

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

**Caractérisation d'une nouvelle cytokine composite
formée de CLF et de la sous-unité p28 de l'IL-27**

par

Angélique Guay-Giroux

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences
en Pharmacologie

Octobre, 2007

© Angélique Guay-Giroux, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation d'une nouvelle cytokine composite formée de CLF et de la sous-unité p28
de l'IL-27

présenté par :

Angélique Guay-Giroux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Audrey Claing, président-rapporteur
Jean-François Gauchat, directeur de recherche
Denis DeBlois, membre du jury

Résumé

CLC/CLF appartient à une famille en croissance de cytokines composites formée par l'interaction entre une sous-unité de type cytokine et un récepteur soluble. Cette famille comprend aussi l'IL-12, l'IL-23, p35/EBI3 et l'IL-27. Des différences de phénotype ont été observées chez des patients affectés par une maladie causée par des mutations inactivant les gènes codant pour CLC ou CLF. Ces différences suggèrent que CLF puisse être impliqué dans la formation d'autres complexes. Nous avons démontré par co-immunoprécipitation, que la sous-unité de l'IL-27, p28, interagit avec CLF pour former un complexe stable et sécrété. En effet, cette sous-unité, qui s'associe avec l'EBI3 pour former l'IL-27, est un homologue de CLC. Nous n'avons observé aucune liaison ou activation des récepteurs de l'IL-27 (formé par gp130 et IL-27R) et de CLC/CLF (formé par gp130, LIFR β et CNTFR α). Comme les ARNm de p28 et CLF sont tous deux exprimés par les cellules dendritiques humaines activées, nous avons testé plusieurs types de cellules immunocompétentes afin de chercher l'activité biologique de p28/CLF. Nous avons observé que ce complexe induit une augmentation marquée de la production d'IFN- γ par les cellules NK en synergie avec l'IL-2 ou l'IL-12 sans accroître leur activité cytotoxique. Cette nouvelle cytokine pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle de la réponse NK par les cellules présentatrices d'antigène et avoir des applications thérapeutiques dans certaines pathologies pour lesquelles l'activation sélective des NK serait bénéfique.

Mots-clés : Immunité, Syndrome de transpiration au froid, Interféron- γ , Cytokine de la famille IL6/12, Cellules dendritiques

Abstract

CLC/CLF belongs to a growing family of composite cytokines formed by the interaction between cytokine subunits and soluble cytokine receptors. Differences of phenotypes between patients with a disease called cold induced sweating syndrome caused by mutations in the CLC or CLF genes were observed. These differences suggest that CLF could be implied in other heterodimeric complexes. Co-transfection experiments indicate that p28, a subunit of IL-27, and CLF can form a stable, secreted complex. IL-27 has the capacity to activate many cells like naïve CD4⁺ T and NK cells and plays an important role in limiting intensity and duration of immune response. p28 binds to EBI3, a soluble cytokine receptor, to form IL-27, and is a close known homologue of cardiotrophin-like cytokine (CLC). The p28/CLF complex did not bind or activate the IL-27 receptor (formed by gp130 and IL-27R) or the CLC/CLF receptor (formed by CNTFR α , gp130 and LIFR β). Accordingly, we failed to observe activation of cell lines responsive to CLC/CLF or IL-27 in response to p28/CLF. Unlike IL-27, p28/CLF did not activate naïve CD4⁺ T cells. As p28 and CLF mRNA are co-expressed by activated DC, a screening for p28/CLF biological activities on human immunocompetent cells showed that the composite cytokine strongly increased IFN- γ production by IL-2 or IFN- γ in activated NK cells. No effect on NK cytotoxicity was observed, this new composite cytokine could therefore participate in the cross-talk between dendritic cell and NK cells and have therapeutic applications in pathologies in which selective NK cell activation would be beneficial.

