathogènes en utilisant, entre autres, la voie du complément. Il existe deux catégories de lymphocytes T : les lymphocytes  $CD4^+$  et  $CD8^+$ . Les lymphocytes  $CD4^+$ , aussi appelés lymphocytes T "helper", produisent des molécules, entre autres des cytokines qui vont aider les lymphocytes B et les lymphocytes T  $CD8^+$  à répondre aux pathogènes. Ils participent aussi à l'activation des macrophages. Les lymphocytes T  $CD8^+$ , aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques, détruisent directement les cellules cibles infectées.

## **1. RÉPONSE IMMUNITAIRE DES LYMPHOCYTES T**

### **1.1 Reconnaissance antigénique et phases de la réponse immunitaire**

Afin de faire la distinction entre le “soi” et le “non soi”, le système immunitaire a élaboré un processus de reconnaissance antigénique. Un antigène (Ag) peut-être une protéine, une nucléoprotéine, un polysaccharide ou un glycolipide produit par le pathogène. Cependant, les lymphocytes T ne peuvent reconnaître que des fragments d’antigène peptidique. Une fois l’organisme infecté par un pathogène, les antigènes sont captés par des cellules présentatrices d’antigène (APCs), telles que les cellules dendritiques, dans lesquelles ils seront apprêtés. Les lymphocytes T naïfs, grâce à leur récepteur spécifique (RCT), vont reconnaître un fragment peptidique de l’antigène en association avec une molécule du soi du complexe majeur d’histocompatibilité (CMH) présenté à la surface des APCs. Les lymphocytes T pouvant reconnaître un antigène spécifique représentent une très faible portion ( $1/10^5$ - $10^6$ ) du répertoire de lymphocytes T. Afin d’avoir une réponse efficace, il y a une phase de prolifération massive afin d’augmenter le nombre de lymphocytes T spécifiques à l’antigène et de permettre leur différenciation en lymphocytes T effecteurs. Suite à l’élimination du pathogène par les lymphocytes T effecteurs, il y a une phase de contraction durant laquelle la majorité d’entre eux meurent (90-99%) tandis que les lymphocytes T effecteurs restants se différencient en lymphocytes T mémoires. La phase de contraction permet de rétablir l’homéostasie entre les différentes populations de lymphocytes T afin que le système immunitaire soit prêt à répondre contre une infection avec un nouvel agent infectieux. Les lymphocytes T

mémoires sont responsables de la réponse rapide suite à une deuxième infection avec le même pathogène, ce qui confère une protection à long terme pour l'organisme. Les mécanismes déterminant quels lymphocytes T effecteurs deviendront des lymphocytes T mémoires sont inconnus.

### 1.1.1 Costimulation

Afin d'activer de façon efficace les lymphocytes T, deux types de signaux sont nécessaires. Le premier est bien sûr la reconnaissance d'un fragment peptidique de l'antigène en association avec une molécule du CMH par le RCT des lymphocytes T. Le deuxième est un signal de costimulation livré aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène. Ce signal peut être fourni par plusieurs molécules dont les ligands de la famille B7 qui interagissent avec les récepteurs CD28 et CTLA-4 (cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4) présents à la surface des lymphocytes T, HSA (heat-stable antigen), CD44, et ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) (1-7). En absence d'un signal de costimulation, la reconnaissance antigénique peut entraîner la désensibilisation (anergie) des lymphocytes T, qui ainsi ne pourront plus répondre à l'antigène, et peut même entraîner leur mort par apoptose (8). De plus les signaux de costimulation peuvent réguler la réponse des lymphocytes T. Par exemple, la liaison des ligands B7 présents à la surface des APCs avec le récepteur CD28 permet l'activation optimale des lymphocytes T (8). Par contre, si les molécules B7 interagissent avec le récepteur CTLA-4, les lymphocytes T reçoivent des signaux inhibiteurs qui atténuent la réponse antigénique (9). La costimulation est un aspect important de la réponse immunitaire des lymphocytes T.

## 1.2 Caractéristiques des lymphocytes T mémoires

Les lymphocytes T mémoires possèdent plusieurs caractéristiques qui leur permettent de protéger l'organisme contre une deuxième rencontre avec l'antigène. Tout d'abord, le nombre de lymphocytes T mémoires retrouvés à la fin de la réponse immunitaire est plus élevé que le nombre de lymphocytes T naïfs spécifiques à l'antigène présent dans l'organisme au début de la réponse (10-14). En plus d'être plus nombreux, les lymphocytes T mémoires répondent plus rapidement que les lymphocytes T naïfs à la présence d'antigènes. En effet, une fois activés, les lymphocytes T mémoires prolifèrent, produisent des cytokines, acquièrent des fonctions effectrices et migrent dans les organes non lymphoïdes plus rapidement que les cellules naïves (10,15-22). Une autre caractéristique des lymphocytes T mémoires est leur habileté à proliférer en réponse à des signaux homéostatiques (cytokines, interactions cellulaires, etc) contrairement aux lymphocytes T naïfs qui se divisent très rarement (23,24). Cette particularité leur permet de survivre longtemps dans l'organisme et de lui fournir une protection à long terme.

Il y a deux modèles standard pour l'étude des lymphocytes T mémoires. Le premier consiste à transférer des lymphocytes T naïfs d'une spécificité antigénique connue dans un hôte naïf. Il est possible ensuite d'immuniser l'hôte avec l'antigène spécifique et de suivre l'évolution des lymphocytes T transférés. Ce modèle s'appelle transfert adoptif. L'autre modèle consiste à utiliser des tétramères afin de suivre une population de lymphocytes T spécifiques. En effet, les tétramères reconnaissent un RCT en particulier ce qui permet de suivre la réponse antigénique des lymphocytes T spécifiques.

### 1.3 Modèles de production des lymphocytes T mémoires

#### 1.3.1 Voies de différenciation différentes

Deux modèles pour la production des lymphocytes T mémoires ont été élaborés. Le premier modèle propose qu'une fois activés, les lymphocytes T naïfs s'engagent dans deux voies de différenciation différentes et exclusives (Figure 1, p.6). Une de ces deux voies conduirait à la production de lymphocytes T effecteurs tandis que l'autre permettrait la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T mémoires. Ainsi, les lymphocytes T activés deviendraient mémoires sans passer par le stade d'effecteur.

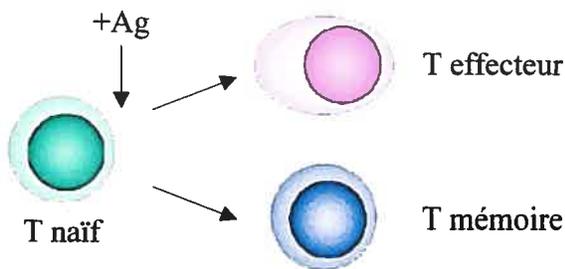


Figure 1 : Représentation schématique du modèle de production des lymphocytes T mémoires par voies de différenciation différentes.

Ce modèle se base sur les observations rapportées, entre autres, par les groupes de Manjunath et al. et Liu et al. (25,26). Le groupe de Manjunath a utilisé un modèle de souris RCT transgéniques dont les lymphocytes T  $CD8^+$  naïfs et récemment activés expriment la protéine GFP. De plus, ces lymphocytes T perdent l'expression de GFP une fois différenciés en lymphocytes T effecteurs. Après activation *in vitro* avec le peptide antigénique spécifique, les lymphocytes T  $CD8^+GFP^+$  ont été cultivés en présence de cytokines. Les lymphocytes T activés cultivés avec une forte dose d'IL-2

se sont différenciés en cellules présentant les caractéristiques de lymphocytes T effecteurs. Ils ont pris l'apparence de cellules blastiques, perdu l'expression de GFP, expriment des marqueurs d'activation tel que l'épitope CD43 1B11 et présentent des fonctions cytotoxiques. En contre partie, les lymphocytes T activés présentent des caractéristiques de cellules mémoires lorsque cultivés en présence d'une faible dose d'IL-2 ou en présence d'IL-15. En effet, ils sont restés petits, ne perdent pas l'expression de GFP, n'expriment pas les marqueurs d'activation et ne possèdent pas de fonctions cytotoxiques. Par contre, ces lymphocytes T sont capables de monter une réponse secondaire contre l'antigène *in vitro* et *in vivo* lorsque transférés dans une souris naïve. Suite à ces observations, le groupe de Manjunath a suggéré que la différenciation en cellules effectrices n'est pas un préalable pour la génération de lymphocytes T mémoires. Cependant, leurs résultats proviennent d'expériences effectuées *in vitro* qui ne représentent pas nécessairement ce qui se passe *in vivo*. Les conditions de cultures contrôlées utilisées dans cette expérience, comme l'accessibilité aux cytokines, doivent être difficilement reproductibles dans un contexte *in vivo*. De plus, des facteurs, autres que l'IL-2 et l'IL-15, produits lors de la réponse antigénique peuvent avoir un effet sur la différenciation des lymphocytes T activés *in vivo*.

Pour sa part, le groupe de Liu a étudié les molécules costimulatrices impliquées dans la reconnaissance antigénique des lymphocytes T cytotoxiques (25). Les auteurs du papier se sont attardés aux molécules HSA et B7 et à son récepteur CD28. Ils ont infecté des souris avec le virus A/JAP afin d'obtenir une réponse antigénique par les lymphocytes T. Pour détecter la formation de lymphocytes T effecteurs, les auteurs ont utilisé des cellules EL-4 chargées avec un peptide d'une

nucléoprotéine du virus A/JAP, c'est à dire des cellules qui présentent l'antigène cible des cellules effectrices. Ils ont déterminé la lyse spécifique de ces cellules cibles EL-4 afin d'observer la réponse des lymphocytes T effecteurs. Ils ont observé que la cinétique de la réponse immunitaire est similaire entre des souris sauvages et des souris déficientes pour HSA. Par contre, aucune lyse spécifique des cellules EL-4 n'a été observée chez des souris sauvages déficientes pour CD28 ou pour CD28 et HSA. De plus, la lyse spécifique observée chez les souris sauvages et déficientes pour HSA a été enrayée lorsque les souris ont été traitées avec des anticorps contre B7-1 et B7-2, les ligands de CD28. Les auteurs concluent, suite à ces observations, que B7 et non HSA est nécessaire pour l'induction de la réponse primaire des lymphocytes T cytotoxiques. Pour observer l'implication de ces molécules costimulatrices dans la formation de lymphocytes T mémoires, ils ont traité ou non les souris avec anti-B7-1/2 durant les trois semaines suivant l'infection et ont étudié la lyse des cellules cibles EL-4 par les lymphocytes T recueillis 100 jours post-immunisation. Ils ont observé que les lymphocytes T mémoires de souris HSA déficientes et de souris sauvages traitées avec anti-B7-1/2 étaient capables de lyser les cellules cibles EL-4 lorsque restimulés in vitro. Par contre, aucune lyse par les lymphocytes T mémoires des souris HSA déficientes et traitées avec anti-B7-1/2 n'a été observée. Les auteurs concluent que B7 seul et HSA seul sont suffisants pour induire la formation de lymphocytes T mémoires fonctionnels. Suite à ces observations, les auteurs suggèrent que des molécules de costimulation différentes permettent d'induire soit la production de lymphocytes T effecteurs, soit la production de lymphocytes T mémoires. Cependant, les auteurs n'ont pas fait de lien direct entre l'absence des molécules costimulatrices et la formation des lymphocytes T effecteurs et mémoires. En effet,

leur absence peut avoir un effet sur d'autres types cellulaires et non directement sur les lymphocytes T. Par exemple, l'absence de molécules costimulatrices pourrait affecter la maturation des cellules présentatrices d'antigène, ce qui affecterait par la suite l'activation des lymphocytes T naïfs. L'absence de ces molécules aurait donc un effet indirect sur la réponse immunitaire des lymphocytes T. De plus, l'absence de lyse spécifique des cellules cibles n'indique pas l'absence de lymphocytes T effecteurs ou mémoires. Les lymphocytes T effecteurs ou mémoires sont peut-être présents mais incapables de détruire les cellules cibles. Les auteurs devraient utiliser d'autres moyens afin de détecter la présence des lymphocytes T effecteurs ou mémoires comme l'utilisation d'anticorps contre les marqueurs spécifiques de ces cellules.

### 1.3.2 Différenciation linéaire et concept de différenciation programmée

L'autre modèle pour la production de lymphocytes T mémoires consiste en une différenciation linéaire (Figure 2, p9). Les lymphocytes T activés se différencieraient d'abord en lymphocytes T effecteurs avant de devenir des cellules mémoires.



Figure 2 : Représentation schématique du modèle de production de lymphocytes T mémoire par différenciation linéaire.

Les évidences expérimentales les plus convaincantes appuient ce modèle (27-32). Le groupe de Opferman et al. a utilisé un modèle de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> RCT transgéniques afin de déterminer si les lymphocytes T mémoires se différencient à partir des lymphocytes T effecteurs (30). Les lymphocytes T naïfs ont tout d'abord été marqués au CFSE pour ensuite être cultivés *in vitro* en présence du peptide antigénique pour lequel ils sont spécifiques. Les auteurs ont observé que les lymphocytes T activés acquièrent des fonctions effectrices tel que l'accumulation intracellulaire de perforine, seulement lorsqu'ils se sont divisés au moins cinq fois. Par la suite, des lymphocytes T activés ayant atteints différents stades de division (0, 1, 5 et 9 divisions) ont été transférés dans des souris naïves et la production subséquente de lymphocytes T mémoires a été déterminée. La formation de lymphocytes T mémoires fonctionnels a été détectée seulement lorsque les lymphocytes T activés transférés s'étaient divisés plus de cinq fois donc seulement lorsque les lymphocytes T activés avaient préalablement acquis des fonctions effectrices. Les auteurs suggèrent suite à ces observations que les lymphocytes T mémoires se différencient seulement à partir des lymphocytes T effecteurs. Cependant, il n'est pas exclu que les lymphocytes T deviennent mémoires sans passer par le stade d'effecteurs. En effet, il se pourrait que les précurseurs de lymphocytes T mémoires se divisent au même rythme que les cellules effectrices mais sans acquérir leurs fonctions. Dès lors, lorsque les lymphocytes T activés ayant atteints différents stades de division sont transférés, ils se pourraient qu'ils regroupent les lymphocytes T effecteurs et les précurseurs de lymphocytes T mémoires. Des résultats similaires ont été observés pour la formation de lymphocytes T mémoire CD4<sup>+</sup> par le groupe de Swain et al. (31). Des lymphocytes T effecteurs CD4<sup>+</sup> de type T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 ont tout

d'abord été produits *in vitro* à partir de lymphocytes T naïfs RCT transgéniques. Ces lymphocytes T effecteurs ont ensuite été transférés dans des souris naïves et la production de lymphocytes T mémoires a été déterminée. Les auteurs ont détecté la formation de lymphocytes T mémoires fonctionnels quatre semaines suivant le transfert adoptif et ce quel que soit le type de lymphocytes T effecteurs transférés. De plus, une relation linéaire entre le nombre de lymphocytes T effecteurs transférés et celui des lymphocytes T mémoires détectés a été observée. Bien que les expériences aient été effectuées en partie *in vitro*, les résultats rapportés ci haut apportent un appui significatif au modèle de différenciation linéaire.

La différenciation programmée des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs est un concept qui a récemment été proposé par certains groupes de chercheurs (28,32). Le groupe de Kaech et Ahmed (28) a démontré qu'une fois activés, les lymphocytes T se différencient en cellules effectrices qui, plus tard, généreront des lymphocytes T mémoires fonctionnels. Pour ce faire, ils ont transféré des lymphocytes T naïfs d'une spécificité antigénique connue dans une souris naïve. Ces lymphocytes T naïfs ont préalablement été marqués au CFSE afin de suivre leur prolifération. Les souris receveuses ont alors été infectées avec différentes doses de bactéries afin d'activer les cellules transférées. Les lymphocytes T qui ont été activés sont tous devenus CFSE négatif ce qui veut dire qu'ils se sont tous divisés au moins 7 fois et ce quel que soit la dose de bactéries injectée. En contre parti, les lymphocytes T qui n'ont pas été activés ne se sont pas divisés et dès lors présentent un niveau élevé de CFSE. La dose de peptide influence seulement le nombre de cellules recrutées dans la réponse, donc le nombre de lymphocytes T CFSE négatif. Contrairement aux lymphocytes T CFSE positif, tous les lymphocytes T activés

présentent les marqueurs de cellules effectrices tels que CD44 et CD43 (1B11) et produisent de l'IFN $\gamma$ . De plus, les lymphocytes T CFSE négatifs retrouvés 100 jours après l'immunisation produisent de l'IFN $\gamma$  lorsque restimulés *in vitro*. Aussi, ces lymphocytes T éliminent rapidement le pathogène lors d'une deuxième infection. Les lymphocytes T CFSE négatifs retrouvés 100 jours après l'infection présentent donc des caractéristiques des lymphocytes T mémoires. En contre parti, les lymphocytes T CFSE positifs, donc les lymphocytes T qui n'ont pas été recrutés dans la réponse, retrouvés 100 jours après l'infection ne présentent aucune des caractéristiques des lymphocytes T mémoires. Le groupe de Kaech et Ahmed suggère qu'une fois activés, les lymphocytes T entreprennent un programme de différenciation durant lequel ils se divisent au moins 7 fois, acquièrent des fonctions effectrices et deviennent des lymphocytes T effecteurs. À la fin de la réponse, les lymphocytes T mémoires sont générés à partir des lymphocytes T effecteurs seulement. Ces observations appuient fortement l'hypothèse que la production des lymphocytes T mémoires suit le modèle de différenciation linéaire.

Le groupe de van Stipdonk et al a obtenu des résultats similaires (32). Ils ont élaboré un modèle de cellules présentatrices d'antigènes (APCs) qui expriment de façon constitutive un épitope de l'ovalbumine en association avec le CMH de classe I. Ces APCs ont été mises en culture durant 24 heures pour qu'elles adhèrent et forment une couche de cellules qui tapisse la surface de culture. Ils ont ensuite incubé des lymphocytes T spécifiques à l'épitope de l'ovalbumine et marqués au CFSE avec la culture d'APCs durant différentes périodes de temps. Après l'incubation, les lymphocytes T ont été transférés dans un puits sans APC donc sans antigène. Ils ont

observé que 2 heures d'exposition à l'antigène sont suffisantes pour que les lymphocytes T se divisent et présentent les premiers signes d'activation ("down regulation" du RCT, expression de CD69). De plus, les lymphocytes T ainsi activés continuent de se diviser même en absence d'antigène. Les auteurs de l'article ont aussi observé que ces lymphocytes T possèdent des fonctions cytotoxiques après 72 heures de culture sans antigène. Bien que ces expériences aient été effectuées *in vitro*, elles concordent avec les résultats du groupe de Kaech et Ahmed qui proposent qu'un programme de différenciation soit engagé lors de la reconnaissance antigénique.

Dans un autre ordre d'idée, le groupe de Ahmed a utilisé un modèle de souris RCT transgéniques afin d'étudier les différences entre les lymphocytes T naïfs, effecteurs et mémoires sur une base moléculaire (29). Les lymphocytes T naïfs ont été obtenus directement à partir des cellules de la rate des souris transgéniques. Afin d'obtenir les populations de lymphocytes T effecteurs et mémoires, des lymphocytes T naïfs furent transférés dans des souris naïves qui ont ensuite été infectées avec le virus LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) pour lequel ils sont spécifiques. Les lymphocytes T effecteurs ont été isolés au pic de la réponse immunitaire, soit à 8 jours post-infection, et les lymphocytes T mémoires à 40 jours post-infection. Le patron d'expression d'une série de gènes a été déterminé par "micro array" dans les différentes populations de lymphocytes T. Les auteurs ont observé que l'expression de 350 gènes est augmentée d'au moins 1.7 fois chez les lymphocytes T effecteurs et mémoires par rapport aux lymphocytes T naïfs. Certains de ces gènes sont impliqués dans la migration et l'adhésion cellulaire, dans les fonctions effectrices et dans la transduction de signaux. De plus, les changements d'expression de 30% de ces 350 gènes sont maintenus entre les effecteurs et les mémoires. Ceci suggère que les

lymphocytes T mémoires dérivent bien des lymphocytes T effecteurs. Par contre, certains types de gènes sont exprimés préférentiellement chez les lymphocytes T effecteurs ou mémoires ce qui suggère que ce soit bien deux populations distinctes. En effet, l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette n'est augmentée que dans les lymphocytes T effecteurs tandis que l'expression des gènes du cycle cellulaire n'est augmentée que chez les lymphocytes T mémoires. Les auteurs ont ensuite utilisé leur modèle afin de déterminer quand les lymphocytes T effecteurs acquièrent les caractéristiques propres des lymphocytes T mémoires. Ils ont isolé des lymphocytes T 8, 15, 22 et 40 jours après infection, les ont marqués au CFSE et les ont transférés dans des souris naïves. Ils ont ensuite étudié la capacité des lymphocytes T à proliférer en réponse aux signaux homéostatiques, à proliférer et survivre en réponse à une deuxième rencontre avec l'antigène et à phosphoryler ERK1/2. Ils ont observé que ces caractéristiques des lymphocytes T mémoires ne sont pas présentes au jour 8 post-infection mais qu'elles apparaissent graduellement chez les lymphocytes T du jour 15 vers ceux du jour 40 post-infection. Les résultats du groupe de Kaech suggèrent que les lymphocytes T mémoires dérivent des effecteurs, ce qui concorde avec le modèle de différenciation linéaire.