Keywords : Immunity, Cold induced sweating syndrome, Interferon- γ , IL-12/IL-6 cytokine family, Dendritic cells

Liste des abréviations

- ACTH** : Hormone adrénocorticotrope
- APC** : Cellule Présentatrice d'Antigène;
- CISS** : *Cold Induced Sweating Syndrome*
- CLC** : *Cardiotrophin-Like Cytokine*
- CLF** : *Cytokine Like Factor-1*;
- CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CNTF** : *Ciliary Neurotrophic Factor*;
- CNTFR α** : Récepteur au CNTF
- CT-1** : Cardiotrophine-1
- DC** : Cellule Dendritiques
- EBI3** : *Epstein-Barr virus induced gene 3*
- FasL** : Ligand de Fas
- Fc** : Fragment Cristallisable
- FNIII** : Fibronectine III
- GATA-3** : GATA-Binding Protein 3
- GM-CSF** : Facteur de Stimulation de Colonie de Macrophages et Granulocytes
- Gp130** : Glycoprotéine130
- GPI** : Glycosyl-Phosphatidylinositol
- HLA** : Antigène des Leucocytes Humains
- IFN**: Interféron
- Ig** : Immunoglobuline
- IGD** : Domaine de type immunoglobuline
- IL** : Interleukine
- ITAM** : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*
- ITIM** : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*
- JAK** : Kinase Janus

KIR : *killer immunoglobulin-like receptor*
LIF : Facteur d'Inhibition de la Leucémie
LIFR : Récepteur LIF
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : *Mitogen-Activated-Protein Kinase*
MLC : Module de liaison aux cytokines
N-CAM : *Neural Cell Adhesion Molecule*
NK : *Natural Killer*
NNT-1/BSF-3 : *Novel Neurotrophin-1/B cell-Stimulating Factor-3*;
NP : Neuropoïétine
NRC : Récepteurs Cytotoxiques Naturelles
OSM : Oncostatine M
OSMR: Récepteur de l'OSM
PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PI3K : *Phosphatidylinositol 3-Kinase*
ProtC : Protéine C
STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*
T-bet : *T-box Expressed in T cells*
TCR : Récepteur des cellules T
TGF- β : *Transforming Growth Factor β*
Th : *T helper lymphocyte*
TNF : Facteur de Nécrose Tumorale
TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
Treg : cellule T Régulatrices

2.2.2.4 Complexe CLC/CLF	28
2.2.2.4.1 Caractéristiques de CLF	28
2.2.2.4.2 Syndrome de transpiration au froid	29
2.2.2.4.2.1 CISS I	29
2.2.2.4.2.2 CISS II	30
2.2.2.4.2.3 Implication du complexe CLC/CLF	31
2.2.2.5. Activités biologiques	32
2.2.2.5.1 Activités neurotrophiques.....	32
2.2.2.4.2. Stimulation des cellules B	33
2.2.2.4.3. Modulations neuroimmunoendocrines	33
2.2.2.5.4 Autres activités de CLC	34
2.2.3 Interleukine-27 (IL-27).....	34
2.2.3.1 Effets pro-inflammatoires de l'IL-27	35
2.2.3.2 Effets anti-inflammatoires de l'IL-27.....	36
Hypothèse et objectif.....	37
Article	38
Discussion	76
2. Interaction entre p28 et CLF.....	77
2.1 Mutants	78
3. Production du complexe	78
4. Récepteur	80
5. Activités biologiques	82
5.1 Système immunitaire	82
5.2 Caractérisation de l'effet sur les NK	83
5.2.1 Production d'IFN- γ	83
5.2.2 Cytotoxicité	84
Conclusion.....	86
Bibliographie	88
Annexe 1-Résultats.....	I
Annexe 2-Contribution des auteurs.....	VI
Annexe 3-Accords des auteurs.....	VII

2.2.2.4 Complexe CLC/CLF	28
2.2.2.4.1 Caractéristiques de CLF	28
2.2.2.4.2 Syndrome de transpiration au froid.....	29
2.2.2.4.2.1 CISS I.....	29
2.2.2.4.2.2 CISS II	30
2.2.2.4.2.3 Implication du complexe CLC/CLF	31
2.2.2.5. Activités biologiques	32
2.2.2.5.1 Activités neurotrophiques	32
2.2.2.4.2. Stimulation des cellules B.....	33
2.2.2.4.3. Modulations neuroimmunoendocrines.....	33
2.2.2.5.4 Autres activités de CLC.....	34
2.2.3 Interleukine-27 (IL-27)	34
2.2.3.1 Effets pro-inflammatoires de l'IL-27.....	35
2.2.3.2 Effets anti-inflammatoires de l'IL-27	36
Hypothèse et objectif	37
Article	38
Discussion.....	76
2. Interaction entre p28 et CLF	77
2.1 Mutants	78
3. Production du complexe	78
4. Récepteur	80
5. Activités biologiques	82
5.1 Système immunitaire	82
5.2 Caractérisation de l'effet sur les NK.....	83
5.2.1 Production d'IFN- γ	83
5.2.2 Cytotoxicité.....	84
Conclusion	86
Bibliographie.....	88
Annexe 1-Résultats	I

Liste des tableaux

Tableau I : Récepteurs des cellules NK humaines	12
---	----

Liste des figures

Figure 1 : Immunité humorale versus immunité à médiation cellulaire.....	4
Figure 2 : Hématopoïèse du système immunitaire.	5
Figure 3 : Les différences entre les deux sous-populations de NK humain.	9
Figure 4 : Les 4 plus importantes superfamilles de récepteurs aux cytokines.....	17
Figure 5 : L'organisation des modules de structures des domaines extracellulaire des récepteurs de la famille de l'IL-6.....	20
Figure 6 : Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6.	21
Figure 7 : Représentation schématique d'une cytokine à 4 chaînes α	22
Figure 8 : Représentation en ruban de la structure cristallographique de IL-6 et LIF.....	23
Figure 9 : Représentation des 3 sites d'interactions des cytokines de la famille de l'IL-6.	24
Figure 10 : Activation par l'IL-6 des voies de signalisation de JAK/STAT et des MAPK.....	26

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de maîtrise Jean-François Gauchat qui m'a donné la chance de participer à un si beau projet de recherche. Je le remercie aussi pour sa grande disponibilité qui m'a permis de poser toutes les questions qui me passaient par la tête. 😊

Je remercie aussi les meilleures collègues de travail possible, du genre avec qui on aime travailler, mais qui deviennent aussi de très bonnes amies. Merci Isa et Alex pour les beaux moments passés ensemble, j'espère qu'il y en aura d'autres.

Je tiens aussi à remercier le lab d'en face, sans qui plusieurs manips auraient été perdues sans les nombreux emprunts qu'on a du leur faire. Merci à leur compréhension, leur bonne humeur et la complicité développer avec eux au cours des années.

Merci aussi aux autres membres du lab, et qui m'ont souvent été d'une grande aide. Merci Florence, Sandrine et Marie-Ève.

Merci aussi à tous les autres grâce auxquels la vie au département à été si agréable.

Introduction

1. Le système immunitaire

1.1 Généralités

Les êtres vivants sont confrontés régulièrement à différents agresseurs comme les virus, les bactéries, les parasites et leurs propres cellules dégénérées: les cellules cancéreuses. Il existe plusieurs variantes du système immunitaire parmi les espèces animales, mais la forme la plus évoluée se trouve chez les vertébrés supérieurs. En effet, notre système immunitaire s'est complexifié en parallèle avec l'évolution des stratégies que prennent les micro-organismes pour échapper à la réponse immunitaire.

Les voies d'entrée des pathogènes sont multiples : voie respiratoire, tractus digestif, lésion de la peau, etc. Les épithélia et les substances qu'ils secrètent tel que le lysozyme, limitent considérablement l'entrée de ces micro-organismes. Toutefois, lorsque ces barrières physiques sont franchies, un ensemble de mécanismes complémentaires se met en place et forme la réponse immunitaire. Le système immunitaire permet d'assurer l'intégrité des cellules et tissus en éliminant ses propres constituants altérés, les substances étrangères ou les agents infectieux (Campbell 1995).

Malgré l'importance de ces systèmes pour notre survie, les réactions immunitaires peuvent parfois avoir des conséquences pathologiques. Elles peuvent entraîner des allergies, des réactions d'hypersensibilité ou se retourner contre les propres constituants de l'organisme et être responsables de maladies auto-immunes, comme le diabète, la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn.