### **1.3.3 Programmation de la phase de contraction**

Le groupe de Harty a suggéré que la phase de contraction de la réponse immunitaire soit elle aussi programmée lors de la reconnaissance antigénique (33). Les auteurs du papier ont infecté des souris BALB/c avec une faible ou forte dose d'une souche atténuée de *L. monocytogenes* et ils ont ensuite étudié la cinétique de la réponse antigénique. Ils ont observé que le début de la phase de contraction avait lieu

le même jour quel que soit la dose utilisée et que la cinétique de contraction était aussi similaire. La dose utilisée pour l'infection semble influencer seulement la magnitude de la réponse (le nombre de lymphocytes recrutés et la vitesse d'expansion) et non la cinétique de la phase de contraction. Pour déterminer si la durée de l'infection pouvait influencer la cinétique de contraction, les auteurs ont utilisé un modèle de souris déficientes en perforine qui, lorsque infectées avec LCMV, sont incapables d'éliminer le virus. Dès lors, ces souris sont affligées d'une infection persistante. Le début et la cinétique de la phase de contraction chez les souris perforine déficientes infectées sont similaires à ce qui est observé chez les souris sauvages. De plus, les lymphocytes T virus spécifiques prélevés durant la phase de contraction sur les souris perforine déficientes infectées produisent des lymphocytes T mémoires fonctionnels lorsque transférés dans des souris sauvages non infectées. Donc, la présence d'une infection persistante n'affecte pas la cinétique de la phase de contraction. Suite à ces observations, les auteurs suggèrent que la phase de contraction soit programmée au début de la réponse immunitaire et qu'elle n'est pas influencée par la magnitude de la réponse et l'élimination ou non du pathogène. Ces résultats suggèrent que plusieurs aspects de la réponse immunitaire puissent être initialement programmés lors de la reconnaissance antigénique.

## **2. LES CYTOKINES**

### **2.1 Les types de cytokines**

Les cytokines ont plusieurs points en commun avec les hormones et les facteurs de croissance. En effet, les cytokines sont des protéines sécrétées par les cellules et elles agissent de façon autocrine (sur la cellule productrice) ou de façon paracrine (sur d'autres cellules). Par contre, contrairement aux hormones et aux facteurs de croissance, les cytokines sont des facteurs importants du système immunitaire et agissent principalement sur les leucocytes. Les cytokines interagissent avec des récepteurs membranaires exprimés à la surface des cellules afin de transmettre des signaux aux cellules cibles. Les voies de signalisation activées par les cytokines sont diverses et comprennent la voie des Jak-STAT et la voie PI3-kinase. Les cytokines peuvent être divisées en deux catégories : les cytokines de type I et de type II. La classification des cytokines se base sur leur structure tridimensionnelle. Les cytokines de type I possèdent une structure composée de quatre hélices alpha compactes avec une configuration "haut-haut-bas-bas" (34,35). De plus, les cytokines de types I peuvent être subdivisées en deux sous groupes sur la base de la longueur des hélices : les cytokines de type I à courtes (~ 15 acides aminés) ou longues chaînes (25 acides aminés). Les cytokines dont la structure ne correspond pas à celles des cytokines de type I sont regroupées dans la catégorie de type II. Une liste des cytokines de type I et II est rapportée dans le tableau I (p.17). Les cytokines de type I peuvent aussi être divisées en familles en se basant sur leurs récepteurs. L'une d'elles est la famille des cytokines  $\gamma$ c. Toutes les cytokines de cette famille agissent sur les

cellules en transmettant des signaux via un récepteur composé en partie de la chaîne commune gamma, communément appelée chaîne  $\gamma$  (36). De plus, ces cytokines font toutes partie du sous groupe de cytokines de type I à chaînes courtes. Les cytokines  $\gamma$  sont les suivantes : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (37-46). Toutes ces cytokines jouent un rôle important dans le système immunitaire mais nous nous attarderons seulement aux cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 et à leurs récepteurs.

---

**Tableau I: Liste des cytokines**

---

**Cytokines de type I**

---

**Chaînes courtes**

IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21  
GM-CSF, SCF, M-CSF, TSLP

**Longues chaînes**

IL-6, IL-11, IL-12  
OSM, CNTF, LIF, EPO, TPO, G-CSF, CT-1  
Prolactine, Leptine

---

**Cytokines de type II**

---

IL-10, IL-20, IL-22  
IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$

---

## **2.2 Les interleukines 2, 7 et 15**

### **2.2.1 Patrons d'expression de leurs récepteurs**

Comme mentionné ci haut, l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15 font partie des cytokines de type I de la famille  $\gamma$  donc leurs récepteurs sont composés, entre autres, de la chaîne commune  $\gamma$ . L'expression des récepteurs de ces trois cytokines sur les

lymphocytes T CD8<sup>+</sup> durant la réponse immunitaire est rapportée dans le tableau II (p.18). La chaîne  $\gamma c$  est exprimée de façon ubiquitaire sur toutes les cellules lymphoïdes. En plus de cette chaîne, le récepteur de l'interleukine-2 (IL-2) comprend une chaîne  $\alpha$  de haute affinité (IL-2R $\alpha$ ) et une chaîne  $\beta$  (IL-2R $\beta$ ) (47-49). La chaîne  $\alpha$  est absente sur les lymphocytes B naïfs mais est retrouvée à leur surface lorsque ceux-ci sont activés (50-53). De plus, l'IL-2R $\alpha$  n'est pas exprimée sur les lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mais est aussi induite à leur surface suite à l'activation (16,17,26,50-55). Par contre, l'expression est de courte durée et l'IL-2R $\alpha$  n'est plus détectée à la surface des lymphocytes T peu de temps après l'activation (17,54,55). De plus, cette chaîne n'est pas exprimée à la surface des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> (16). En contre partie, une expression élevée de IL-2R $\beta$  est observée sur les lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup>. De plus, l'IL-2R $\beta$  est détecté à la surface des lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> quoique le niveau d'expression soit plus faible que sur les cellules mémoires CD8<sup>+</sup> (16,56,57). De plus, IL-2R $\beta$  est retrouvé à la surface des IELs (intestinal intraepithelial cells) et des cellules NK (natural killer cells) (58,59).

**Tableau II: Expression des récepteurs de cytokines à la surface des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> durant la réponse antigénique**

Récepteur	T naïf	T effecteur	T mémoire
IL-2R $\alpha$	—	élevée*	—
IL-2R $\beta$	moyenne		élevée
IL-7R $\alpha$	élevée		très élevée
IL-15R $\alpha$	—	élevée	très élevée

\* expression élevée de courte durée suite à l'activation

Le récepteur de l'IL-7 ne comprend qu'une chaîne  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) en plus de la chaîne  $\gamma$ . L'expression de IL-7R $\alpha$  a été détectée à la surface des lymphocytes B et T à différents stades de différenciation (60,61). On retrouve cette chaîne sur les cellules B immatures qui n'expriment pas d'IgM, donc durant les premières étapes du stage pré-B. Durant les différents stades de différenciation des thymocytes dans le thymus, l'IL-7R $\alpha$  est exprimée sur les cellules immatures doubles négatives (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), et sur les cellules matures simples positives (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). On ne retrouve pas cette chaîne du récepteur de l'IL-7 à la surface des thymocytes doubles positifs (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), qui sont plus matures que les cellules doubles négatives quoique moins matures que les simples positives. En périphérie, l'IL-7R $\alpha$  est exprimée sur les lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. De plus, cette chaîne est exprimée plus fortement sur les lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> que sur les lymphocytes T naïfs (62).

Comme le récepteur de l'interleukine 2, le récepteur de l'IL-15 est composé de la chaîne IL-2R $\beta$  (44,47,48,63). De plus, il comprend une chaîne  $\alpha$  de haute affinité (IL-15R $\alpha$ ) qui lui est propre (64). L'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  est exprimé dans plusieurs types cellulaires : les lymphocytes T et B activés, les cellules NK activées, les macrophages activés, les cellules vasculaires endothéliales activées et les cellules stromales du thymus et de la moelle osseuse. De plus, cet ARNm est retrouvé dans plusieurs tissus dont, le foie, le cœur, la rate, les poumons, et les muscles du squelette (64). L'IL-15R $\alpha$  n'est pas exprimée à la surface des lymphocytes T naïfs CD8<sup>+</sup> mais est exprimée sur les lymphocytes T effecteurs et mémoires CD8<sup>+</sup> (62,65). La figure 3 (p.20) offre une représentation schématique des trois récepteurs mentionnés précédemment.

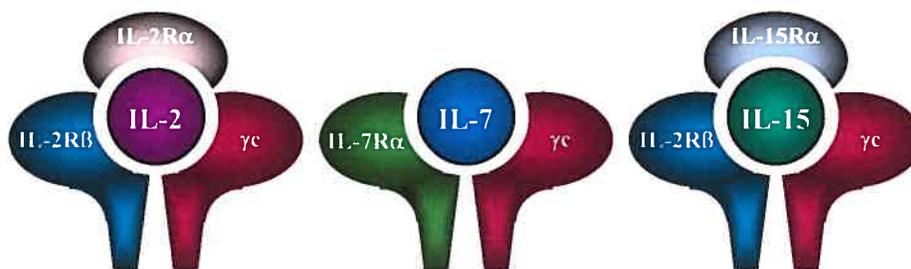


Figure 3 : Représentation schématique des récepteurs de l'IL-2, IL-7 et l'IL-15.

### 2.2.2 Leurs principaux rôles dans la réponse immunitaire

L'IL-2, l'IL-15 et l'IL-7 remplissent plusieurs rôles dans le système immunitaire mais nous nous attarderons principalement à leur contribution dans la réponse antigénique des lymphocytes T. La première cytokine de type I à avoir été clonée est l'interleukine-2 (66). Cette cytokine est seulement produite par les lymphocytes T activés lors de la réponse immunitaire. L'IL-2 est un important facteur de croissance pour les lymphocytes T activés *in vitro* (67,68). Par contre, l'IL-2 ne semble pas être nécessaire *in vivo*. En effet, la réponse immunitaire des lymphocytes T et B des souris déficientes pour l'IL-2 (IL-2<sup>-/-</sup>) est normale lorsque celles-ci sont infectées, entre autres, avec LCMV et VSV (vesicula stomatitis virus) (69). Les études avec les souris déficientes pour l'IL-2 et l'IL-2Rα (IL2R<sup>-/-</sup>) ont permis de découvrir l'implication de l'interleukine-2 dans l'AICD (activation-induced cell death) (70-72). En effet, bien que ces souris soient normales durant leurs premières semaines d'existence, elles développent des maladies auto-immunitaires causées, entre autres, par une expansion polyclonale des lymphocytes T et B qui s'infiltrent dans plusieurs organes et par la formation d'auto anticorps (69,72-74). Les lymphocytes T retrouvés chez les souris malades présentent des marqueurs de

cellules activées. Ces observations ont amené le groupe de Schimpl à étudier la mort des lymphocytes T activés chez le souris déficientes en IL-2 (70). Les auteurs ont démontré que l'expansion *in vivo* des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui répondent aux superantigènes SEA et SEB (staphylococcal enterotoxin A et B) est normale chez les souris IL-2<sup>-/-</sup> mais que la délétion subséquente des CD4<sup>+</sup> activés est réduite en comparaison avec les souris normales. De plus, les lymphocytes T spécifiques aux superantigènes qui ne sont pas éliminés ne deviennent pas anergiques comme cela ce produit chez les souris contrôles. Ces observations suggèrent que l'absence d'IL-2 chez ces souris empêche la mort des lymphocytes T activés ce qui entraîne l'accumulation de ces cellules dans les organes et les maladies auto-immunitaires subséquentes. L'IL-2 jouerait donc un rôle dans la mort des lymphocytes T effecteurs lors de la phase de contraction de la réponse antigénique. L'accumulation de lymphocytes T activés est aussi observée chez les souris déficientes pour IL-2R $\beta$  (IL-2R $\beta$ <sup>-/-</sup>) (75). Ces souris présentent d'autres anomalies qui ne sont pas retrouvées chez les souris IL-2<sup>-/-</sup> et IL-2R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mais qui sont observées chez les souris déficientes pour IL-15 et IL-15R $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Le phénotype des souris IL-2R $\beta$ <sup>-/-</sup> sera plus amplement exposé ultérieurement.

La production d'IL-7 a été détectée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales de l'intestin, du thymus et de la moelle osseuse, les kératinocytes, les cellules dendritiques et les cellules dendritiques folliculaires (76-84). Le foie a aussi été identifié comme un site de production d'IL-7 (85). Par contre, aucune expression de l'ARNm de l'IL-7 a été détectée dans les lymphocytes T et B (86). L'IL-7 joue un rôle essentiel dans le développement des lymphocytes T. Le thymus

des souris IL-7<sup>-/-</sup> contient 20 fois moins de cellules qu'un thymus d'une souris normale tandis que celui des souris IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> contient 0,01% à 10% du nombre de cellules normalement retrouvées chez les souris sauvages (87,88). De plus, une inhibition partielle de la différenciation des thymocytes triples négatifs (CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) est observée chez les souris IL-7<sup>-/-</sup> ainsi qu'une accumulation de ces lymphocytes T immatures (87). Le développement des lymphocytes T  $\gamma\delta$  est aussi compromis dans les souris IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> puisque aucun de ces lymphocytes n'est retrouvé dans ces souris (89,90). L'homéostasie des lymphocytes T naïfs est aussi un aspect du système immunitaire régulé par l'interleukine-7. Les organes lymphoïdes secondaires des souris déficientes pour l'IL-7 et l'IL-7R $\alpha$  possèdent un nombre réduit de lymphocytes T comparés aux souris normales. Les souris surexprimant de façon systémique l'IL-7 possèdent 30 fois plus de lymphocytes T matures que les souris normales (91). Bien que cette accumulation de lymphocytes T soit en partie attribuable à une augmentation de la production thymique, une augmentation de la prolifération des lymphocytes T matures contribue aussi à hausser le nombre de cellules T. Lorsque des lymphocytes T naïfs sont transférés dans des souris IL-7<sup>-/-</sup> irradiées ou dans des souris IL-7<sup>-/-</sup>RAG<sup>-/-</sup>, donc lorsque transférés dans un environnement lymphopénique déficient en IL-7, les lymphocytes T prolifèrent peu en réponse aux signaux homéostatiques en comparaison avec les souris contrôles (92-94). De plus, les lymphocytes T naïfs disparaissent durant le mois suivant le transfert adoptif dans les souris IL-7<sup>-/-</sup> irradiées (93). En accord avec cette dernière observation, lorsque des lymphocytes T naïfs IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> sont transférés dans une souris normale, le nombre de cellules transférées détectées dans la souris receveuse

diminue rapidement suivant le transfert (92). L'IL-7 est donc important pour la survie des lymphocytes T naïfs. Les études de Schluns et al ont démontré l'importance de l'IL-7 dans la formation des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> (92). Les auteurs du papier ont utilisé des lymphocytes T naïfs OT-I, qui reconnaissent un peptide de l'ovalbumine (OVA), déficients ou non pour l'expression de l'IL-7R $\alpha$ . Un nombre égal de lymphocytes T OT-I normaux et IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> ont été transférés dans une même souris receveuse. La souris receveuse a ensuite été infectée avec le virus VSV-OVA. Le ratio lymphocytes T normaux vs IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> a été déterminé à différents temps après l'immunisation. Quatre jours après l'infection, le ratio est de 60:40 dans la rate et les ganglions, ce qui indique que les lymphocytes T OT-I IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> ont proliféré en réponse à l'infection tout comme les lymphocytes T OT-I normaux. Par contre, 40 jours après l'infection, les lymphocytes OT-I IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> représentent seulement environ 10% de la population totale de lymphocytes T OT-I transférés. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> soient moins aptes que les lymphocytes T normaux à survivre et à se différencier en lymphocytes T mémoires. L'IL-7 est important pour la différenciation des lymphocytes T effecteurs en cellules mémoires.

L'ARNm de l'interleukine-15 a été détecté dans plusieurs tissus dont, le placenta, les muscles squelettiques, les reins, les poumons et le cœur (48). L'IL-15 est aussi produit par plusieurs types cellulaires dont les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules stromales de la moelle osseuse (95-100). Le patron d'expression très étendu de l'IL-15 suggère que cette cytokine joue plusieurs rôles autant dans le système immunitaire que dans le reste de l'organisme. En effet, l'IL-15

affecte plusieurs cellules en dehors du système immunitaire. Par exemple, cette cytokine sert d'agent anabolique pour les muscles squelettiques et il a été suggéré qu'elle ait un rôle à jouer dans la différenciation des cellules musculaires (101,102). Dans le système immunitaire, l'IL-15 joue un rôle essentiel dans le développement des cellules NK et des IELs (99,103-106). L'IL-15 est capable de promouvoir la prolifération des lymphocytes T activés *in vitro* mais cette cytokine ne semble pas être nécessaire *in vivo* puisque la réponse immunitaire des lymphocytes T paraît normale chez souris déficientes pour l'IL-15 (IL-15<sup>-/-</sup>) (48,104,107,108). De plus, l'IL-15 est capable de promouvoir la prolifération des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> autant *in vitro* et *in vivo* (55,56). Les souris transgéniques pour l'IL-15 possèdent plus de lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> (CD44<sup>hi</sup> et Ly-6C<sup>+</sup>) dans les organes lymphoïdes secondaires (106,109). Les souris IL-15Rα<sup>-/-</sup> sont déficientes en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> simples positifs dans le thymus ainsi qu'en lymphocytes T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> et CD44<sup>int</sup> en périphérie (105). De plus, les souris déficientes en IL-15 ont un nombre normal de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> simples positifs mais présentent aussi une déficience en lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> (104). Ces observations suggèrent que l'IL-15 joue un rôle dans la génération ou la survie des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup>. Afin de déterminer le rôle exact de l'IL-15, le groupe de Becker<sup>0</sup> a étudié la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> contre le virus LCMV dans des souris déficientes pour l'IL-15 ou pour l'IL-15Rα (108). Les auteurs ont observé que les souris déficientes étaient capables de répondre à l'infection de la même manière que les souris normales. En effet, la fréquence des lymphocytes T spécifiques au virus à jour 8 post-infection, soit au pic de la réponse, est similaire entre toutes les souris. De

plus, toutes les souris ont été capables d'éliminer le virus. Des lymphocytes T mémoires spécifiques à LCMV ont été détectés à 30, 50 et 140 jours post-infection, autant dans les souris déficientes que dans les souris contrôles. Les lymphocytes T mémoires retrouvés dans les souris  $IL-15^{-/-}$  et  $IL-15R\alpha^{-/-}$  possèdent les mêmes caractéristiques et les mêmes marqueurs phénotypiques que les cellules mémoires produites chez les souris normales. De plus, les lymphocytes T mémoires détectés chez les souris déficientes protègent l'organisme contre une deuxième rencontre avec le virus au même titre que les cellules mémoires des souris contrôles. L'IL-15 n'est donc pas nécessaire afin de générer des lymphocytes T mémoires  $CD8^{+}$  fonctionnels. Cependant, les auteurs ont observé que le nombre de lymphocytes T mémoires diminue au cours des mois suivant la réponse antigénique dans les souris déficientes en comparaison avec les souris contrôles. Il y a donc une perte sélective des cellules mémoires en absence de signaux fournis par l'IL-15. Ces observations suggèrent que l'IL-15 soit un facteur de survie des lymphocytes T mémoires  $CD8^{+}$ . Les auteurs ont aussi observé que, lorsque des lymphocytes T mémoires sont transférés dans des souris  $IL-15^{-/-}$ , ils prolifèrent très peu, contrairement à ceux transférés dans des souris normales qui se divisent 1 à 4 fois. Le groupe de Goldrath et al a aussi rapporté des résultats similaires (62). L'IL-15 est donc impliqué dans la prolifération homéostatique basale des lymphocytes T mémoires  $CD8^{+}$ .