1.2 Les deux types d'immunité

Chez les vertébrés, il existe deux types d'immunité qui sont apparus de façons successives au cours de l'évolution des espèces. (a) Les mécanismes de défense non-spécifique que l'on appelle immunité naturelle, innée ou naïve, sont des réponses

immédiates. (b) Les mécanismes de défense spécifique que l'on appelle immunité adaptative, reposent sur l'existence de cellules ayant des récepteurs spécifiques à certaines parties des pathogènes, appelés antigènes, et permettent une réponse immunitaire plus ciblée et efficace (Campbell 1995).

1.2.1 L'immunité naturelle

L'immunité naturelle constitue la première ligne de défense immunitaire qui associe des mécanismes physiques (peau, mucus), humoraux (système du complément, cytokines) et cellulaires [cellules à fonctions phagocytaires ou lytiques comme les cellules tueuses naturelles (NK : Natural Killer) ou les macrophages] qui se conjuguent pour former la réponse inflammatoire. Elle repose sur des mécanismes de défense immédiate constitués de systèmes d'activations en cascade tels que le complément, le système des kinines, la coagulation et la fibrinolyse.

Les mécanismes de stimulation de cette réponse immunitaire répondent le plus souvent à des motifs communs à un grand nombre de micro-organismes pathogènes (PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns) qui sont absents de l'organisme hôte. Ces motifs sont reconnus dans le milieu extracellulaire par les récepteurs de type Toll et dans le milieu cytoplasmique par les récepteurs Nod qui sont rapidement inductible chez l'hôte et déclenchent une réaction inflammatoire coordonnée visant à exclure et à détruire le pathogène (Meylan *et al.* 2006). On peut citer comme exemple de PAMP : l'ADN bactérien riche en certaines séquences déméthylées, les ARN double brins des virus, les peptidoglycans ou encore les endotoxines [comme les lipopolysaccharides (LPS)].

Les cellules impliquées dans l'immunité naturelle ont un rôle crucial dans l'initiation et l'amplification ultérieure de la réponse immunitaire adaptative. En effet, comme la mise en action de l'immunité adaptative peut prendre de quatre à cinq jours, l'immunité naturelle est essentielle pour circonscrire les infections durant cette période (Janeway *et al.* 2003).

1.2.2 L'immunité spécifique

L'immunité spécifique, la deuxième stratégie de défense, est apparue avec l'émergence des vertébrés il y a environ 500 millions d'années. Elle utilise principalement les lymphocytes T et B portant à leur surface des récepteurs d'antigène extrêmement diversifiés et susceptibles d'interagir avec un nombre quasi-illimité de molécules antigéniques.

Cette ligne de défense se distingue des défenses non-spécifiques par quatre caractéristiques : la spécificité, la diversité, la reconnaissance du soi et du non-soi et la mémoire.

La spécificité fait référence à la capacité du système immunitaire de reconnaître et d'éliminer certains micro-organismes ou antigènes. Ces substances étrangères induisent la prolifération des lymphocytes spécialisés dans la production de protéines spécifiques appelées anticorps. À un antigène donné correspond un anticorps donné, des micro-organismes différents entraînent des réponses différentes.

La diversité correspond à la capacité du système immunitaire à réagir contre des millions de types d'agresseurs, en reconnaissant chacun d'eux à ses marqueurs antigéniques. Cela est dû au fait que le système immunitaire possède une variété considérable de populations lymphocytaires, dont chacune peut combattre un antigène particulier.

La reconnaissance du soi et du non-soi se rapporte à la capacité du système immunitaire de faire la distinction entre les molécules de l'organisme (le soi) ou les molécules de l'organisme modifié (le soi modifié) et les molécules étrangères (le non-soi). En effet, les lymphocytes portant des marqueurs antigéniques compatibles avec des molécules présentes dans l'organisme au moment du développement de l'embryon sont détruits. La reconnaissance du soi passe principalement par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui est divisé en deux catégories. Le CMH I, exprimé de façon ubiquitaire, permet de présenter aux cellules cytotoxiques des antigènes du soi permettant à ces cellules d'être identifiées comme faisant partie du corps. Le CMH II, exprimé seulement

sur les cellules présentatrices d'antigène, permet de présenter des antigènes de pathogène permettant de déclencher une réponse immunitaire. Chez l'homme on appelle ce système HLA (antigène des leucocytes humains).