Vous trouverez ci-dessous un schéma représentant la réponse immunitaire des lymphocytes T naïfs et le rôle des trois cytokines d'intérêt, l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, dans les différentes phases de la réponse (Figure 4, p.26).

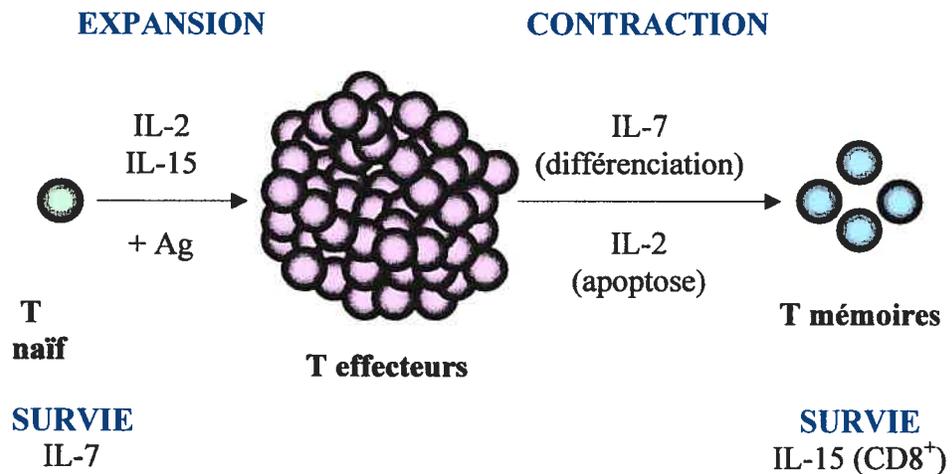


Figure 4 : Représentation schématique de la réponse immunitaire des lymphocytes T. Suite à la reconnaissance antigénique, il y a une phase d'expansion durant laquelle les lymphocytes T naïfs prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs. Après l'élimination du pathogène par les lymphocytes T effecteurs, il y a une phase de contraction durant laquelle la majorité d'entre eux meurent tandis que les lymphocytes T effecteurs restants se différencient en lymphocytes T mémoires. L'IL-2 est impliqué dans l'apoptose des lymphocytes T effecteurs tandis que l'IL-7 est impliqué dans leur différenciation en cellules mémoires. L'IL-15 est un facteur de survie des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> et le facteur de survie des lymphocytes T naïfs est l'IL-7.

### 3. PROBLÉMATIQUE

Bien des aspects du développement des lymphocytes T mémoires n'ont pas encore été élucidés. Pourtant, il est primordial d'en connaître toutes les facettes puisque la production des lymphocytes T mémoires est le but principal de la vaccination. Dès lors, une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la formation des lymphocytes T mémoires permettra d'améliorer les méthodes de vaccination. Le modèle de différenciation linéaire stipule que durant la phase de contraction, la majorité des lymphocytes T effecteurs meurent tandis qu'une petite proportion d'entre eux survivent pour se différencier en lymphocytes T mémoires. Pourquoi un lymphocyte T effecteur meurt par apoptose tandis qu'un autre survit pour devenir un lymphocyte T mémoire? Qu'est-ce qui détermine l'avenir des lymphocytes T effecteurs? Est-il possible d'influencer leur destin durant la réponse immunitaire ou est-il scellé au moment de la reconnaissance antigénique? Ces questions sans réponses doivent être résolues afin de mieux comprendre le processus de formation de la mémoire immunologique. Vu l'importance des cytokines dans la régulation des différents aspects du système immunitaire, nous croyons qu'elles ont un rôle à jouer dans l'avenir des lymphocytes T effecteurs. L'IL-7 a déjà été identifié comme un facteur essentiel lors de la formation des lymphocytes T mémoires. De plus, nous savons que l'IL-2 est impliqué dans la mort des lymphocytes T effecteurs et que l'IL-15 est un facteur de survie des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup>. Toutes ces cytokines agissent sur les cellules en se liant à un récepteur spécifique. La quantité de signaux reçus par les cellules est influencée par la quantité de récepteurs à leur surface. Dès lors, le niveau d'expression des récepteurs est un aspect important de la

régulation du système immunitaire par les cytokines. En considérant l'importance des cytokines et de leurs récepteurs, nous croyons que le niveau d'expression des récepteurs de cytokines détermine l'avenir des lymphocytes T effecteurs. Par exemple, un lymphocyte T effecteur qui exprime beaucoup d'IL-2R recevra plus de signaux apoptotiques qu'un lymphocyte T effecteur qui en exprime moins donc il ne survivra pas à la phase de contraction. À l'opposé, un lymphocyte T effecteur qui reçoit beaucoup de signaux via le récepteur de l'IL-7 a plus de chance de se différencier en lymphocytes T mémoires qu'un autre lymphocyte T effecteur. De plus, il est possible que le patron d'expression de ces récepteurs soit déterminé lors de la reconnaissance antigénique, ce qui concorderait avec le concept de programmation de la réponse immunitaire.

### **3.1 Hypothèse**

Nous postulons que les lymphocytes T effecteurs qui survivront à la phase de contraction pour devenir des lymphocytes T mémoires seront ceux qui auront modulé l'expression de certains récepteurs de cytokines telles que l'IL-2, IL-7 et IL-15. Les lymphocytes T effecteurs qui survivront devront avoir diminué l'expression de l'IL-2R $\alpha$  tout en augmentant l'expression de l'IL-2R $\beta$ , l'IL-7R $\alpha$  et l'IL-15R $\alpha$  à leur surface.

## **3.2 Objectifs**

### **3.2.1 Modèle pour l'étude du développement des lymphocytes T mémoires**

Afin de pouvoir étudier le développement des lymphocytes T mémoires, nous avons élaboré un modèle de transfert adoptif. Un transfert adoptif consiste à transférer des lymphocytes T d'une spécificité antigénique connue dans des souris naïves. Les souris receveuses sont ensuite immunisées avec l'antigène spécifique aux lymphocytes T transférés afin de les activer. Nous pouvons ensuite étudier les différents aspects de la réponse immunitaire en suivant l'évolution des lymphocytes T transférés.

### **3.2.2 Étude du rôle des cytokines dans la formation des lymphocytes T mémoires**

Afin d'étudier le rôle des cytokines dans le développement des lymphocytes T mémoires, l'expression des récepteurs des cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 à la surface des lymphocytes T effecteurs a été déterminée tout au long de la réponse antigénique. Leur expression a aussi été déterminée sur les lymphocytes T effecteurs apoptotiques vs non apoptotiques. L'expression de ces récepteurs, sauf de l'IL-15R $\alpha$ , a été détectée à l'aide d'anticorps spécifiques. Le niveau d'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  présent dans les lymphocytes T effecteurs et mémoires a aussi été déterminé tout au long de la réponse immunitaire.

### **3.2.3 Production d'un réactif permettant de suivre l'expression du récepteur de l'interleukine 15**

Malheureusement, il n'existe aucun anticorps permettant de détecter l'expression de l'IL-15R $\alpha$ . Afin de pouvoir détecter l'expression de ce récepteur à la surface des lymphocytes T effecteurs durant la réponse antigénique, nous voulons produire une protéine de fusion composée en partie de l'IL-15.

**Chapitre 2**  
**Article**

## AVANT-PROPOS

Trois personnes ont contribué aux travaux présentés dans l'article faisant l'objet de ce chapitre. Toutes les expériences ont été effectuées par l'auteur de ce mémoire, soit Marie-Hélène Lacombe. Julie Rooney, en sa qualité d'assistante de recherche du laboratoire, a aidé à la réalisation de certaines expériences. Comme investigatrice principale du laboratoire, le Dr Nathalie Labrecque a élaboré le projet de recherche et a grandement participé à la planification des expériences avec le premier auteur de l'article.

**Memory T lymphocytes are selectively produced by effector  
T cells that have received cytokine signals**

**Marie-Hélène Lacombe\*, Julie Rooney\* and Nathalie Labrecque\*<sup>1</sup>**

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

Running title: Cytokines promote memory T cell generation

<sup>1</sup>Address correspondence and reprint requests to: Nathalie Labrecque, Ph.D

Guy-Bernier Research Centre,

Maisonneuve-Rosemont Hospital,

5415 boul. de l'Assomption,

Montreal, Qc, Canada HIT 2M4

E-mail address: [nlabrec@hmr.qc.ca](mailto:nlabrec@hmr.qc.ca)

**Abstract**

The mechanism behind the differentiation of effector T cells into memory T cells is not yet understood. In this study, we have investigated the role of cytokine signaling in memory T cell generation. Interestingly, our data showed that the beta chain of the IL-2 receptor along with the alpha chain of the IL-7 receptor are more expressed on apoptotic effector T cells than on non apoptotic effector T cells during the contraction phase. Therefore, there is a disparity in cytokine signaling between effector T cells that are dying and those that are surviving to become memory T cells. Also, we observed increase IL-15 receptor alpha chain mRNA level following immunization and during the contraction phase of the response. Since IL-15 is a survival factor for memory T cells, it is logical that this receptor is up regulated on effector T cells that are becoming memory T cells. These observations suggest that memory T cells develop preferentially from effector T cells that have received a specific combination of cytokines signals. A better understanding of the mechanisms behind memory T cell production will help to elaborate better vaccines.

**Keywords:** T cell response, cytokine receptors, cytokines, vaccination

## Introduction

Following antigen encounter, T lymphocytes undergo massive clonal proliferation and differentiate into effector T cells responsible for pathogen clearance. After elimination of the pathogen, there is a contraction phase where most effector T cells die by apoptosis while the remaining effector T cells differentiate into memory T cells which are responsible for long term protection of the organism against reinfection (1). The mechanism implicated in memory T cell development is not yet understood. A better understanding of memory T cell production will help to produce better vaccines since the goal of vaccination is to produce long-term memory T cells. The model of memory T cell differentiation for which there is more convincing experimental evidence is the linear differentiation pathway in which the effector T cells that survive the contraction phase differentiate into memory T cells (2-7). Several experiments have demonstrated that once activated, naïve T cells undergo a differentiation program that leads to effector T cells formation and subsequent memory T cell production (5,6). A recent paper reported that the contraction phase of CD8<sup>+</sup> T cell response is also programmed following antigen encounter (8). Some cytokines have been implicated in the development of memory T cells. IL-2 is involved in the apoptosis of effector T cells during the contraction phase (1,9,10). IL-7 is necessary for memory CD8<sup>+</sup> T cells production (11) while IL-15 is an important survival factor for memory CD8<sup>+</sup> T cells (12-19). Yet, no cytokine involved in the formation and survival of CD4<sup>+</sup> memory T cells have been identified. All these type I cytokines bind to a receptor containing the common gamma-chain ( $\gamma_c$ ) (20). The IL-2 receptor is composed of two other chains beside  $\gamma_c$ , an alpha chain (IL-2R $\alpha$ ) and a

beta chain (IL-2R $\beta$ ) (21). High level expression of IL-2R $\beta$  is observed on memory CD8<sup>+</sup> T cells in absence of IL-2R $\alpha$  (22,23). The IL-15 receptor is composed of a high affinity alpha chain (IL-15R $\alpha$ ) and of the IL-2R $\beta$  chain (24-28). The use of IL-2R $\beta$  by the IL-15 receptor explains the fact that CD8<sup>+</sup> memory T cells expressed IL-2R $\beta$ . IL-15R $\alpha$  is not expressed on naïve CD8<sup>+</sup> T cells but is up-regulated on effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells (17,18). The IL-7 receptor alpha-chain (IL-7R $\alpha$ ) is expressed on both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> naïve T cells and is further up-regulated on CD8<sup>+</sup> memory T cells (17,29).

Since cytokines play important roles in the antigenic response, cytokine signaling may be involved in the fate of effector T cells. We postulate that memory T cells come from effector T cells that have modified the expression of cytokines receptors known to be involved in the apoptosis of effector T cells (IL-2R) or in the generation (IL-7R $\alpha$ ) and survival of memory T cells (IL-15R) (1,9-19). We have elaborated an adoptive transfer model to study cytokine receptor expression during T cell response to antigen. Our results showed a modulation of IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  expression on effector T cells during the antigenic response and that these receptors are more expressed on apoptotic than on viable effector CD8<sup>+</sup> T cells. Those observations suggest that effector T cells that have received cytokine signals will be able to survive the contraction phase and then differentiate into memory T cells. In addition, our data show an increase of IL-15R $\alpha$  mRNA expression in effector T cells during the immune response. Our observations suggest that cytokine receptor expression play a role in the fate of effector CD8<sup>+</sup> T cells thus regulating memory CD8<sup>+</sup> T cell production.

## **Material and methods**

### *Mice*

Wild type C57BL/6 mice were bred at the Guy-Bernier Research Center of Maisonneuve-Rosemont Hospital or were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Quebec, Canada). 2C TCR transgenic mice, kindly provided by Dr. Claude Perreault (Guy-Bernier Research Center of Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada), were bred to C57BL/6 mice at the Guy-Bernier Research Center. Mice were kept under specific pathogen free conditions. All mice used were between 6 and 10 weeks of age.

### *Antibodies and flow cytometry*

The culture supernatants of the following hybridomas were used : H129 (anti-CD4), M5/114 (anti-classII), RA3-6B2 (anti-B220) and 1B2 (anti-2C TCR, a gift from Dr. Claude Perreault). The following antibodies were used : anti-CD8 PerCP (clone 53-6.7, BD Biosciences, San Jose, CA), anti-CD8 PE-Cy7 (clone CT-CD8a, Caltag, Burlingame, CA), anti-CD44 FITC (clone 1M7.8.1, Caltag), anti-CD44 APC (clone 1M7, BD Biosciences), anti-Ly6C FITC (clone AL-21, BD Biosciences ), anti-CD122 biotin (anti-IL-2R $\beta$ , clone TM- $\beta$ 1, BD Biosciences), anti-CD127 biotin (anti-IL-7R $\alpha$ , clone A7R34, ebioscience, San Diego, CA), anti-INF $\gamma$  FITC (clone XMG1.2, Caltag), PE conjugated rat anti-mouse IgG<sub>1</sub> (clone A85-1, BD Biosciences), APC conjugated rat anti-mouse IgG<sub>1</sub> (clone X56, BD Biosciences), FITC conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rat IgG (H+L) (Caltag). Streptavidin-PE (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 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), 0,03M HEPES (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), and 0,1%  $\text{NaN}_3$  (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada)). Samples were analyzed on a FACSCalibur or a FACSVantage SE cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA ) using CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA), WinMDI software (from Joseph Trotter, Scripps Clinic, La Jolla, CA) or FlowJO software (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

#### *Adoptive transfer and immunization*

Lymph node cells (axillary, inguinal and mesenteric) from 2C transgenic mice were stained with anti-CD4, anti-classII and anti-B220 antibodies. Stained cells were depleted using a FACSVantage SE cell sorter to obtain an enriched 2C  $\text{CD8}^+$  T cell population.  $5 \times 10^5$  sorted 2C T cells were injected i.v. into nonirradiated C57BL/6 mice. The recipient mice were immunized 3 days later with s.c. injection of 75  $\mu\text{g}$  SYRGL peptide emulsified in complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) at the base of the tail.

#### *AnnexinV staining*

$2 \times 10^6$  inguinal lymph node cells were stained with anti-CD122 or anti-CD127 Abs in combination with anti-CD8 and 1B2 Abs as described above. Cells were then incubated with 5  $\mu\text{l}$  of AnnexinV FITC (Biosource, Camarillo, CA) and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of propidium iodide (Sigma-Aldrich) in 50  $\mu\text{l}$  of AnnexinV binding buffer (10mM HEPES/NaOH pH7.4, (Invitrogen) Burlington, Ontario, Canada), 140 mM NaCl

(Sigma-Aldrich), 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> (VWR International, Ltd., Montreal, Quebec, Canada)) for 15 minutes at room temperature in the dark.

#### *Intracellular IFN $\gamma$ staining*

Splenocytes were resuspended at 10<sup>6</sup> cells/mL and then restimulated *in vitro* with or without 1  $\mu$ g/mL of SYRGL in complete RPMI 1640 (supplemented with 10% fetal bovine serum (Fisher), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 0,1 mM non essential amino acids (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 10  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (Invitrogen) and penicillin-streptomycin (Invitrogen)) for 6 hours at 37°C. 10  $\mu$ l of brefeldin A (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich) per mL of cells was added for the last 2 hours of stimulation. Restimulated cells were washed with ice-cold PBS and resuspended at 2x10<sup>6</sup>/mL in ice-cold PBS. Cells were fixed by adding an equal volume of 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS 1.4X and then were incubated 20 minutes at room temperature. Fixed cells were washed once in ice-cold PBS and resuspended in FACSwash. 10<sup>6</sup> cells were incubated with 150  $\mu$ L of permeabilization buffer (0.5% saponin (Sigma-Aldrich) in FACSwash) for 10 minutes at room temperature. Cells were pelleted and incubated with 50  $\mu$ L of permeabilization buffer containing anti-IFN $\gamma$  FITC antibody for 30 minutes at room temperature. Cells were washed twice in FASCwash and then stained with anti-CD8 and 1B2 Abs.

#### *Analysis of IL-15R $\alpha$ mRNA expression*

2x10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup> T cells from inguinal lymph nodes of several mice were sorted directly in 1mL of TRIzol solution (Invitrogen) using a FACSVantage SE cell sorter (BD Biosciences) at different time after immunization. RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using synthetic oligo(dT)

oligonucleotides (Invitrogen) and Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). PCR were performed on 2  $\mu$ l of serial cDNA dilutions. The following primers were used for IL-15R $\alpha$  PCR: forward, 5'-ACT TCT GCA GGA ACT ACA GGG-3' and reverse, 5'-GTG TCT TCA TCC TCC TTG CTG-3'. The primers used for CD8 $\alpha$  PCR were: forward, 5'- AGG TGG ACC TGG TAT GTG AAG-3' and reverse, 5'-TTT CTG AAG GAC TGG CAC GAC- 3'. PCR reactions were performed in 1X Taq buffer, 1.5 mM (CD8 $\alpha$ ) or 0.5 mM (IL-15R $\alpha$ ) MgCl<sub>2</sub>, 75  $\mu$ M dNTPs, 10 pmol of each primer and 0.5 U Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich). PCR reactions were done using 30 cycles: 94°C, 30s; 58°C, 30s; 72°C, 30s.

PCR products were run on a 1.5% agarose gel and transferred to Nytran SuPerCharge nylon membrane (VWR International). Membranes were pre-hybridized in 6X SSC, 5X Denhardt's and 0.5% SDS for one hour at 50°C. Probes were prepared using the following internal primers: IL-15R $\alpha$ , 5'-GGG TTG TGA TGG CTT TCC TGG-3'; IL-7R $\alpha$ , 5'-TGC TGC CAA ACT CTG GAA AC-3'; CD8a, 5'-TCA GTC ATC AGC AAC TCG GTG-3'. Probe labeling reactions were performed using 1X forward buffer, 20 pmol of primer, 40  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]ATP (Amersham Biosciences Inc., Baie d'Urfé, Quebec, Canada) and 10U of T4 polynucleotide kinase (Invitrogen) at 37°C for 30 minutes. Membranes were hybridized with the labeled probe over night at 50°C. Membranes were washed two times with pre-heated wash solution (2X SSC, 0.1% SDS) for 15 minutes at 42°C. Membranes were then exposed on a Kodak storage phosphor screen (Amersham). The exposed screens were scanned on a Storm phosphor imager (Storm M840, Amersham) and analyzed using the Image Quant program (Molecular Dynamics, Amersham).

## Results

### *Elaboration of a model for the study of memory T cell development*

We developed an adoptive transfer system to study memory T cell development. To do so, we transferred  $5 \times 10^5$  sorted 2C TCR transgenic  $CD8^+$  T cells in C57BL/6 naive mice followed by immunization with the specific antigenic peptide SYRGL emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) three days later. Five days after immunization, 2C T cells ( $CD8^+1B2^+$ ) represent 1-2% lymph nodes cells in immunized recipients while no 2C cells were detected in lymph nodes of control mice (Fig.1A). All 2C cells detected were activated since they expressed high level of CD44, compared to the sorted 2C  $CD8^+$  T cells that are  $CD44^{neg}$  (data not shown). Then, the kinetic of the immune response was established to determine the onset of the contraction phase in our model. The number of 2C cells present in inguinal lymph nodes was determined at several days post-immunization. The peak of the response occurs at day 5 post-immunization followed by the contraction phase of the response up to day 10 (Fig.1B). Finally, we determined if the 2C cells detected after the immune response were functional memory T cells. One month after immunization, 2C cells were  $CD44^{high} Ly6C^{high}$ , a hallmark of  $CD8^+$  memory T cells (Fig.1C). These 2C cells are long lived memory T cells since they were still detectable three months after immunization (data not shown). Moreover, these cells produced  $IFN\gamma$  *ex vivo* when restimulated for 6h with the SYRGL peptide (Fig.1C). Therefore, our protocol generates a population of functional  $CD8^+$  memory T cells and allows us to study the expression of cytokine receptors on effector T cells during the contraction phase of the immune response.

*Cytokine receptors expression on effector T cells during the immune response*

Cytokines play important roles during the immune response. IL-2 is involved in effector T cell apoptosis and IL-7 is necessary for memory T cell production while IL-15 is essential for memory CD8<sup>+</sup> T cell survival. Thus, cytokine signaling may regulate the fate of effector T cells and subsequent memory T cell production. We postulated that effector T cells that survive the contraction phase to become memory T cells are the ones that have modified the expression of some cytokine receptors such as IL-2, IL-7 and IL-15 receptors, in order to receive optimal differentiation and survival signals. To verify this hypothesis, the surface expression of IL-7R $\alpha$  and of IL-2R $\beta$  on 2C cells was assessed during T cell response to antigen. Fig.2A shows the expression of these receptors on 2C cells (CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup>) from inguinal lymph nodes relatively to the recipient CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup>1B2<sup>-</sup>) which did not respond to the antigen. Similar results were obtained with splenic T cells (data not shown). The expression of IL-2R $\beta$  increased at day five post-immunization on 2C cells relatively to the recipient CD8<sup>+</sup> T cells (Fig.2A). This up-regulation persists during the contraction phase of the immune response but is less important than on day 5. In contrast to IL-2R $\beta$ , IL-7R $\alpha$  expression decreased on 2C cells following immunization. From day 7 to day 20, the expression of this receptor is down regulated on most of the 2C cells while a small proportion of them keep a level of expression comparable to naïve CD8<sup>+</sup> T cells. The lower level of expression of IL-7R $\alpha$  on activated 2C cells is not due to a lower level of expression of this receptor on 2C cells since naïve 2C cells expressed similar level of IL-7R $\alpha$  than polyclonal CD8<sup>+</sup> T cells from C57BL/6 mice (data not shown). To take into account for the variation

of staining intensity on recipient cells from one day to another (Fig.2A), we normalized the results obtained in Fig.2A. To do so, we divided the mean fluorescence intensity (MFI) of receptor expression on 2C cells by the MFI on recipient CD8<sup>+</sup> T cells to obtain a MFI ratio. A ratio superior to one means that the expression of the receptor is up regulated on 2C cells compared with recipient CD8<sup>+</sup> T cells whereas a ratio lower than one represents down regulation of the receptor. The normalized results for each mouse of three independent experiments are shown in Fig.2B and C. All the ratio for the IL-2R $\beta$  are over one indicating that this receptor is clearly up regulated after immunization (Fig.2B). The ratio seems to stay constant over time although there is variation between mice. In contrast, the IL-7R $\alpha$  ratios are always below one meaning that the expression of this receptor is down regulated after immunization (Fig.2C). The down regulation becomes more important over time and stabilizes around day fifteen. These results show a modulation of IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  expression during the immune response but the important variation observed between each mouse prevent the definitive establishment of a receptor expression pattern. However, our observations suggest that the level of expression of these cytokine receptors may play a role in the fate of effector T cells.

*Cytokine receptors expression on apoptotic versus non apoptotic effector T cells during the immune response*

To evaluate if the expression level of IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  determines the fate of effector T cells, we evaluated if their expression differ between the effector T cells that are dying (apoptotic) and those who are surviving to become memory T cells (non apoptotic). To do so, we used annexinV (AnnV) staining in combination with

propidium iodide (PI) to discriminate the apoptotic ( $\text{AnnV}^+\text{PI}$ ) and the non apoptotic ( $\text{AnnV}^-\text{PI}$ ) cells. Fig.3 shows the expression of the cytokine receptors on inguinal lymph nodes 2C cells using the same MFI ratio as described previously. For both receptors, IL2R $\beta$  (Fig.3A) and IL-7R $\alpha$  (Fig.3B), the apoptotic 2C cells express more receptor than the non apoptotic cells. These results showed that 2C effector T cells that survive the contraction phase to become memory T cells express less IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  than effector T cells that die following pathogen elimination. This suggests that a link between the cytokine receptor expression and the fate of the effector T cells may exist.

*IL-15R $\alpha$  mRNA expression in effector T cells during the immune response*

Since IL-15 is a survival factor for memory CD8<sup>+</sup> T cells, we determine the expression of the IL-15 receptor  $\alpha$  chain (IL-15R $\alpha$ ) on effector T cells during the antigenic response. Unfortunately, there is no antibody able to detect the surface expression of this receptor. Moreover, several attempts to produce an IL-15 fusion protein failed in our hands (Lacombe, M.-H., unpublished observations). For these reasons, we assessed the IL-15R $\alpha$  expression at the mRNA level. 2C effector T cells were isolated from inguinal lymph nodes of several mice by cell sorting at different time after immunization. RNA was extracted and the IL-15R $\alpha$  mRNA expression was determined by semi-quantitative RT PCR using serial cDNA dilutions. The results were then normalized to an internal control, CD8 $\alpha$ . Our results showed an induction of IL-15R $\alpha$  mRNA expression following immunization while no expression was detected in naïve 2C T cells. The mRNA level is more or less stable from day 5 to day 10 after immunization. At day 14, the expression ratio decreased but the mRNA

level rose again at 20 days post-immunization. For our experiments, we pooled inguinal lymph node cells from several mice for each time point. It is possible that, at day 14, some of the mice used for this particular time point did not have a normal immune response compared to the other mice. Therefore, it seems that IL-15R $\alpha$  mRNA level is stable during the whole contraction phase. Our observations suggest that up regulation of IL-15R $\alpha$  expression favored the survival of effector T cells to allow their differentiation into memory T cells.

## Discussion

In this paper, we have investigated the implication of cytokine signaling in memory CD8<sup>+</sup> T cell production. Using an adoptive transfer model, we were able to establish the expression pattern of IL-2R $\beta$ , IL-7R $\alpha$  and IL-15R $\alpha$  on effector T cells during T cell expansion and contraction. We have shown that there is a modulation of the expression of IL-2R $\beta$ , IL-7R $\alpha$  and IL-15R $\alpha$  during the antigenic response. Interestingly, our data showed that IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  are more expressed on apoptotic 2C effector T cells than on the non apoptotic effector cells. We also observed increased IL-15R $\alpha$  mRNA level following immunization and during the contraction phase of the T cell response.

### *Production of functional memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes without CD4 help*

Our adoptive transfer model generates a population of functional CD8<sup>+</sup> memory T cells after immunization. Recent studies have reported that memory CD8<sup>+</sup> T cells produced without CD4 T cell help are unable to mount a secondary response (30-33). In our protocol, we used the specific peptide SYRGL emulsified in CFA to initiate the immune response in the recipient mice. Therefore, the only cells that can be activated are 2C CD8<sup>+</sup> T cells and no CD4 T cell help was provided to them during their stimulation since the SYRGL peptide cannot be presented by MHC class II molecules. Interestingly, 2C memory T cells recovered after the immunization in our model were able to rapidly produce IFN $\gamma$  when restimulated *in vitro* with their specific peptide. These results suggest that CD4 T cell help may be replaced by inflammatory signals provided by CFA or that functional 2C memory T cells can develop in absence of CD4 help. More investigations are needed to determine if CFA

can effectively compensate for the absence of CD4 T cell help. However, our observations question the role of CD4 T help for the production of functional memory CD8<sup>+</sup> T cells and provide a mechanism to compensate for the lack of this help.

*IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  expression on effector T cells during the immune response*

Our data show a modulation of IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  expression on effector T cells during the immune response. IL-2R $\beta$  is strongly up-regulated 5 days after immunization, just before the contraction phase of the antigenic response. This correlates with the role of IL-2 in the apoptosis of effector T cells. A high IL-2R $\beta$  expression may be needed at the peak of the response to provide optimal death signal, via IL-2, to effector T cells that should die during the contraction phase. Once the death signal is provided, high IL-2R $\beta$  expression is no further needed thus explaining the drop of receptor expression during the contraction phase. However, IL-2R $\beta$  expression is not completely shut down during the contraction phase and is still up regulated compared to naïve T cells at the end of the antigenic response. This observation can be explained by the fact that IL-2R $\beta$  is also part of the IL-15 receptor. Because IL-15 is necessary for memory CD8<sup>+</sup> T cell survival (12-19), IL-2R $\beta$  expression may be needed on effector T cells to survive to the contraction phase and become memory T cells. Thus, the memory T cells produced will be ready to receive IL-15 survival signal.

Our data also show that IL-7R $\alpha$  is down-regulated following immunization. The expression of this receptor decreases over time and stabilizes at the end of the contraction phase. Since IL-7 signals are necessary for memory T cell production

(11), IL-7R $\alpha$  expression should increase during the contraction phase allowing IL-7 signaling to promote memory T cell differentiation. Instead, our results show decreased expression of this receptor on most of the 2C cells during the contraction phase. One explanation could be that effector T cells that will survive the contraction phase keep higher IL-7R $\alpha$  expression than those that will die. Thus, we would expect enrichment of effector T cells expressing high level of IL-7R $\alpha$  through the contraction phase. We effectively observed a small proportion of effector T cells keeping high expression of IL-7R $\alpha$  through out the contraction phase but there is no enrichment of this population over time. Another explanation is that once IL-7 binds to its receptor, IL-7R $\alpha$  is internalized thus becoming less detectable by staining with our antibody or that the binding of IL-7 to its receptor blocks Ab binding (note that the Ab we used is a neutralizing Ab (29)). The fact that IL-7R $\alpha$  mRNA levels do not change during T cell response (data not shown) further support these possibilities. So, the effector T cells that survive the contraction phase would be those who have received IL-7 signals. This is reinforced by the observation that IL-7R $\alpha$  is more expressed on apoptotic than on non apoptotic effector T cells.

Similarly, the IL-2R $\beta$  chain is also differentially expressed by apoptotic and non apoptotic effector T cells; apoptotic cells express higher level of IL-2R $\beta$ . We do not believe this higher level of IL-2R $\beta$  expression to be involved in the transmission of an apoptotic signal by IL-2 since these cells should not expressed IL-2R $\alpha$ . We favour the hypothesis that non apoptotic cells express less IL-2R $\beta$  due to their interaction with IL-15. The lower amount of IL-2R $\beta$  might reflect IL-2R $\beta$  internalization following ligand binding or competition for anti-IL-2R $\beta$  Ab binding by IL-15.

*IL-15R $\alpha$  mRNA expression in effector T cells during the antigenic response*

Our results showed that IL-15R $\alpha$  mRNA expression is absent in naïve T cells and is up regulated following immunization which is in accordance with previous reports (17,28). This up-regulation of IL-15R $\alpha$  mRNA expression in effector T cells is maintained throughout the expansion and contraction phases. Because IL-15 is an important survival factor for memory CD8<sup>+</sup> T cells, it is logical that its receptor mRNA is up-regulated in effector CD8<sup>+</sup> T cells at the end of the contraction phase to prepare them to receive survival signals provided by IL-15. Thus, effector T cells that will survive the contraction phase will already be expressing IL-15R $\alpha$  at their surface once they have differentiated into memory T cells. The up regulation of IL-15R $\alpha$  expression during the expansion phase of T cell response probably reflects the ability of IL-15 to induce T cell proliferation (25,34). Although IL-15 is dispensable for CD8 T cell expansion it does not exclude its participation in T cell proliferation (14,16).

Based on our results, it is possible to elaborate a model for the role of cytokines and their receptors in the production of memory CD8<sup>+</sup> T cells. First, the effector CD8<sup>+</sup> T cells that will become memory T cells should have down-regulated IL-2R $\beta$ . Thus, the apoptotic signals provided by IL-2 will be minimized allowing these cells to survive to the contraction phase. However, these effector T cells should keep a basal expression of IL-2R $\beta$  because this chain is also part of the IL-15 receptor. Indeed, effector CD8<sup>+</sup> T cells that will differentiate in memory T cells should have up-regulated the IL-15R (IL-15R $\alpha$  and IL-2R $\beta$ ) to be ready to receive survival signals provided by IL-15 at the end of the contraction phase. Moreover, the effector CD8<sup>+</sup> T

cells that will survive the contraction phase to become memory T cells should have received IL-7 signals which is reflected by a lower detection of IL-7R $\alpha$  expression.

Our model is in agreement with the linear differentiation pathway model for the production of memory T cells (2-8). It is plausible that the expression of the cytokine receptors on effector T cells is imprint in the differentiation program undergone by naïve T cells once activated. Thus, it is possible that the fate of effector T cells is determined early in the immune response and that cytokine receptor expression reflects that fate. A question remains: what determine the cytokine receptor expression on effector T cells? Our hypothesis is that the quantity of signals transmitted by the T cell receptor (TCR) during antigenic recognition will determine the expression pattern of the cytokine receptors. Therefore, optimal signals provided by the TCR to the naïve T cells will trigger a differentiation program leading to the production of effector T cells expressing the cytokine receptor expression pattern of interest and these effector T cells will become memory.

**Figure Legends**

**FIGURE 1.** Characterization of the adoptive transfer model for the study of CD8<sup>+</sup> memory T cell development. 500 000 sorted 2C cells were transferred into non irradiated C57BL/6 mice followed by immunization with 75µg of the SYRGL peptide emulsified in CFA 3 days later. (A) 5 days after immunization, 2C T cell expansion in inguinal lymph nodes was assessed by staining with anti-CD8 and anti-2C TCR (1B2) Abs. (B) 2C CD8<sup>+</sup> T cell expansion in inguinal lymph nodes at various days after immunization. The number of CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup> T cells observed in inguinal lymph nodes is expressed as a function of the day post-immunization. Each dot represents one mouse. (C) The presence of functional 2C memory T cells was assessed by flow cytometry one month after immunization. Lymph node cells were stained with anti-CD8, anti-CD44, anti-Ly-6C and 1B2 Abs. Ly-6C and CD44 surface expression on the CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup> T cells is shown (middle panel). Splenocytes were restimulated *in vitro* with (thick line) or without (thin lane) 1µg/mL of SYRGL for 6h and IFN $\gamma$  production was assessed by intracellular staining. IFN $\gamma$  production by CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup> T cells is shown (left panel). The percentage of CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup> (2C T cells) is shown when applicable.

**FIGURE 2.** Cytokine receptor expression on effector 2C CD8<sup>+</sup> T cells during the immune response. 500 000 sorted 2C cells were transferred into non irradiated C57BL/6 mice followed by immunization with 75µg of the SYRGL peptide in CFA 3 days later. At various days after immunization, lymph node cells were stained with anti-IL-2R $\beta$  or anti-IL-7R $\alpha$  Abs in combination with anti-CD8, anti-CD44 and 1B2

Abs. (A) IL-2R $\beta$  and IL-7R $\alpha$  surface expression on CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup> (thick line) and CD8<sup>+</sup>1B2<sup>-</sup> (thin line) cells are shown relatively to isotype control staining (dotted line). These data are representative of three independent experiments. (B) Quantification of IL-2R $\beta$  expression by 2C cells during antigenic response. The mean fluorescence intensity (MFI) of IL-2R $\beta$  expression on CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T cells was normalized to the MFI of IL-2R $\beta$  expression on the CD8<sup>+</sup>1B2<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup> T cells to obtain a MFI ratio. The MFI ratio from each mouse is shown over time. (C) IL-7R $\alpha$  expression by 2C cells after immunization. MFI ratio was calculated as in B.

**FIGURE 3.** Cytokine receptor expression on apoptotic versus non apoptotic effector 2C CD8<sup>+</sup> T cells during the immune response. 500 000 sorted 2C cells were transferred into non irradiated C57BL/6 mice followed by immunization 3 days later with 75 $\mu$ g of the SYRGL peptide in CFA. At various days after immunization, lymph node cells were stained with anti-IL-2R $\beta$  or with anti-IL-7R $\alpha$  antibody in combination with anti-CD8 and 1B2 abs. Cells were concomitantly stained with annexinV and PI to detect apoptotic cells. (A) Quantification of IL-2R $\beta$  expression on annexinV<sup>+</sup> or annexinV<sup>-</sup> T cells. The mean fluorescence intensity (MFI) of IL2R $\beta$  expression on CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> T cells was normalized to the MFI of the CD8<sup>+</sup>1B2<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> T cells to obtain a MFI ratio for the annexinV<sup>+</sup> (filled circle) or annexinV<sup>-</sup> (open circle) T cells. Each dot represents one mouse. (B) IL-7R $\alpha$  expression on annexinV<sup>+</sup> and annexinV<sup>-</sup> T cells after immunization. MFI ratio was calculated as in A.

**FIGURE 4.** IL-15R $\alpha$  mRNA expression in effector 2C CD8<sup>+</sup> T cells during the immune response. 500 000 sorted 2C cells were transferred into non irradiated C57BL/6 mice followed by immunization 3 days later with 75 $\mu$ g of the SYRGL peptide in CFA. At various days after immunization,  $2 \times 10^4$  CD8<sup>+</sup>1B2<sup>+</sup> T cells were isolated from inguinal lymph nodes of several mice by cell sorting. RNA was extracted from the sorted cells followed by semi-quantitative RT-PCR to detect IL-15R $\alpha$  and CD8 mRNA expression. The following cDNA dilutions were used: for IL-15R $\alpha$  1/1, 1/2, 1/5, 1/25 and 1/125; for CD8 1/1, 1/5, 1/25 and 1/125. The PCR products were quantified by Southern blot as described in the methods. The PCR results are shown for each day in decreasing dilution order. The IL-15R $\alpha$  expression was normalized according to CD8 expression giving an expression ratio.

### **Acknowledgements**

We thank all the members of the laboratory for helpful discussions. We thank Sophie Ouellet for cell sorting. We thank Dr. Claude Perreault for kindly providing the 2C transgenic mice and the 1B2 hybridoma. This work was funded by the Canadian Institutes of Health and Research (CIHR). NL is a New Investigator of the CIHR.

**Abbreviations**

Ab: antibody

AnnV: Annexin V

CFA: complete Freund's adjuvant

IL-2R $\beta$ : IL-2 receptor beta chain

IL-7R $\alpha$ : IL-7 receptor alpha chain

IL-15R $\alpha$ : IL-15 receptor alpha chain

MFI: mean fluorescence intensity

PI: propidium iodide

TCR: T cell receptor

## References

- 1 Van Parijs, L. and Abbas, A. K. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280:243-8.
- 2 Opferman, J. T., Ober, B. T., and Ashton-Rickardt, P. G. 1999. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* 283:1745-8.
- 3 Swain, S. L., Hu, H., and Huston, G. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286:1381-3.
- 4 Hu, H., Huston, G., Duso, D., Lepak, N., Roman, E., and Swain, S. L. 2001. CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nat Immunol* 2:705-10.
- 5 Kaech, S. M. and Ahmed, R. 2001. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2:415-22.
- 6 van Stipdonk, M. J., Lemmens, E. E., and Schoenberger, S. P. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2:423-9.
- 7 Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. 2002. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111:837-51.
- 8 Badovinac, V. P., Porter, B. B., and Harty, J. T. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3:619-26.
- 9 Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S., and Schimpl, A. 1995. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 25:2572-7.