Finalement, la mémoire fait référence à la capacité du système immunitaire de se rappeler les antigènes qu'il a déjà rencontrés et d'y réagir promptement et efficacement lors d'expositions ultérieures. C'est l'immunité permettant de prévenir les récurrences (Campbell 1995).

De plus, la réponse adaptative peut être présentée sous deux volets. (a) La réponse humorale est basée sur la production d'anticorps par les lymphocytes B protégeant principalement l'organisme contre les toxines, les bactéries et les virus présents dans les liquides biologiques. (b) La réponse à médiation cellulaire est basée sur l'action de cellules cytotoxiques permettant de détruire les cellules infectées ou cancéreuses (figure 1).

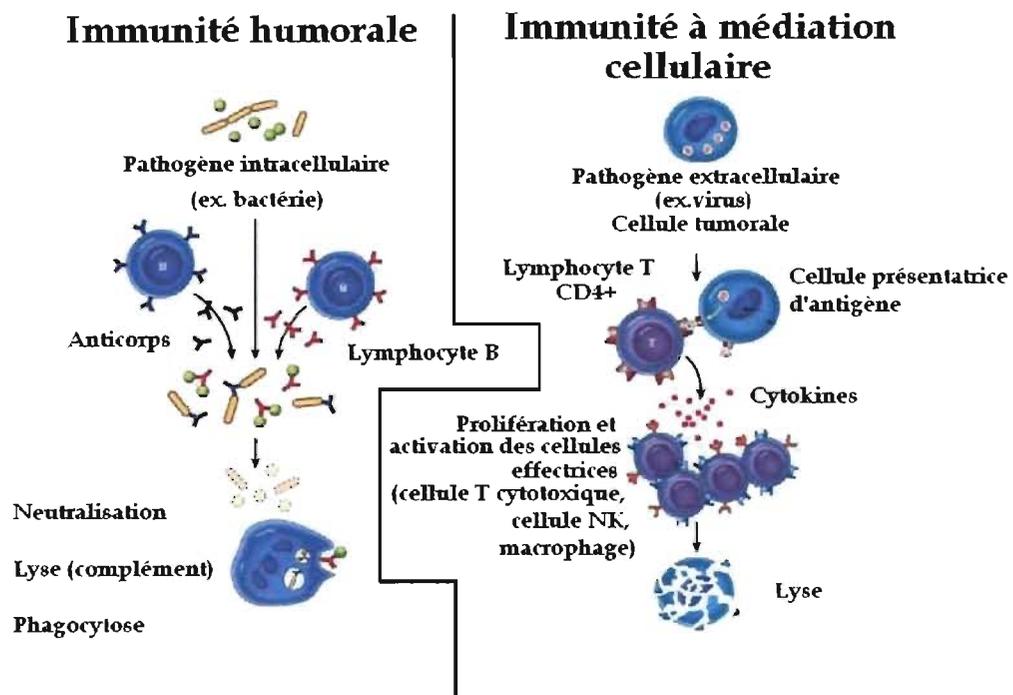
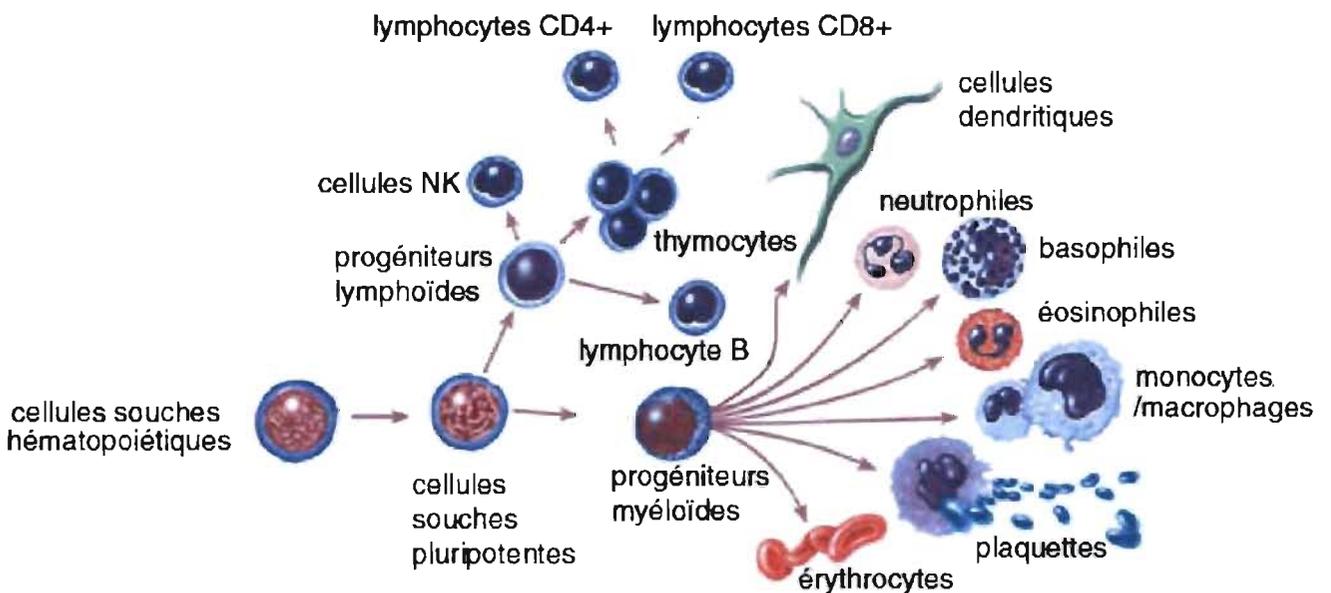