- 10 Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521-30.
- 11 Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426-32.
- 12 Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-76.
- 13 Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-9.
- 14 Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S., and Peschon, J. J. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191:771-80.
- 15 Ku, C. C., Murakami, M., Sakamoto, A., Kappler, J., and Marrack, P. 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288:675-8.
- 16 Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195:1541-8.

- 17 Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E. A. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195:1515-22.
- 18 Schluns, K. S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X. X., and Lefrancois, L. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168:4827-31.
- 19 Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D. H., Pamer, E. G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. 2002. Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure. *J Immunol* 168:1198-203.
- 20 Leonard, W. J., Shores, E. W., and Love, P. E. 1995. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* 148:97-114.
- 21 Waldmann, T. A. 1991. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 266:2681-4.
- 22 Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N., and Chen, J. 1999. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2976-81.
- 23 Chalasani, G., Dai, Z., Konieczny, B. T., Baddoura, F. K., and Lakkis, F. G. 2002. Recall and propagation of allospecific memory T cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6175-80.
- 24 Bamford, R. N., Grant, A. J., Burton, J. D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A. 1994. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally

- designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4940-4.
- 25 Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., and et al. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264:965-8.
- 26 Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., and Anderson, D. 1994. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 13:2822-30.
- 27 Giri, J. G., Anderson, D. M., Kumaki, S., Park, L. S., Grabstein, K. H., and Cosman, D. 1995. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol* 57:763-6.
- 28 Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L. S., and Anderson, D. M. 1995. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *Embo J* 14:3654-63.
- 29 Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., and Yoshida, H. 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9125-9.
- 30 Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., and Schoenberger, S. P. 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421:852-6.

- 31 Shedlock, D. J. and Shen, H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300:337-9.
- 32 Sun, J. C. and Bevan, M. J. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300:339-42.
- 33 Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. 2002. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297:2060-3.
- 34 Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A. 1994. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4935-9.

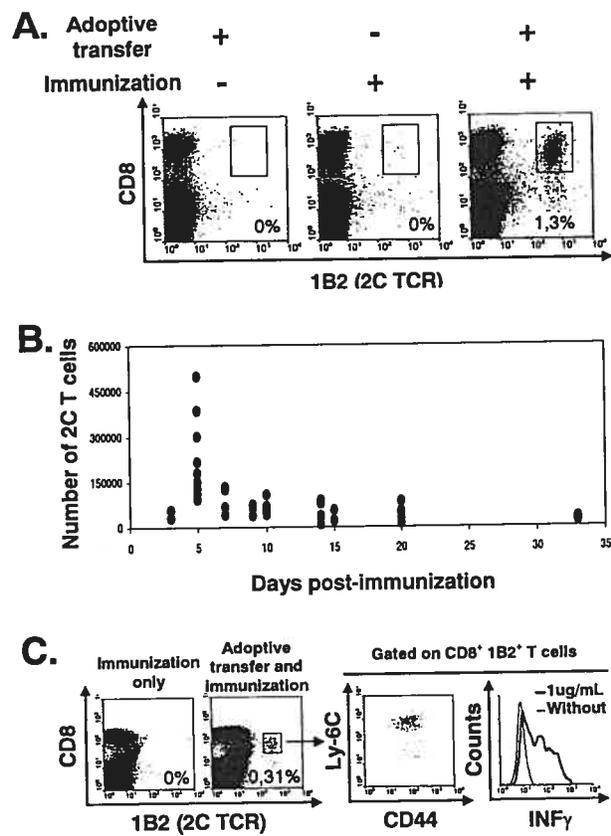
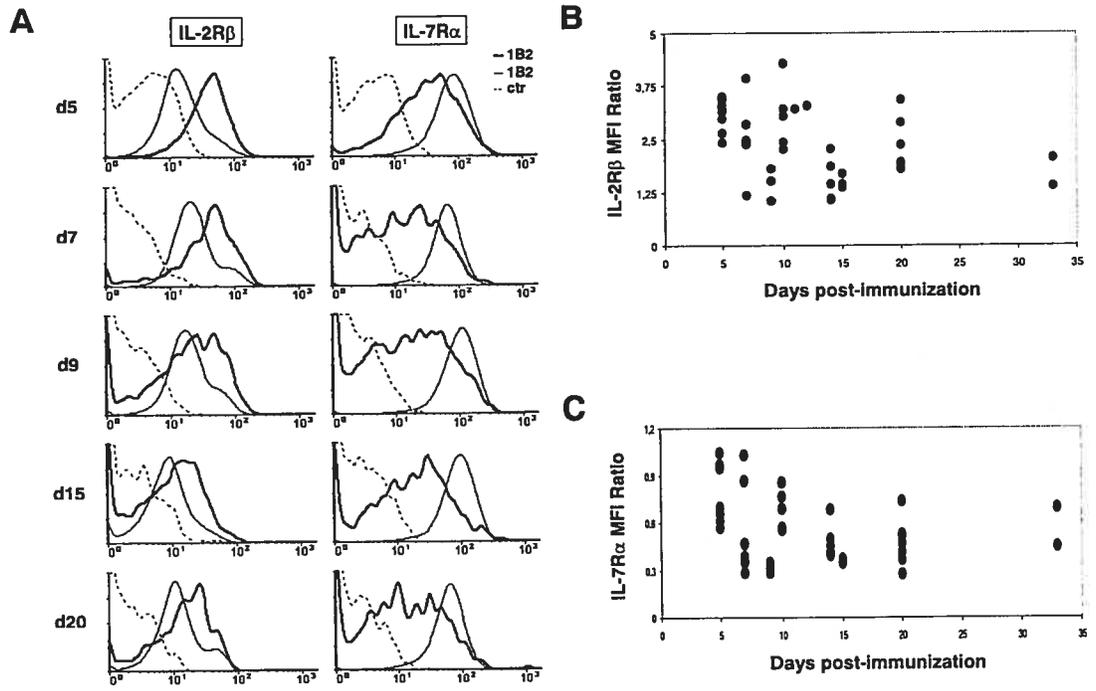


FIGURE 1



**FIGURE 2**

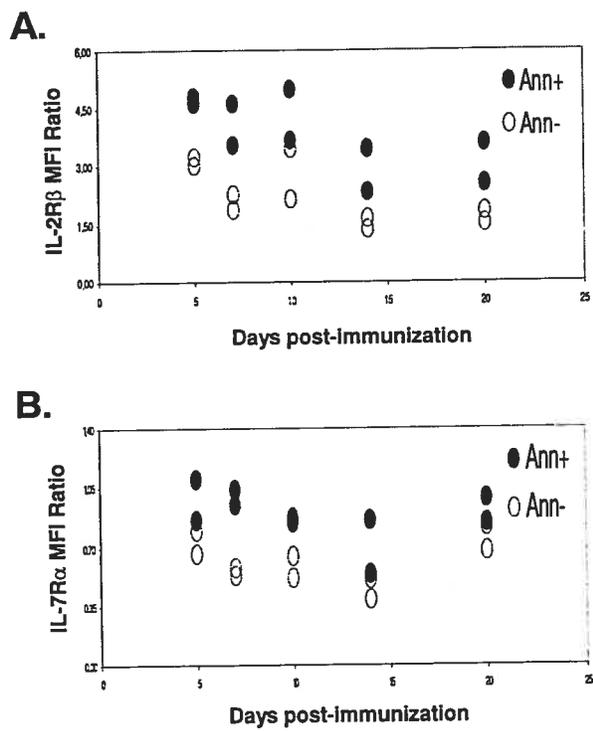
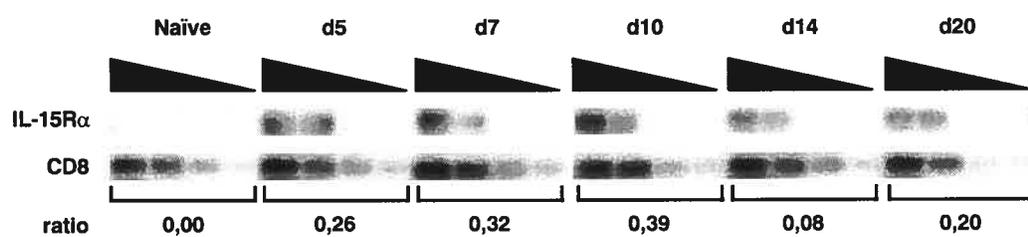


FIGURE 3

**FIGURE 4**

**Chapitre 3**  
**Protéine de**  
**fusion de l'IL-15**

## INTRODUCTION

Afin d'étudier le rôle des cytokines dans le développement des lymphocytes T mémoires, nous voulons déterminer l'expression des récepteurs de certaines cytokines, dont celui de l'interleukine-15, à la surface des lymphocytes T effecteurs. À ce jour, il n'existe aucun anticorps permettant la détection de l'expression de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) à la surface des cellules. Nous avons donc voulu développer un outil afin de caractériser le patron d'expression de l'IL-15R $\alpha$ . Cet outil consiste en une protéine de fusion qui contient le peptide de l'IL-15 ainsi qu'une séquence peptidique connue ou étiquette qui est détectable grâce à un anticorps. Nous avons élaboré deux stratégies permettant la production de deux protéines de fusion différentes, soient l'IL-15-Fc et FLAG-IL-15.

## **1. MÉTHODOLOGIE**

### **1.1 IL-15-Fc**

#### **1.1.1 Clonage IL-15-Fc**

L'ARN a été isolé à partir de muscles d'une souris C57BL/6 âgée de 8 semaines à l'aide d'une solution de TRIzol (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). L'extraction a été réalisée selon les instructions fournies par le fabricant. L'ADNc a été obtenu par transcription inverse en utilisant des oligonucléotides synthétiques oligo(dT) (Invitrogen) et la Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). La réaction de PCR a été effectuée sur l'ADNc avec des oligonucléotides spécifiques pour la séquence codante complète de l'IL-15 : sens, 5'-CGG AAT TCT AAG TAA TGA AAA TTT TGA AAC CA – 3' (contient le site de restriction EcoRI et les nucléotides 461 à 483 de l'IL-15) et anti-sens, 5'- CGG GGT ACC GGA CGT GTT GAT GAA CAT TTG-3' (contient les nucléotides 931 à 951 de l'IL-15 et le site de restriction KpnI). L'amplification PCR a été réalisée avec les réactifs suivants : tampon Taq 1X, (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,3 et 1mM dithiothreitol), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 100µM dNTP, 20pmol de chaque oligonucléotide et 0,3U de Taq Polymerase (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). La réaction PCR a été effectuée en utilisant 35 cycles: 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 55°C et 30 sec. à 72°C. Le produit de l'amplification PCR a été digéré avec les enzymes de restriction EcoRI et KpnI (Invitrogen) puis ligué dans le vecteur CosFclink (fourni par le Dr Sékaly) préalablement digéré avec les mêmes enzymes. La construction CosFclink/IL-15 a ensuite été séquencée afin de

confirmer l'identité de la séquence de l'IL-15 ainsi que pour vérifier le maintien du cadre de lecture entre l'IL-15 et la portion Fc.

### 1.1.2 Clonage IL-2/IL-15-Fc

L'ARN a été isolé à partir d'un thymus d'une souris C57BL/6 âgée de 8 semaines à l'aide d'une solution de TRIzol et l'ADNc a été obtenu comme décrit précédemment. Une réaction PCR a été effectuée sur l'ADNc avec des oligonucléotides spécifiques pour la séquence du peptide signal de l'IL-2: sens, 5'-CG GAA TTC GGC ATG TAC AGC ATG CAG CTC GC-3' (contient le site de restriction EcoRI et les nucléotides 46 à 68 de l'IL-2) et anti-sens, 5'-ATA TCT TAC ATC TAT CCA GTT GCT GTT GAC AAG GAG CAC AAG TG-3' (contient les nucléotides 86 à 108 de l'IL-2 suivi des nucléotides 610 à 630 de l'IL-15). Une autre PCR a été effectuée avec le plasmide CosFclink/IL-15 afin d'amplifier la séquence de l'IL-15 mature : sens, 5'-CTT GTG CTC CTT GTC AAC AGC AAC TGG ATA GAT GTA AGA TAT GAC-3' (contient les nucléotides 86 à 108 de l'IL-2 suivi des nucléotides 610 à 630 de l'IL-15) et anti-sens, 5'- CGG GGT ACC GGA CGT GTT GAT GAA CAT TTG-3' (contient les nucléotides 931 à 951 de l'IL-15 et le site de restriction KpnI). Les réactions PCR ont été réalisées comme il a été exposé précédemment. Afin de lier le peptide signal de l'IL-2 et le peptide mature de l'IL-15, le produit des deux PCR a été combiné. Une troisième amplification PCR a ensuite été effectuée sur le mélange de produits avec les oligonucléotides suivants : 5'-CG GAA TTC GGC ATG TAC AGC ATG CAG CTC GC-3' (contient le site de restriction EcoRI et les nucléotides 46 à 68 de l'IL-2) et anti-sens, 5'- CGG GGT ACC GGA CGT GTT GAT GAA CAT TTG-3' (contient les nucléotides 931 à 951 de l'IL-15 et le site de restriction KpnI).

La réaction PCR a été réalisée avec les composants suivant : tampon Taq 1X, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 75µM dNTP, 10pmol de chaque oligonucléotide et 0,1U de Taq Polymerase. La réaction a été effectuée en utilisant 35 cycles: 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 55°C et 30 sec. à 72°C. Le produit de l'amplification IL-2/IL-15 a été digéré avec les enzymes de restriction EcoRI et KpnI puis ligué dans le vecteur CosFclink préalablement digéré avec les mêmes enzymes. La construction CosFclink/IL-2/IL-15 a ensuite été séquencée afin de confirmer l'identité de la séquence du peptide signal de l'IL-2 et de celle de l'IL-15 mature ainsi que pour vérifier le cadre de lecture.

### 1.1.3 Production IL-15-Fc

Les vecteurs CosFclink/IL-15 et CosFclink/IL-2/IL-15 ont été transfectés séparément dans des cellules Cos-7. Les transfections transitoires ont été effectuées par précipitation au phosphate de calcium. Les cellules Cos-7 ont été mises en culture à 37°C environ 3 jours avant la transfection dans des pétris avec 10 mL de milieu (DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fetal (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), 1mM de sodium pyruvate (Invitrogen), et penicillin-streptomycin (Invitrogen)). 3 heures avant la transfection, le milieu de culture des cellules a été changé. Pour chaque transfection, 10µg de vecteur ont été combiné à 250µl de CaCl<sub>2</sub> 0.5M (Sigma-Aldrich) puis le volume fut porté à 500µl. Ensuite la solution d'ADN a été ajoutée en barbotant à 500µl de HBS 2X (Sigma-Aldrich), donnant un 1mL de solution finale. L'ADN est ensuite incubé 20 minutes à la température de la pièce. Après l'incubation, 1mL de solution d'ADN fut ajouté par pétri de cellules puis les cellules transfectées furent incubées à 37°C. 24 heures après la transfection, les

cellules ont été incubées 5 minutes dans du PBS 10% DMSO (Sigma-Aldrich) puis lavées et incubées pour 72 heures dans du milieu opti-MEM réduit en sérum et sans phénol rouge (Invitrogen). Après 24h, 48h ou 72 heures, le milieu de culture a été récupéré et la production d'IL-15-Fc a été déterminée par dot blot. La présence de protéines de fusion a été détectée à l'aide d'un anticorps anti-IgG humain (Fc spécifique) et d'un anticorps anti-lapin IgG couplé à la peroxidase (Sigma-Aldrich). Le développement des dot blots a été effectué à l'aide du réactif ECL Western Blotting (Amersham Biosciences Inc., Baie d'Urfé, Quebec, Canada). L'ARN de cellules transfectées avec CosFclink/IL-15 a été isolé l'aide d'une solution de TRIzol et l'ADNc a été obtenu comme décrit précédemment. L'expression de l'ARNm de l'IL-15 a été déterminée par PCR avec les oligonucléotides spécifiques pour la séquence codante complète de l'IL-15 utilisés pour le clonage IL-15-Fc. L'amplification PCR a été réalisée avec plusieurs dilutions d'ADNc : 1/1, 1/5, 1/25, 1/125. La réaction de PCR a été décrite antérieurement. Une amplification PCR a aussi été effectuée avec des oligonucléotides spécifiques pour le contrôle interne HPRT : sens, 5'-GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC-3' et anti-sens, 5'-CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CAA-3'.

## **1.2 FLAG-IL-15**

### **1.2.1 Clonage FLAG-IL-15**

La séquence mature de l'IL-15 a été obtenue en effectuant une réaction PCR en utilisant comme matrice le vecteur CosFclink/IL-15. Les oligonucléotides suivant ont

été utilisé : sens, 5'-CGG AAT TCC AAC TGG ATA GAT GTA AGA TAT-3' (contient le site de restriction EcoRI et les nucléotides 610 à 630 de l'IL-15) et anti-sens, 5'-CGG GGT ACC TCA GGA CGT GTT GAT GAA CAT TTG-3' (contient les nucléotides 931 à 954 de l'IL-15 et le site de restriction KpnI). L'amplification PCR a été réalisée avec les réactifs suivant : tampon Taq 1X, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 100µM dNTP, 20pmol de chaque oligonucléotide et 0,3U de Taq Polymerase. La réaction PCR a été effectuée en utilisant 35 cycles: 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 55°C et 30 sec. à 72°C. Le produit de l'amplification PCR a été digéré avec les enzymes de restriction EcoRI et KpnI puis ligué dans le vecteur pFLAG-MAC (Sigma-Aldrich) préalablement digéré avec les mêmes enzymes. La construction pFLAG-MAC/IL-15 a ensuite été séquencée afin de confirmer l'identité de la séquence de l'IL-15 mature ainsi que pour vérifier le maintien du cadre de lecture entre l'étiquette FLAG et l'IL-15. L'IL-15 a été cloné en aval de l'étiquette FLAG.

### **1.2.2 Production et purification FLAG-IL-15**

Des bactéries BL21 ont été transformées avec le plasmide pFLAG-MAC/IL-15 (FLAG-IL-15) ou pFLAG-MAC (contrôle négatif) puis mises en culture à 37°C dans du milieu Super Broth supplémenté avec 0,4% de glucose et 50ug/mL d'ampicilline jusqu'à l'obtention d'une longueur d'onde d'environ 0,8. Les bactéries ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans du milieu frais sans ampicilline. De l'IPTG (2,5mM) a été ajouté pour une induction de 4h à 30°C. Après l'induction, un extrait cellulaire a été préparé à partir des bactéries en suivant les étapes 1 à 6 du protocole 8 du chapitre 15 du livre Molecular Cloning (p15-50 à 15-52). L'extrait a ensuite été purifié sur colonne d'affinité anti-FLAG M<sub>2</sub> selon les instructions fournies par le

fabricant (Sigma-Aldrich). La production de FLAG-IL-15 a été évaluée par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-FLAG M<sub>2</sub> et d'un anticorps anti-souris IgG couplé à la peroxidase ou à l'aide d'un anticorps anti-IL-15 et d'un anticorps anti-lapin couplé à la peroxidase (Sigma-Aldrich). Le développement des Western Blot a été effectué à l'aide du réactif ECL Western Blotting. La pureté des échantillons de FLAG-IL-15 a été déterminée avec une coloration au Sypro Ruby d'un gel de polyacrylamide en suivant les instructions fournies par le fabricant (Amersham).

## **2. RÉSULTATS**

### **2.1 Protéine de fusion IL-15-Fc**

#### **2.1.1 Clonage IL-15-Fc**

Le vecteur CosFclink permet la production d'une protéine de fusion liée à la portion Fc de l'IgG humain. La portion Fc correspond aux segments identiques C-terminaux des deux chaînes lourdes de l'immunoglobuline. Nous avons décidé d'utiliser ce vecteur afin d'obtenir une protéine de fusion IL-15-Fc puisque la portion Fc est aisément détectable en cytofluorométrie. En effet, suite à la liaison de la portion IL-15 de la protéine à l'IL-15R, il est possible de détecter la portion Fc à l'aide d'un anticorps anti-IgG humain. Il suffit ensuite d'utiliser un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome afin de détecter la présence de l'anticorps primaire. Le complexe ainsi formé par les anticorps et la protéine de fusion peut être détecté en cytofluorométrie. Il sera donc possible d'utiliser l'IL-15-Fc afin de détecter la présence de l'IL-15R $\alpha$  à la surface des cellules (Figure 5, p.73). L'utilisation d'une telle protéine présente plusieurs avantages. Tout d'abord, puisque la protéine sera sécrétée par les cellules transfectées avec la construction, il sera possible d'utiliser directement leur surnageant afin de détecter l'IL-15-Fc. Dès lors, aucune purification de la protéine de fusion ne sera nécessaire. De plus, si nous voulons obtenir de l'IL-15-Fc purifié, la portion Fc de l'IgG humain facilitera la purification de la protéine de fusion. En effet, la purification d'IgG sur colonne d'affinité est une technique éprouvée, efficace et facilement réalisable. Il sera donc possible d'obtenir rapidement

et simplement une protéine de fusion purifiée ou non. Un autre avantage de la portion Fc de l'IgG humain est sa capacité de dimérisation. En effet, la présence de la portion Fc permet la dimérisation de la protéine de fusion. Le dimère ainsi formé permettra à plus d'anticorps de se lier à la protéine de fusion augmentant ainsi le signal perçu en cytofluorométrie. De plus, la dimérisation permet à la cytokine d'être plus avide pour son ligand.

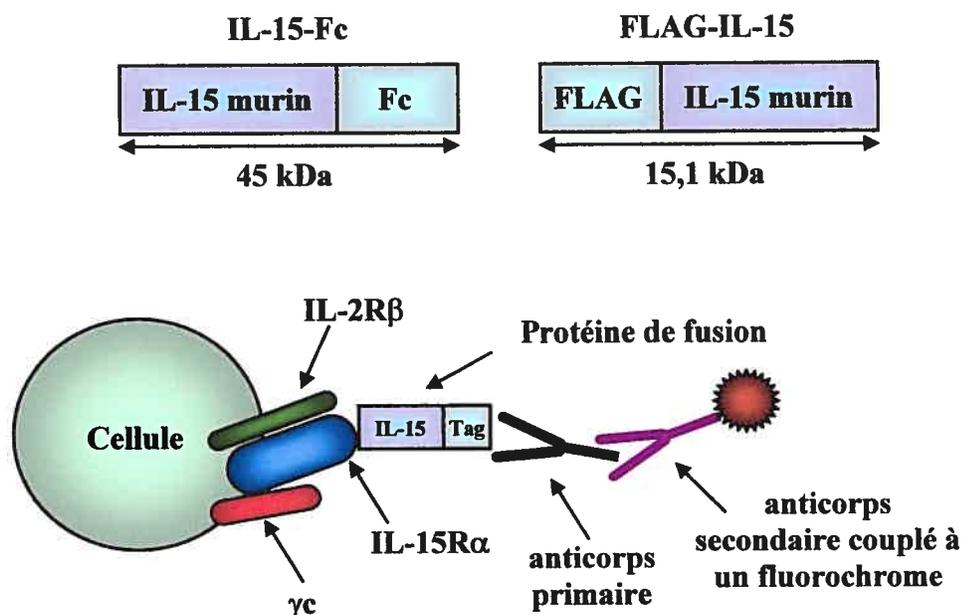


Figure 5 : Utilisation d'une protéine de fusion de l'IL-15 afin de détecter l'expression de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-15 par cytofluorométrie. Deux protéines de fusion ont été élaborées : l'IL-15-Fc et FLAG-IL-15. Pour l'IL-15-Fc l'anticorps primaire est le chèvre anti-IgG humain (Fc spécifique) couplé à la biotine et l'anticorps secondaire est la streptavidine couplée à un fluorochrome. Pour ce qui est de FLAG-IL-15, le premier anticorps est le souris anti-FLAG M<sub>2</sub> et le second anticorps est le rat anti-souris couplé à un fluorochrome.

La séquence complète de l'IL-15 (avec son propre peptide signal) a été obtenue à partir d'ARN de muscles d'une souris C57BL/6. Cette séquence a ensuite été introduite dans le vecteur CosFclink en respectant le cadre de lecture afin

d'obtenir une protéine de fusion IL-15-Fc. Le vecteur a été transfecté dans des cellules eucaryotes, soient les cellules Cos-7. En temps normal, l'IL-15-Fc produit par les cellules devrait être sécrétée dans le milieu de culture. Malheureusement, aucune protéine de fusion n'a été détectée dans le surnageant des cellules transfectées avec le vecteur CosFclink/IL-15 (Figure 6A, p.75). L'absence de production d'IL-15-Fc n'est pas due à un problème de transcription puisque l'ARN messager de l'IL-15 est détecté dans les cellules transfectées (Figure 6B, p.75). Le problème se trouve donc au niveau de la traduction ou de la sécrétion. Nous avons découvert ultérieurement que l'expression de l'IL-15 est hautement régulée. En effet, la transcription, la traduction et la sécrétion de l'IL-15 sont régulés par plusieurs mécanismes complexes (110). Entre autres, le peptide signal de cette cytokine est responsable d'une régulation négative post-transcriptionnelle qui inhibe sa traduction en protéine et il influence la sécrétion de la cytokine.

### **2.1.2 Clonage IL2/IL-15-Fc**

Le groupe de Tagaya et al a observé que le remplacement du peptide signal de l'IL-15 humain par celui de l'IL-2 humain permet d'augmenter significativement la production d'IL-15 dans le surnageant de cellules Cos-7 transfectées (111). Nous avons donc pensé faire la même expérience avec l'IL-15 murin. Tout d'abord, nous avons obtenu la séquence du peptide signal de l'IL-2 à partir d'ARN de thymus d'une souris C57BL/6 tandis que la séquence du peptide mature de l'IL-15 a été amplifiée à partir du plasmide CosFclink/IL-15. Nous avons ensuite combiné les deux séquences par PCR. Le produit de la PCR a ensuite été introduit dans le vecteur d'expression afin d'obtenir le plasmide CosFclink/IL-2/IL-15. Tout comme pour la

première construction, les cellules Cos-7 transfectées avec le plasmide CosFclink/IL-2/IL-15 ne sécrètent pas de protéine de fusion (Figure 6C, p.75). Il y a donc d'autres aspects de la régulation de la production de l'IL-15 qu'il faudra contourner.

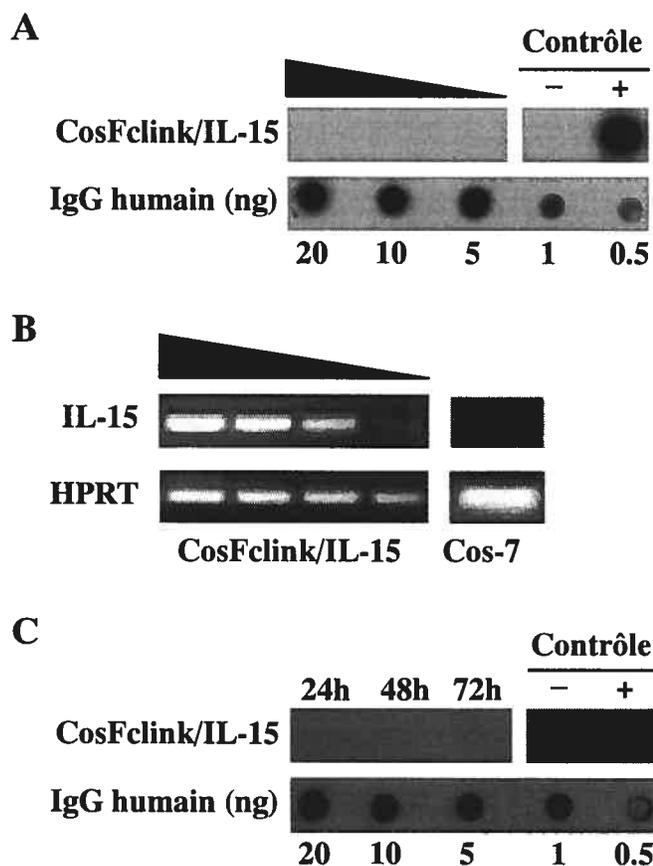


Figure 6 : Production de l'IL-15-Fc. (A) Production de la protéine de fusion avec CosFclink/IL-15. Des cellules Cos-7 ont été transfectées avec le plasmide CosFclink/IL-15 par précipitation au phosphate de calcium. La présence de IL-15-Fc dans le surnageant des cellules a été déterminée par dot blot 72h après la transfection. La protéine de fusion a été détectée à l'aide d'un anticorps anti-IgG humain (Fc spécifique). Différentes concentrations de surnageant ont été utilisées. (B) L'expression de l'ARN messager de l'IL-15 dans des cellules Cos-7 transfectées ou non avec CosFclink/IL-15 a été déterminé par PCR. Différentes dilutions de ADNc ont été utilisées. (C) Production de la protéine de fusion avec CosFclink/IL-2/IL-15. Même procédure qu'en A mais avec le vecteur CosFclink/IL-2/IL-15. La présence de IL-15-Fc dans le surnageant des cellules a été déterminée par dot blot 24h, 48, et 72h après la transfection.

## **2.2 Protéine de fusion FLAG-IL-15**

En raison des difficultés de production de l'IL-15-Fc dans les cellules eucaryotes, nous avons décidé de produire une autre protéine de fusion, soit la protéine FLAG-IL-15. Bien que le mode de détection de la FLAG-IL-15 soit le même (Figure 5, p.73), cette protéine ne présente pas tous les avantages de l'IL-15-Fc. Tout d'abord, la protéine est produite dans un système bactérien. Dès lors, les modifications post-traductionnelles que l'on retrouve normalement chez les eucaryotes n'auront pas lieu. De plus, la protéine de fusion ne sera pas sécrétée par les bactéries mais se retrouvera plutôt dans le cytoplasme. Afin d'obtenir la protéine de fusion, nous devons donc préparer un extrait cellulaire qui contiendra beaucoup de protéines. Cela implique que nous ne pourrons pas utiliser directement cet extrait bactérien afin de détecter la présence de l'IL-15R $\alpha$  à la surface des cellules. Il sera donc nécessaire de purifier FLAG-IL-15. Par contre, la portion FLAG de la protéine permet sa purification sur une colonne d'affinité ce qui facilitera le travail d'isolation. Contrairement à l'IL-15-Fc, la protéine FLAG-IL-15 ne pourra pas se dimériser. Dès lors, aucune amplification de signal ne sera observée en cytofluorométrie. L'avantage majeur de cette nouvelle construction est que la production dans un système bactérien nous permettra de contourner les contrôles de traduction et de sécrétion retrouvés chez les eucaryotes.

La séquence de l'IL-15 a été obtenue à partir du plasmide CosFclink/IL-15 et elle a ensuite été introduite dans le vecteur pFLAG-MAC. Ce vecteur permet d'induire la production de la protéine de fusion à l'aide de l'IPTG. Afin d'obtenir un

rendement optimal, nous avons mis au point le protocole de production de FLAG-IL-15. Tout d'abord, différentes souches de bactéries (DH $\alpha$ 5, BL21, HB101 et JM109) ont été transformées avec le vecteur d'expression. Plusieurs milieux de culture plus ou moins riches ont été utilisés. De plus, plusieurs concentrations d'IPTG ont été testées. En fin, deux autres aspects de la production ont été optimisés, la température et le temps d'induction. Une production optimale de FLAG-IL-15 a été obtenue lorsque des bactéries BL21 transformées avec le vecteur d'expression ont été cultivées en milieu Super Broth et lorsque l'induction de la protéine de fusion a été effectuée en présence d'IPTG (2,5mM) durant 4 heures à 30°C. Suite à l'induction, nous avons préparé un extrait cellulaire puis la présence de FLAG-IL-15 a été déterminée par Western Blot. L'utilisation d'un anticorps anti-FLAG a permis de détecter une bande à 15kDa qui correspond à la protéine de fusion (Figure 7, p.77).

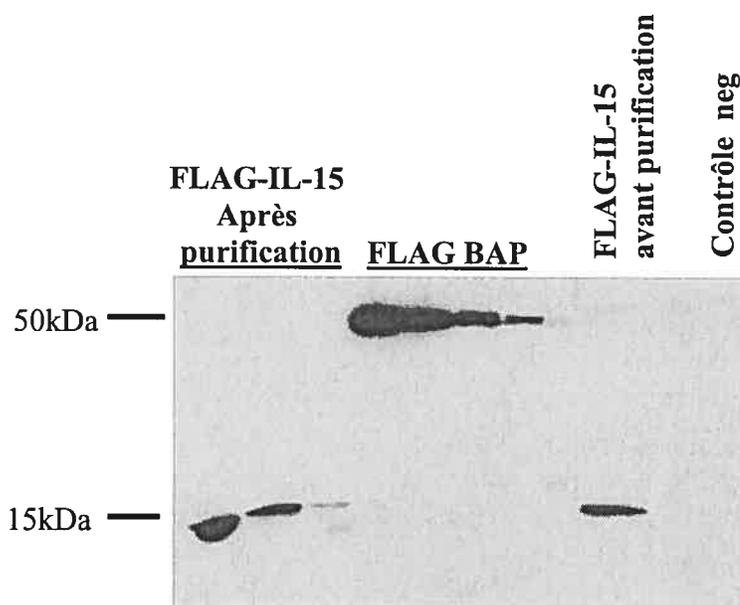


Figure 7 : Production de la protéine de fusion FLAG-IL-15. Des bactéries BL21 ont été transformées avec le plasmide pFLAG MAC/IL-15 (FLAG-IL-15, 15kDa) ou pFLAG MAC (contrôle négatif) puis mises en culture à 37°C dans du milieu Super Broth supplémenté

avec 0,4% glucose et 50ug/mL ampicilline jusqu'à une DO d'environ 0,8. De l'IPTG (2,5mM) a ensuite été ajouté pour une induction de 4h à 30°C. Un extrait cellulaire a ensuite été préparé puis purifié sur colonne d'affinité anti-FLAG M<sub>2</sub>. Un Western Blot avec un anticorps anti-FLAG a été réalisé avec des aliquots de FLAG-IL-15 avant et après purification. Contrôle positif: aliquots de protéine FLAG-BAP (49kDa). Contrôle négatif: extrait cellulaire du plasmide ctrl pFLAG MAC.

Un Western blot effectué avec un anticorps anti-IL-15 a donné le même résultat : la protéine de fusion est produite suite à l'induction par l'IPTG. L'extrait cellulaire a ensuite été purifié à l'aide d'une colonne d'affinité anti-FLAG M<sub>2</sub>. Comme le démontre la figure 7 (p.77), la protéine de fusion est toujours présente dans l'échantillon après la purification sur colonne. Ensuite, nous avons voulu évaluer la pureté de l'échantillon recueilli après la purification grâce à une coloration au Sypro Ruby (Figure 8, p.79). Bien que la purification sur colonne ait permis d'éliminer la majorité des contaminants, des protéines de haut poids moléculaire sont encore présentes dans l'échantillon. D'autres étapes de purification s'avéreront nécessaires afin d'obtenir la protéine FLAG-IL-15 purifiée. Une fois que nous l'aurons obtenue, nous devons tester son activité biologique. Pour ce faire, nous comparerons sa capacité d'induire la prolifération des lymphocytes T mémoires *in vitro* avec celle de l'IL-15 recombinante.

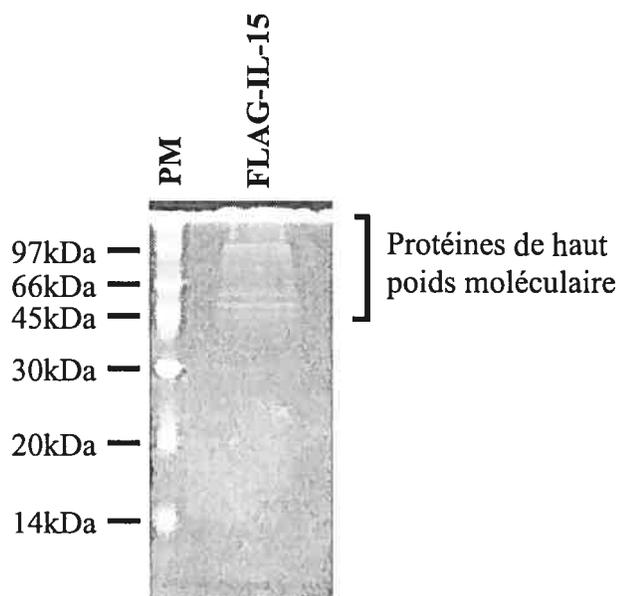


Figure 8 : Pureté de la protéine de fusion FLAG-IL-15. Des bactéries BL21 ont été transformées avec le plasmide pFLAG MAC/IL-15 (FLAG-IL-15, 15kDa) puis mises en culture à 37°C dans du milieu Super Broth supplémenté avec 0,4% glucose et 50ug/mL ampicilline jusqu'à une DO d'environ 0,8. De l'IPTG (2,5mM) a ensuite été ajouté pour une induction de 4h à 30°C. Un extrait cellulaire a ensuite été préparé puis purifié sur colonne d'affinité anti-FLAG M<sub>2</sub>. Un gel de polyacrylamide a été réalisé avec un aliquot de FLAG-IL-15 après purification. Le gel a ensuite été coloré au Sypro Ruby. PM : marqueur de poids moléculaire.

# **Chapitre 4**

## **Discussion**

Plusieurs aspects de la réponse immunitaire sont régulés par les cytokines. Entre autres, l'apoptose des lymphocytes T effecteurs durant la phase de contraction est en parti attribuable à l'IL-2 tandis que l'IL-7 est impliqué dans la formation des lymphocytes T mémoires. De plus, l'IL-15 est un facteur de survie des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup>. En considérant l'importance de ces cytokines dans la réponse immunitaire, nous croyons que le niveau d'expression de leurs récepteurs détermine l'avenir des lymphocytes T effecteurs. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé le patron d'expression des récepteurs de l'IL-2, IL-7 et l'IL-15 durant la phase de contraction. Nous avons observé une modulation de l'expression de l'IL-2R $\beta$  et de l'IL-7R $\alpha$  à la surface des lymphocytes T effecteurs durant la réponse antigénique. De plus, nos résultats démontrent que l'expression de l'IL-2R $\beta$  et de l'IL-7R $\alpha$  est plus élevée sur les effecteurs apoptotiques que sur les effecteurs non apoptotiques. Nous avons aussi observé une modulation de l'expression de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  durant la réponse immunitaire. Nos résultats suggèrent que l'expression de ces récepteurs joue un rôle dans le destin des lymphocytes T effecteurs.

## **1. EXPRESSION DES RÉCEPTEURS DE CYTOKINE**

### **1.1 Modèle d'étude de la mémoire immunologique**

L'étude de la mémoire immunologique nécessite un modèle animal tel que la souris dont le système immunitaire se rapproche de celui de l'être humain. Nous avons donc élaboré un modèle de transfert adoptif afin de pouvoir étudier le développement des lymphocytes T mémoires dans un contexte *in vivo*. Ce modèle consiste à transférer des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> RCT transgéniques dans des souris naïves non irradiées. Les souris receveuses sont ensuite immunisées avec le peptide spécifique afin d'initier la réponse immunitaire. Les souris 2C ont été utilisées comme source de lymphocytes T naïfs CD8<sup>+</sup> RCT transgéniques. L'avantage de l'utilisation des lymphocytes T 2C réside dans le fait qu'ils sont facilement détectables à l'aide de l'anticorps 1B2 spécifique au RCT de ces cellules. De plus, les souris receveuses ne possèdent pas de lymphocytes T ayant le RCT 2C. Ainsi, il est facile d'identifier la population de lymphocytes T 2C dans les souris receveuses et de la suivre tout au long de la réponse antigénique. Dans notre modèle, les souris receveuses ne sont pas irradiées. En effet, l'irradiation provoquerait la perte de la population lymphocytaire des souris receveuses et nous voulons effectuer nos expériences dans un contexte le plus proche possible de la réalité. De plus, il a été démontré que les lymphocytes T naïfs transférés dans des souris lymphopéniques acquièrent un phénotype de lymphocytes T mémoires en réponse aux signaux homéostatiques (112-114). Entre autres, le groupe de Cho et al a observé que trois semaines après le transfert, les lymphocytes T naïfs expriment de haut niveau de

CD44, de Ly-6C et d'IL-2R $\beta$  et produisent rapidement de l'IFN $\gamma$  lorsque restimulés *in vitro* avec un anti-CD3, tout comme les lymphocytes T mémoires (112). De plus, les auteurs ont observé que la transition des lymphocytes T naïfs vers un phénotype mémoire se fait graduellement sans passer par un stade d'effecteur. En tenant compte de ces observations, nous ne pouvons pas utiliser des souris irradiées dans notre modèle. En effet, il nous serait impossible de différencier les lymphocytes T mémoires produits suite à la réponse antigénique et ceux résultants de la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs. Le peptide antigénique seul n'est pas suffisant pour induire une réponse immunitaire. Nous devons donc provoquer une réponse inflammatoire afin d'obtenir une activation efficace des lymphocytes T 2C. En effet, bien que le peptide seul peut être présenté à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APCs), la présence de molécules inflammatoires est nécessaire afin d'obtenir une costimulation efficace. Nous avons donc choisi d'émulsifier le peptide antigénique dans l'adjuvant de Freund complet (AFC) afin d'initier la réponse immunitaire. Cet adjuvant est très efficace puisqu'il contient, entre autres, des bactéries mortes qui activent le système immunitaire inné.