Figure 1 : Immunité humorale versus immunité à médiation cellulaire.

Représentation schématisée des composants principaux de l'immunité humorale et à médiation cellulaire. Adapté de Elsevier Science, 2002

1.3 Les cellules de l'immunité

Toutes les cellules du système immunitaire proviennent de cellules souches hématopoïétiques (présentes dans la moelle osseuse) (figure 2). Ces cellules souches peuvent se différencier en cellules progénitrices, qui donneront ensuite naissance à différents types cellulaires. Les progéniteurs lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes T et B, aux cellules NK et à un certain type de cellules dendritiques (DC). Les progéniteurs myéloïdes sont les précurseurs des granulocytes (neutrophile, basophile, éosinophile), des macrophages, des monocytes, des plaquettes, des érythrocytes et d'un autre type de DC (Janeway *et al.* 2003). Ici, nous allons présenter un bref survol des lymphocytes T et des DC et nous porterons une attention plus particulière aux cellules NK.



©2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk

Figure 2 : Hématopoïèse du système immunitaire.

Représentation schématique de la différenciation des cellules du système immunitaire provenant d'une cellule souche de la moelle osseuse.

1.3.1 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T également appelés cellules T, désignent un ensemble de cellules d'origine hématopoïétique et dont la différenciation se déroule dans le thymus. On distingue deux sous-populations importantes : les lymphocytes T qui expriment le marqueur CD4 (T auxiliaires ou helper en anglais T-Helper) ou exprimant CD8 (T cytotoxiques). Ces cellules diffèrent de façon fondamentale dans les fonctions qu'elles exercent.

Les lymphocytes T CD4⁺ sont les cellules coordinatrices majeures du système immunitaire et prolifèrent pour moduler la réponse d'autres types de cellules qui agiront de manière plus directe sur la réponse.

Les cellules T CD4⁺ peuvent être réparties en quatre sous-populations principales (Th1, Th2, Th17, et T régulatrice (Treg)) qui se distinguent entre autres par les cytokines qu'elles sécrètent.

Les T CD4⁺ qui se différencient en cellules Th1 sont caractérisés par la production de cytokine pro-inflammatoire comme l'interféron- γ (IFN- γ), l'IL-2 et le facteur de nécrose tumorale- β (TNF- β). Les cellules Th1 induisent le déclenchement de la réponse à médiation cellulaire et stimulent la phagocytose et les cellules cytotoxiques.