Des études récentes ont démontré que les lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> produits en absence d'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (aide CD4) ne sont pas fonctionnels. En effet, le groupe de Sun et Bevan a démontré que les lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> générés chez des souris déficientes en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont incapables de monter une réponse immunitaire suite à une deuxième rencontre avec l'antigène (115). Des résultats similaires ont été obtenus par les groupes de Bourgeois et al, Janssen et al et de Shedlock et Shen (116-118). De plus, le groupe de Bourgeois

et al a démontré que ce ne sont pas tous les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui peuvent fournir de l'aide aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mais seulement ceux spécifiques au même antigène. Ce groupe a aussi démontré que, pour qu'il y ait aide CD4, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> devaient reconnaître l'antigène sur la même cellule présentatrice d'antigène. Hors, dans notre modèle, les lymphocytes T 2C ne reçoivent aucune aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, nous immunisons les souris receveuses avec une émulsion d'AFC contenant le peptide SYRGL qui est spécifique au RCT 2C seulement et qui ne peut pas se lier au CMH de classe II reconnu par le RCT des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Dès lors, les seuls lymphocytes T à être activés sont les lymphocytes T 2C et aucune aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne leur est fournie. Nous devons donc nous assurer que notre protocole génère une population de lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> fonctionnels même en l'absence d'aide des cellules T CD4<sup>+</sup>. Non seulement notre protocole permet de produire des lymphocytes T mémoires, il permet également la génération de lymphocytes T mémoires fonctionnels. En effet, les lymphocytes T mémoires 2C retrouvés un et trois mois après l'immunisation produisent rapidement de l'IFN $\gamma$  lorsque restimulés *in vitro* avec l'antigène pour lequel ils sont spécifiques (Chapitre 2, article figure 1C, p.60 et données non présentées). Cependant, nous n'avons pas déterminé si les lymphocytes T mémoires que nous détectons sont capables de répondre lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène. Nous devons donc démontrer que les lymphocytes T mémoires produits à l'aide de notre protocole peuvent monter une réponse secondaire afin de confirmer qu'ils sont fonctionnels autant *in vitro* que *in vivo*. Pour ce faire, il suffit d'immuniser

les souris receveuses une seconde fois avec l'émulsion contenant le peptide SYRGL et de vérifier que les lymphocytes T mémoires répondent à l'antigène.

Nos observations remettent en question la nécessité de l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la génération des lymphocytes T mémoires CD8<sup>+</sup> fonctionnels. Il est possible que, dans notre modèle, l'aide CD4 soit remplacée par les signaux fournis par l'AFC. Cependant, d'autres expériences devront être réalisées afin de confirmer cette hypothèse. Par exemple, la qualité des lymphocytes T mémoires 2C produits avec notre protocole devra être comparée à celle de lymphocytes T mémoires 2C produits en présence d'aide CD4. Afin de fournir de l'aide CD4 aux lymphocytes T 2C, nous avons pensé immuniser des souris receveuses femelles avec des cellules dendritiques de souris mâles pulsées avec le peptide SYRGL. Les cellules des souris mâles présentent à leur surface un antigène appelé HY qui est reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> des souris femelles. Ainsi, les cellules dendritiques présenteront simultanément l'antigène SYRGL spécifique aux lymphocytes T 2C et l'antigène HY spécifique aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Avec ce nouveau protocole, nous pourrions comparer les lymphocytes T mémoires générés avec l'adjuvant de Freund complet avec ceux produits avec l'aide CD4. Il se pourrait aussi que les bactéries présentes dans l'émulsion d'AFC activent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui vont par la suite fournir de l'aide aux lymphocytes T 2C. Afin de vérifier cette possibilité, nous pourrions comparer la qualité des lymphocytes T mémoires produits avec une émulsion d'adjuvant de Freund incomplet (AFI) avec ceux produits avec une émulsion d'AFC. Contrairement au AFC, l'adjuvant incomplet ne contient pas de bactéries. Nous pourrions donc déterminer le rôle des bactéries de l'AFC dans la formation de lymphocytes T mémoires.

## **1.2 Expression de l'IL-2R $\beta$ et de l'IL-7R $\alpha$ durant la phase de contraction**

Nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes T effecteurs qui survivront à la phase de contraction devront avoir diminué l'expression de l'IL-2R $\alpha$  à leur surface tout en augmentant l'expression de l'IL-2R $\beta$ , l'IL-7R $\alpha$  et l'IL-15R $\alpha$ . Si notre hypothèse s'avère exacte, nous devrions observer deux populations de lymphocytes T effecteurs durant la phase de contraction: une population présentant le phénotype d'intérêt et l'autre non. De plus, nous devrions observer un enrichissement des lymphocytes T effecteurs du phénotype d'intérêt tout au long de la phase de contraction. Bien que nous ayons constaté une modulation de l'expression de l'IL-2R $\beta$  et de l'IL-7R $\alpha$  à la surface des lymphocytes T effecteurs durant la réponse antigénique, nos observations ne correspondent pas tout à fait aux résultats attendus (Chapitre 2, article figure 2, p.61). En effet, nous observons un niveau élevé de l'IL-2R $\beta$  sur la majorité des lymphocytes T effecteurs durant la phase de contraction alors que nous nous attendions à retrouver deux populations, une qui exprime un haut niveau de récepteur et une qui exprime un niveau moins élevé de récepteur. De plus, bien que nous observions deux populations de lymphocytes T effecteurs qui expriment des niveaux différents de l'IL-7R $\alpha$ , aucun enrichissement d'une de ces populations n'est constaté. Cependant, ces résultats ne réfutent pas notre hypothèse. En effet, il se peut que le marquage de l'IL-2R $\beta$  ne soit pas assez sensible pour que l'on observe clairement deux populations. De plus, en considérant l'hypothèse de l'internalisation de l'IL-7R $\alpha$ , il se peut que l'expression de ce récepteur à la surface des lymphocytes T effecteurs ne soit pas constante entre les cellules d'une même

population. Dès lors, il est possible que ce phénomène masque l'enrichissement éventuel d'une population particulière de lymphocytes T effecteurs. Toutefois, il est impossible d'écarter la possibilité que notre hypothèse soit erronée. En effet, l'absence des deux populations de lymphocytes T effecteurs attendues pourrait tout simplement indiquer que les récepteurs de cytokines étudiés ne jouent pas de rôle dans la formation des lymphocytes T mémoires. Dès lors, d'autres facteurs que l'expression des récepteurs de cytokines pourraient être impliqués la production des lymphocytes T mémoires, tel que l'accessibilité aux cytokines et facteurs de croissance.

Suite à ces observations, nous avons décidé d'aborder le problème sous un autre angle. Nous avons donc déterminé l'expression de ces deux récepteurs à la surface des lymphocytes T effecteurs qui survivent à la phase de contraction pour devenir des lymphocytes T mémoires (non apoptotiques) et sur ceux qui meurent durant cette phase (apoptotiques). Si notre hypothèse s'avère exacte, nous devrions constater une différence d'expression de l'IL-2R $\beta$  et l'IL-7R $\alpha$  entre ces deux populations de lymphocytes T effecteurs. Nous avons en effet observé que les lymphocytes T effecteurs apoptotiques expriment plus de ces deux récepteurs à leur surface que les autres cellules effectrices (Chapitre 2, article figure 3, p.62). Dès lors, il existe bien une différence d'expression de l'IL-2R $\beta$  et l'IL-7R $\alpha$  entre les lymphocytes T effecteurs qui deviennent des lymphocytes T mémoires et ceux qui ne survivent pas. Cependant, ces observations ne correspondent pas aux résultats attendus. En effet, nous nous attendions à observer une expression plus élevée de ces deux récepteurs à la surface des lymphocytes T non apoptotiques que sur les cellules

apoptotiques et non l'inverse. Néanmoins, ces résultats ne réfutent pas notre hypothèse. La disparité d'expression de l'IL-7R $\alpha$  entre les deux populations de lymphocytes T effecteurs peut être expliquée à l'aide de l'hypothèse de l'internalisation du récepteur. En effet, il se pourrait que les lymphocytes T effecteurs qui deviendront des lymphocytes T mémoires aient reçu des signaux transmis par l'IL-7 via l'internalisation de son récepteur, ce qui rendrait la détection de l'IL-7R $\alpha$  avec notre anticorps plus difficile. Cela expliquerait le plus faible niveau d'expression de l'IL-7R $\alpha$  observé à la surface des lymphocytes T effecteurs non apoptotiques comparé aux effecteurs apoptotiques. Nous croyons que les lymphocytes T effecteurs non apoptotiques expriment moins d'IL-2R $\beta$  à leur surface à cause de son interaction avec l'IL-15. En effet, une baisse de l'expression de cette chaîne pourrait refléter une internalisation du récepteur suite à la liaison de l'IL-15. De plus, il se peut que la liaison de l'IL-7 et l'IL-15 à leur récepteur respectif empêche la liaison des anticorps anti-IL-2R $\beta$  et anti-IL-7R $\alpha$ . Dès lors, nous croyons que la baisse d'expression des deux récepteurs à la surface des lymphocytes T effecteurs non apoptotiques indique que ces cellules ont reçu les signaux de différenciation en lymphocytes T mémoires fournis par l'IL-7 et les signaux de survie transmis par l'IL-15. Il se pourrait que la disparité dans l'expression de ces récepteurs soit à l'origine de la destinée des lymphocytes T effecteurs. Toutefois, plusieurs expériences doivent encore être effectuées afin de déterminer le rôle exact de l'expression de ces deux récepteurs dans la production des lymphocytes T mémoires. Tout d'abord, afin de confirmer que la diminution d'expression des récepteurs de cytokines observée est due à leur internalisation ou à l'interaction des cytokines avec leurs récepteurs, nous pourrions

mettre des lymphocytes T en culture avec les cytokines IL-7 et IL-15. Ainsi, nous pourrions déterminer l'effet de la liaison de ces cytokines sur la détection de leurs récepteurs respectifs. De plus, nous n'avons pas déterminé simultanément l'expression de l'IL-2R $\beta$  et de l'IL-7R $\alpha$  sur les lymphocytes T effecteurs. En effet, l'expression de ces récepteurs a été déterminée à l'aide de marquages indépendants. Il serait donc intéressant de déterminer l'expression de ces deux récepteurs simultanément sur les même cellules afin de confirmer que les lymphocytes T effecteurs qui survivent à la phase de contraction expriment conjointement, à leur surface, les récepteurs l'IL-2R $\beta$  et l'IL-7R $\alpha$  à un niveau moindre que les effecteurs apoptotiques. Ensuite, afin de confirmer l'existence d'une corrélation entre le phénotype des lymphocytes T effecteurs et la formation des lymphocytes T mémoires, nous pourrions effectuer un transfert adoptif de lymphocytes T effecteurs ayant le phénotype voulu ou non dans des souris naïves et suivre la production de lymphocytes T mémoires subséquentes. S'il existe bien une corrélation, nous devrions observé la formation de lymphocytes T mémoires seulement lorsque les lymphocytes T effecteurs du phénotype d'intérêt sont transférés.

### **1.3 Expression de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$ durant la réponse immunitaire**

Comme il a été mentionné précédemment, il n'existe aucun anticorps pour détecter l'expression de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-15 à la surface des cellules. De plus, nous avons été incapables de produire une protéine de fusion de

l'IL-15 afin de suivre l'expression de l'IL-15R. Nous avons donc dû nous contenter de déterminer l'expression de l'IL-15R $\alpha$  au niveau de l'ARNm dans les lymphocytes T effecteurs. L'inconvénient de cette technique est qu'il nous sera impossible de distinguer deux populations de lymphocytes T effecteurs qui expriment des niveaux différents de ce récepteur. En effet, les résultats obtenus par cette technique vont représenter l'expression moyenne de tous les lymphocytes T effecteurs présents dans l'échantillon. Cependant, nous pouvons contourner ce problème en triant les lymphocytes T effecteurs apoptotiques et les non apoptotiques. Nous pourrions ainsi déterminer le niveau d'expression de l'ARNm dans les lymphocytes T effecteurs qui deviendront des cellules mémoires et ceux qui mourront durant la phase de contraction. Dans le cas présent, nous avons détecté le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  sur la totalité des lymphocytes T effecteurs seulement. Nous avons observé un niveau élevé d'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  au début de la phase de contraction (Chapitre 2, article figure 4, p.63). Le niveau d'expression d'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  reste plus ou moins stable du jour 5 au jour 10 post-immunisation puis chute au jour 14. Le niveau d'expression augmente à nouveau vers la fin de la phase de contraction, soit au jour 20. Nous nous attendions à ce que les lymphocytes T effecteurs qui ne se différencient pas en lymphocytes T mémoires perdent l'expression de l'IL-15R $\alpha$  au cours de la phase de contraction tandis que ceux qui survivent à cette phase gardent une expression élevée de ce récepteur. Au début de la phase de contraction, la population de lymphocytes T effecteurs ne survivant pas à la phase de contraction est plus importante que l'autre population. Par contre, au cours de la phase de contraction, il devrait y avoir un enrichissement de la population

exprimant un niveau élevé de l'IL-15R $\alpha$ . Nous devrions donc observer une augmentation de l'expression moyenne de ce récepteur au cours du temps. Nos observations ne concordent pas avec les résultats obtenus. En effet, le niveau d'expression de l'ARNm n'augmente pas au cours de la phase de contraction. Dès lors, il ne semble pas y avoir enrichissement d'une population de lymphocytes T effecteurs exprimant de haut niveau de l'IL-15R $\alpha$ . Suite à ces observations, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que le patron d'expression de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  soit uniforme entre tous les lymphocytes T effecteurs. Cependant, le niveau d'expression de l'ARNm ne reflète pas toujours le niveau d'expression d'une molécule à la surface des cellules. Il est donc important de produire un outil afin de détecter l'expression de surface de l'IL-15R $\alpha$  et de pouvoir déterminer si oui ou non il y a bel et bien deux populations de lymphocytes T effecteurs exprimant des niveaux différents de récepteurs. De plus, cela nous permettrait d'étudier l'expression de l'IL-15R $\alpha$  sur les effecteurs apoptotiques et les non apoptotiques en combinaison avec l'IL-2R $\beta$  et l'IL-7R $\alpha$ . À l'aide d'un tel réactif, nous nous attendons à observer un niveau d'expression élevée de l'IL-15R $\alpha$  à la surface des lymphocytes T effecteurs CD8<sup>+</sup> qui survivront à la phase de contraction pour devenir des lymphocytes T mémoires. Le niveau d'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  a été déterminé par la technique de PCR semi-quantitatif. La quantification de l'ARNm par cette technique est plus ou moins précise. Nous devrions refaire l'expérience en utilisant la technique de Real Time PCR afin de quantifier l'expression de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  de façon plus exacte. En effet, le Real Time PCR est un procédé qui donne des résultats plus précis et fiables que le PCR semi-quantitatif. De plus, nous pourrions comparer l'expression

de l'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  entre différentes populations de lymphocytes T effecteurs. Les lymphocytes T effecteurs pourraient être triés en fonction de leur niveau d'apoptose ou en fonction de l'expression de l'IL-2R $\beta$  et l'IL-7R $\alpha$ . Nous pourrions ainsi déterminer le patron d'expression de l'ARNm de ce récepteur dans les lymphocytes T effecteurs apoptotiques ou non et sur les lymphocytes T effecteurs exprimant un haut niveau ou un bas niveau d'IL-2R $\beta$  et d'IL-7R $\alpha$ . Ces expériences permettront d'éclaircir le rôle de l'IL-15R $\alpha$  dans le destin des lymphocytes T effecteurs durant la phase de contraction.

## **2. PROTÉINES DE FUSION DE L'IL-15**

### **2.1 IL-15-Fc**

Afin de pouvoir détecter l'IL-15R $\alpha$  à la surface des lymphocytes T effecteurs, nous voulions produire une protéine de fusion IL-15-Fc. Nous avons tout d'abord utilisé la séquence codante complète de l'IL-15 afin de construire un vecteur d'expression permettant la production de notre protéine de fusion dans un système eucaryote. Cette première stratégie de clonage s'est avérée infructueuse. Ensuite, nous avons remplacé le peptide signal de IL-15 par celui de l'IL-2 afin de contourner un aspect de la régulation traductionnel de l'IL-15. Même avec cette nouvelle construction, nous n'avons pas pu produire la protéine de fusion. La régulation de l'expression de l'IL-15 se fait à plusieurs niveaux (110). En effet, la traduction de cette cytokine est régulée par trois éléments : une région 5'UTR contenant plusieurs codons start (AUGs), un peptide signal particulier et un régulateur négatif présent dans la partie C-terminal du précurseur. De plus, la sécrétion de l'IL-15 est aussi régulée, entre autres, par le peptide signal. Un tel niveau de régulation n'a été observé pour aucune autre cytokine jusqu'à maintenant. Bien que nous ayons remplacé le peptide signal de l'IL-15, cela n'a pas été suffisant pour permettre la production de la protéine de fusion. Il se pourrait que d'autres éléments de la régulation de cette cytokine empêchent la sécrétion de notre protéine de fusion par les cellules transfectées. De plus, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que l'ajout de la portion Fc à la partie C-terminal de l'IL-15 soit à l'origine de l'absence de

production. En effet, la portion Fc de l'IgG humain fait 30kDa ce qui équivaut à 2 fois la taille de l'IL-15 qui fait 15kDa. Il se pourrait donc que la protéine de fusion ne puisse pas se replier adéquatement, ce qui entraînerait sa dégradation par la cellule. Toutefois, d'autres protéines de fusion Fc ont été produites avec des cytokines de même taille (119)(Ostiguy, V. et Labrecque N., manuscrit en préparation). Entre autres, une protéine de fusion IL-21-Fc a été produite dans notre laboratoire avec le plasmide CosFclink (Ostiguy, V. et Labrecque N., manuscrit en préparation). Il est donc surprenant que nous n'arrivions pas à produire une protéine IL-15-Fc. Néanmoins, l'hypothèse d'un mauvais repliement de la protéine de fusion reste plausible. Puisque nous avons réussi à produire une protéine de fusion de l'IL-21 en utilisant son propre peptide signal, nous pourrions remplacer le peptide signal de l'IL-15 par celui de l'IL-21. Nous pourrions aussi changer l'orientation de la protéine de fusion en d'ajoutant la portion Fc à la partie N-terminale de l'IL-15 mature plutôt qu'à la partie C-terminale. Nous avons décidé d'exprimer la portion Fc à l'extrémité C-terminale en premier lieu car il y avait un précédent. En effet, le groupe de Kim et al a élaboré une protéine de fusion IL-15 mutant/Fc $\gamma$ 2a en fusionnant la partie FC à l'extrémité C-terminale (121). Nous voulions donc essayer de produire une protéine de fusion semblable à la leur. Peut-être arriverons-nous ainsi à produire une protéine de fusion IL-15-Fc.

## **2.2 FLAG-IL15**

Afin de contourner les mécanismes de régulation de l'expression de l'IL-15, nous avons décidé de produire une protéine de fusion FLAG-IL-15 dans un système bactérien. De plus, la portion FLAG de la protéine de fusion ne contient que 8 acides aminés ce qui ne devraient pas interférer avec le repliement de l'IL-15. Bien que nous ayons réussi à produire cette protéine (figure 7, p.77), nous avons été incapables de la purifier. En effet, la protéine est produite dans le cytoplasme des bactéries et afin de la récupérer, nous avons dû préparer un extrait cellulaire qui contenait énormément de protéines bactériennes. Pour purifier la protéine de fusion, nous avons passé l'échantillon sur une colonne d'affinité anti-FLAG. Bien que nous ayons éliminé la plupart des protéines bactériennes, la protéine de fusion recueillie à la fin de la procédure n'est pas pure. Nous devons donc envisager d'ajouter des étapes de purification supplémentaires afin d'obtenir une protéine de fusion purifiée. Suite à la colonne d'affinité, il reste dans l'échantillon des protéines de poids moléculaire beaucoup plus élevés que celui de FLAG-IL-15. Il serait donc judicieux, dans un premier temps, de purifier l'extrait cellulaire par chromatographie par exclusion ou par tamis moléculaire. Ce type de purification permet de séparer les protéines selon leur taille et leur forme. Nous pourrions ainsi éliminer les protéines de hauts poids moléculaires et ne passer sur colonne d'affinité que les fractions contenant la protéine de fusion. Nous pourrions ensuite utiliser FLAG-IL-15 purifié afin de détecter l'IL-15R $\alpha$  à la surface des lymphocytes T effecteurs. Toutefois, nous n'obtenons pas une grande quantité de protéine de fusion suite à l'induction IPTG. Dès lors, plusieurs étapes de purification vont diminuer considérablement la quantité de protéine de fusion purifiée que nous allons obtenir à la fin de la procédure. Nous pourrions aussi

essayer d'utiliser la protéine de fusion non purifiée en cytofluorométrie. Cependant, la présence de protéines bactériennes pourrait affecter les cellules de l'échantillon et interférer avec le marquage. Il serait donc préférable de purifier la protéine avant d'effectuer les marquages.

Bien que nous n'ayons pas encore réussi à produire une protéine de fusion de l'IL-15, d'autres groupes ont réussi là où nous avons échoué. En effet, le groupe de Kim et al a élaboré une protéine de fusion IL-15 mutant/Fc $\gamma$ 2a tandis que le groupe de Chae et al a produit une protéine de fusion FLAG-HMK-IL-15 (120,121). Cependant, il y a plusieurs différences entre les protéines de ces deux groupes et celles que nous voulions produire. Tout d'abord, ces deux protéines de fusion sont constituées de l'IL-15 humaine alors que nous voulions produire une protéine de fusion avec l'IL-15 murine. Ensuite, la protéine IL-15 mutant/Fc $\gamma$ 2a comporte deux mutations dans la séquence de l'IL-15 alors que nous voulions une protéine non mutée. Pour sa part, la protéine de fusion FLAG-HMK-IL-15 comporte une séquence peptidique reconnue par la HMK (heart muscle kinase) en plus de l'IL-15 humaine et l'étiquette FLAG. Il est très important que nous réussissions à obtenir une protéine de fusion de l'IL-15 car cet outil de détection de l'IL-15R $\alpha$  est primordial à l'avancement de nos travaux. Nous pourrions essayer de produire une protéine de fusion avec une étiquette autre que Fc et FLAG, comme l'étiquette His par exemple. Ce qui est sûr, c'est que nous devons changer de stratégie de clonage afin d'obtenir une protéine de fusion de l'IL-15.

### 3. CONCLUSION

Nous avons pu établir le patron d'expression des récepteurs de l'IL-2, de l'IL-7 et l'IL-15 sur les lymphocytes T effecteurs au cours de la réponse immunitaire. Comme nous l'avions suggéré, il semble y avoir une différence d'expression de ces récepteurs entre les lymphocytes T effecteurs qui survivent à la phase de contraction pour devenir des lymphocytes T mémoires et ceux qui disparaissent durant cette phase de la réponse antigénique. Cette différence d'expression a pour conséquence que les deux populations de cellules effectrices reçoivent des signaux différents durant la phase de contraction. Ces signaux peuvent faire la différence en une mort par apoptose et la différenciation en lymphocytes T mémoires. Une question reste en suspend : Qu'est ce qui détermine le niveau d'expression de ces récepteurs ? Leur expression pourrait être régulée par plusieurs facteurs : la force du signal transmis aux lymphocytes T par leur RCT, l'accessibilité aux cytokines et facteurs de croissances, etc. Comme il a été mentionné précédemment, certains aspects de la réponse immunitaire semblent programmés lors de la reconnaissance antigénique. Il est possible que l'expression des récepteurs de ces cytokines soit un autre aspect de la réponse qui soit programmé dès l'activation. Bien qu'il reste encore plusieurs expériences à réaliser afin de mieux définir le rôle des cytokines dans le destin des lymphocytes T effecteurs, cette étude permet de mettre en lumière un nouvel aspect de la régulation de la réponse immunitaire. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la formation des lymphocytes T mémoires nous permettra d'élaborer des techniques de vaccination plus efficaces.

## RÉFÉRENCES

- 1 Dubey, C., Croft, M., and Swain, S. L. 1995. Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol* 155:45-57.
- 2 Guo, Y., Wu, Y., Shinde, S., Sy, M. S., Aruffo, A., and Liu, Y. 1996. Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *J Exp Med* 184:955-61.
- 3 Kennedy, M. K., Mohler, K. M., Shanebeck, K. D., Baum, P. R., Picha, K. S., Otten-Evans, C. A., Janeway, C. A., Jr., and Grabstein, K. H. 1994. Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand. *Eur J Immunol* 24:116-23.
- 4 Liu, Y., Jones, B., Brady, W., Janeway, C. A., Jr., Linsley, P. S., and Linley, P. S. 1992. Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur J Immunol* 22:2855-9.
- 5 Liu, Y., Jones, B., Aruffo, A., Sullivan, K. M., Linsley, P. S., and Janeway, C. A., Jr. 1992. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 175:437-45.
- 6 Liu, Y. and Janeway, C. A., Jr. 1992. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3845-9.
- 7 Schwartz, J. C., Zhang, X., Nathenson, S. G., and Almo, S. C. 2002. Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol* 3:427-34.

- 8 Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-58.
- 9 Greenwald, R. J., Boussiotis, V. A., Liorbach, R. B., Abbas, A. K., and Sharpe, A. H. 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14:145-55.
- 10 Ahmed, R. and Gray, D. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
- 11 Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L. 1998. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16:201-23.
- 12 Sprent, J. and Surh, C. D. 2001. Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* 13:248-54.
- 13 Whitmire, J. K. and Ahmed, R. 2000. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* 12:448-55.
- 14 Zinkernagel, R. M., Bachmann, M. F., Kundig, T. M., Oehen, S., Pirchet, H., and Hengartner, H. 1996. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14:333-67.
- 15 Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A., and Kopf, M. 1999. Distinct kinetics of cytokine production and cytotoxicity in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* 29:291-9.
- 16 Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N., and Chen, J. 1999. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2976-81.

- 17 Garcia, S., DiSanto, J., and Stockinger, B. 1999. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* 11:163-71.
- 18 Iezzi, G., Scheidegger, D., and Lanzavecchia, A. 2001. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 193:987-93.
- 19 Kedl, R. M. and Mescher, M. F. 1998. Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 161:674-83.
- 20 Rogers, P. R., Dubey, C., and Swain, S. L. 2000. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 164:2338-46.
- 21 Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. 2000. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol* 1:47-53.
- 22 Zimmermann, C., Prevost-Blondel, A., Blaser, C., and Pircher, H. 1999. Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur J Immunol* 29:284-90.
- 23 Jameson, S. C. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2:547-56.
- 24 Tough, D. F. and Sprent, J. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 179:1127-35.

- 25 Liu, Y., Wenger, R. H., Zhao, M., and Nielsen, P. J. 1997. Distinct costimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185:251-62.
- 26 Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M. A., Hieshima, K., Springer, T. A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., and von Andrian, U. H. 2001. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 108:871-8.
- 27 Hu, H., Huston, G., Duso, D., Lepak, N., Roman, E., and Swain, S. L. 2001. CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nat Immunol* 2:705-10.
- 28 Kaech, S. M. and Ahmed, R. 2001. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2:415-22.
- 29 Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. 2002. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111:837-51.
- 30 Opferman, J. T., Ober, B. T., and Ashton-Rickardt, P. G. 1999. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* 283:1745-8.
- 31 Swain, S. L., Hu, H., and Huston, G. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286:1381-3.
- 32 van Stipdonk, M. J., Lemmens, E. E., and Schoenberger, S. P. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2:423-9.

- 33 Badovinac, V. P., Porter, B. B., and Harty, J. T. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3:619-26.
- 34 Bazan, J. F. 1990. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11:350-4.
- 35 Davies, D. R. and Wlodawer, A. 1995. Cytokines and their receptor complexes. *Faseb J* 9:50-6.
- 36 Leonard, W. J., Shores, E. W., and Love, P. E. 1995. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev* 148:97-114.
- 37 Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D., and Sugamura, K. 2001. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167:1-5.
- 38 Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., and Sugamura, K. 1992. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257:379-82.
- 39 Kondo, M., Takeshita, T., Higuchi, M., Nakamura, M., Sudo, T., Nishikawa, S., and Sugamura, K. 1994. Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. *Science* 263:1453-4.
- 40 Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K., and Sugamura, K. 1993. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 262:1874-7.
- 41 Russell, S. M., Keegan, A. D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Friedmann, M. C., Miyajima, A., Puri, R. K., Paul, W. E., and et

- al. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 262:1880-3.
- 42 Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S. M., Ziegler, S. F., Tsang, M., Cao, X., and Leonard, W. J. 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 262:1877-80.
- 43 Kimura, Y., Takeshita, T., Kondo, M., Ishii, N., Nakamura, M., Van Snick, J., and Sugamura, K. 1995. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int Immunol* 7:115-20.
- 44 Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., and Anderson, D. 1994. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *Embo J* 13:2822-30.
- 45 Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Nakamura, M., and Takeshita, T. 1995. The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. *Adv Immunol* 59:225-77.
- 46 Lin, J. X., Migone, T. S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., John, S., 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* 2:331-9.
- 47 Bamford, R. N., Grant, A. J., Burton, J. D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A. 1994. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally

- designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4940-4.
- 48 Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., and et al. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264:965-8.
- 49 Waldmann, T. A. 1991. The interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 266:2681-4.
- 50 Uchiyama, T., Broder, S., and Waldmann, T. A. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J Immunol* 126:1393-7.
- 51 Depper, J. M., Leonard, W. J., Kronke, M., Noguchi, P. D., Cunningham, R. E., Waldmann, T. A., and Greene, W. C. 1984. Regulation of interleukin 2 receptor expression: effects of phorbol diester, phospholipase C, and reexposure to lectin or antigen. *J Immunol* 133:3054-61.
- 52 Waldmann, T. A., Goldman, C. K., Robb, R. J., Depper, J. M., Leonard, W. J., Sharrow, S. O., Bongiovanni, K. F., Korsmeyer, S. J., and Greene, W. C. 1984. Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells. *J Exp Med* 160:1450-66.
- 53 Loughnan, M. S. and Nossal, G. J. 1989. Interleukins 4 and 5 control expression of IL-2 receptor on murine B cells through independent induction of its two chains. *Nature* 340:76-9.

- 54 D'Souza, W. N., Schluns, K. S., Masopust, D., and Lefrancois, L. 2002. Essential role for IL-2 in the regulation of antiviral extralymphoid CD8 T cell responses. *J Immunol* 168:5566-72.
- 55 Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D. H., Pamer, E. G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. 2002. Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure. *J Immunol* 168:1198-203.
- 56 Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-9.
- 57 Tan, J. T., Ernst, B., Kieper, W. C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C. D. 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* 195:1523-32.
- 58 Ohtsuka, K., Iiai, T., Watanabe, H., Tanaka, T., Miyasaka, M., Sato, K., Asakura, H., and Abo, T. 1994. Similarities and differences between extrathymic T cells residing in mouse liver and intestine. *Cell Immunol* 153:52-66.
- 59 Nishikawa, K., Saito, S., Morii, T., Kato, Y., Narita, N., Ichijo, M., Ohashi, Y., Takeshita, T., and Sugamura, K. 1990. Differential expression of the interleukin 2 receptor beta (p75) chain on human peripheral blood natural killer subsets. *Int Immunol* 2:481-6.

- 60 Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., and Yoshida, H. 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9125-9.
- 61 Armitage, R. J., Ziegler, S. F., Beckmann, M. P., Idzerda, R. L., Park, L. S., and Fanslow, W. C. 1991. Expression of receptors for interleukin 4 and interleukin 7 on human T cells. *Adv Exp Med Biol* 292:121-30.
- 62 Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E. A. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195:1515-22.
- 63 Giri, J. G., Anderson, D. M., Kumaki, S., Park, L. S., Grabstein, K. H., and Cosman, D. 1995. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol* 57:763-6.
- 64 Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L. S., and Anderson, D. M. 1995. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *Embo J* 14:3654-63.
- 65 Schluns, K. S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X. X., and Lefrancois, L. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168:4827-31.
- 66 Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., and Hamuro, J. 1992. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. 1983. *Biotechnology* 24:304-9.

- 67 Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., and Gallo, R. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193:1007-8.
- 68 Gillis, S. and Smith, K. A. 1977. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268:154-6.
- 69 Kundig, T. M., Schorle, H., Bachmann, M. F., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M., and Horak, I. 1993. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* 262:1059-61.
- 70 Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S., and Schimpl, A. 1995. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 25:2572-7.
- 71 Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C., and Horak, I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75:253-61.
- 72 Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. 1995. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3:521-30.
- 73 Sadlack, B., Kuhn, R., Schorle, H., Rajewsky, K., Muller, W., and Horak, I. 1994. Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4. *Eur J Immunol* 24:281-4.
- 74 Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A., and Horak, I. 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352:621-4.
- 75 Suzuki, H., Kundig, T. M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J. J., Ohashi, P. S., Griesser, H., and et

- al. 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268:1472-6.
- 76 Wiles, M. V., Ruiz, P., and Imhof, B. A. 1992. Interleukin-7 expression during mouse thymus development. *Eur J Immunol* 22:1037-42.
- 77 Sakata, T., Iwagami, S., Tsuruta, Y., Teraoka, H., Tatsumi, Y., Kita, Y., Nishikawa, S., Takai, Y., and Fujiwara, H. 1990. Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. *J Leukoc Biol* 48:205-12.
- 78 Oosterwegel, M. A., Haks, M. C., Jeffry, U., Murray, R., and Kruisbeek, A. M. 1997. Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells. *Immunity* 6:351-60.
- 79 Madrigal-Estebas, L., McManus, R., Byrne, B., Lynch, S., Doherty, D. G., Kelleher, D., O'Donoghue, D. P., Feighery, C., and O'Farrelly, C. 1997. Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum Immunol* 58:83-90.
- 80 Heufler, C., Topar, G., Grasseger, A., Stanzl, U., Koch, F., Romani, N., Namen, A. E., and Schuler, G. 1993. Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J Exp Med* 178:1109-14.
- 81 Golden-Mason, L., Kelly, A. M., Traynor, O., McEntee, G., Kelly, J., Hegarty, J. E., and O'Farrelly, C. 2001. Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development. *Cytokine* 14:143-51.

- 82 de Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y. J., Lebecque, S., and Caux, C. 1998. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 160:1666-76.
- 83 Kroncke, R., Loppnow, H., Flad, H. D., and Gerdes, J. 1996. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction. *Eur J Immunol* 26:2541-4.
- 84 Sorg, R. V., McLellan, A. D., Hock, B. D., Fearnley, D. B., and Hart, D. N. 1998. Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology* 198:514-26.
- 85 Gutierrez-Ramos, J. C., Olsson, C., and Palacios, R. 1992. Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokine-mediated positive and negative regulation. *Exp Hematol* 20:986-90.
- 86 Benjamin, D., Sharma, V., Knobloch, T. J., Armitage, R. J., Dayton, M. A., and Goodwin, R. G. 1994. B cell IL-7. Human B cell lines constitutively secrete IL-7 and express IL-7 receptors. *J Immunol* 152:4749-57.
- 87 von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E., and Murray, R. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519-26.
- 88 Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., and et al. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955-60.

- 89 He, Y. W. and Malek, T. R. 1996. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* 184:289-93.
- 90 Maki, K., Sunaga, S., Komagata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J. I., and Ikuta, K. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7172-7.
- 91 Mertsching, E., Burdet, C., and Ceredig, R. 1995. IL-7 transgenic mice: analysis of the role of IL-7 in the differentiation of thymocytes in vivo and in vitro. *Int Immunol* 7:401-14.
- 92 Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426-32.
- 93 Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8732-7.
- 94 Vivien, L., Benoist, C., and Mathis, D. 2001. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 13:763-8.
- 95 Bamford, R. N., Battiata, A. P., Burton, J. D., Sharma, H., and Waldmann, T. A. 1996. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2897-902.
- 96 Edelbaum, D., Mohamadzadeh, M., Bergstresser, P. R., Sugamura, K., and Takashima, A. 1995. Interleukin (IL)-15 promotes the growth of murine

- epidermal gamma delta T cells by a mechanism involving the beta- and gamma c-chains of the IL-2 receptor. *J Invest Dermatol* 105:837-43.
- 97 Blauvelt, A., Asada, H., Klaus-Kovtun, V., Altman, D. J., Lucey, D. R., and Katz, S. I. 1996. Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J Invest Dermatol* 106:1047-52.
- 98 Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T. A., Taniguchi, T., and Taki, S. 1998. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391:700-3.
- 99 Ohteki, T., Ho, S., Suzuki, H., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. 1997. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol* 159:5931-5.
- 100 Ohteki, T., Yoshida, H., Matsuyama, T., Duncan, G. S., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. 1998. The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 187:967-72.
- 101 Quinn, L. S., Haugk, K. L., and Grabstein, K. H. 1995. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 136:3669-72.
- 102 Quinn, L. S., Haugk, K. L., and Damon, S. E. 1997. Interleukin-15 stimulates C2 skeletal myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 239:6-10.

- 103 Suzuki, H., Duncan, G. S., Takimoto, H., and Mak, T. W. 1997. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med* 185:499-505.
- 104 Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S., and Peschon, J. J. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191:771-80.
- 105 Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-76.
- 106 Fehniger, T. A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J. B., Cooper, M. A., Florea, S. M., Freud, A. G., Robinson, M. L., Durbin, J., and Caligiuri, M. A. 2001. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* 193:219-31.
- 107 Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A. 1994. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4935-9.

- 108 Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. 2002. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195:1541-8.
- 109 Nishimura, H., Yajima, T., Naiki, Y., Tsunobuchi, H., Umemura, M., Itano, K., Matsuguchi, T., Suzuki, M., Ohashi, P. S., and Yoshikai, Y. 2000. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J Exp Med* 191:157-70.
- 110 Waldmann, T. A. and Tagaya, Y. 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 17:19-49.
- 111 Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T. A., Losi, J. M., Azimi, N., Hanover, J. A., Bamford, R. N., and Waldmann, T. A. 1997. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14444-9.
- 112 Cho, B. K., Rao, V. P., Ge, Q., Eisen, H. N., and Chen, J. 2000. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* 192:549-56.
- 113 Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y., and Bevan, M. J. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 192:557-64.
- 114 Murali-Krishna, K. and Ahmed, R. 2000. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol* 165:1733-7.

- 115 Sun, J. C. and Bevan, M. J. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300:339-42.
- 116 Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. 2002. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297:2060-3.
- 117 Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., and Schoenberger, S. P. 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421:852-6.
- 118 Shedlock, D. J. and Shen, H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300:337-9.
- 119 Zheng, X. X., Steele, A. W., Nickerson, P. W., Steurer, W., Steiger, J., and Strom, T. B. 1995. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol* 154:5590-600.
- 120 Chae, D. W., Nosaka, Y., Strom, T. B., and Maslinski, W. 1996. Distribution of IL-15 receptor alpha-chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *J Immunol* 157:2813-9.
- 121 Kim, Y. S., Maslinski, W., Zheng, X. X., Stevens, A. C., Li, X. C., Tesch, G. H., Kelley, V. R., and Strom, T. B. 1998. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc gamma2a protein blocks delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 160:5742-8.