Les cellules Th2 régulent principalement l'immunité humorale et sont caractérisées par la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-9 ou d'IL-13.

Les cellules Treg inhibent *in vitro* et *in vivo* la prolifération des lymphocytes T et sont caractérisées chez l'Homme par la présence d'un marqueur CD25 à leur surface (chaîne α du récepteur pour l'IL-2) et par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Baecher-Allan et Hafler 2004).

Finalement les cellules Th17 qui ont récemment été caractérisées sont définies par leur production d'IL-17. Ces cellules jouent un rôle à l'interface de la réponse innée et adaptative. Elles modulent la défense de l'hôte contre des pathogènes extracellulaires qui sont distincts de ceux des réponses Th1 et Th2 (Weaver *et al.* 2006).

1.3.2 Les cellules NK

1.3.2.1 Généralités

Les cellules NK sont d'importants médiateurs de l'immunité naturelle. Elles exercent une cytotoxicité naturelle c'est à dire qui ne nécessite pas d'immunisation ou de pré-activation avant de reconnaître et de tuer certaines cibles. Les NK sont actifs essentiellement contre les pathogènes intracellulaires, ils éliminent nos cellules infectées par certains virus, parasites ou bactéries et les cellules tumorales. Les cellules NK peuvent aussi prendre part, comme les macrophages et les granulocytes, à la cytotoxicité dépendante des anticorps qui consiste à reconnaître et détruire les cellules qui sont recouvertes par des anticorps (exemple : opsonisation).

Les cellules NK sont une source importante de cytokines immunorégulatrices permettant ainsi aux cellules NK de jouer un rôle dans l'immunité adaptative (Robertson et Ritz 1990).

1.3.2.2 L'IFN- γ

L'une des cytokines principales produites par les cellules NK est l'IFN- γ . Les interférons sont des effecteurs clés dans la réponse innée et adaptative. Les IFN de type I, comme l'IFN- α , sont produits en grande quantité par les DC plasmacytoïdes et sont particulièrement importante dans la résistance aux infections virales. La cytokine inflammatoire IFN- γ est produite en grande quantité par les effecteurs de la réponse Th1, par les cellules T CD4⁺, et par les NK. Les IFN jouent aussi un rôle dans l'initiation de la réponse de l'immunité adaptative. Les IFN de type I aident à activer les DC permettant d'initier la réponse T primaire. L'IFN- γ est nécessaire à l'initiation de la différenciation des cellules T activées en état Th1 de production d'IFN- γ . L'IFN- γ possède de nombreuses propriétés effectrices. D'une part, il stimule la capacité microbicide des macrophages et des monocytes. D'autre part, l'IFN- γ possède des propriétés anti-virales importantes (Vremec

et al. 2006). En effet, il stimule la présentation des antigènes, rendant ainsi les cellules infectées mieux reconnues par les lymphocytes T et il déstabilise les ARN viraux (Schroder *et al.* 2004).

L'importance des cellules NK dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux est bien mise en évidence par le phénotype des personnes déficientes en NK. Ces personnes sont atteintes d'infections récurrentes avec entre autre une susceptibilité aux virus de l'herpès (Orange 2002; Eidenschenk *et al.* 2006). De plus, Les souris NK^{-/-} sont également plus susceptibles aux infections virales sévères (Bukowski *et al.* 1983).

1.3.2.3 Des cellules NK

Les cellules NK représentent 5 à 15 % des cellules du sang périphérique chez l'Homme. Ces lymphocytes sont peu abondants dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils sont essentiellement présents dans le sang, la rate et la moelle osseuse. Ils migrent dans les tissus périphériques comme les épithélia en cas d'inflammation.

Les lymphocytes T et les cellules NK sont originaires d'un précurseur commun. Au cours de la différenciation apparaissent différents marqueurs, ainsi que des récepteurs aux cytokines. L'acquisition de la chaîne β du récepteur à l'IL-2 semble être la marque de l'engagement du progéniteur vers la lignée NK (Colucci *et al.* 2003).

1.3.2.4 Sous-type des cellules NK

Les marqueurs de surface les plus caractéristiques des NK matures humains sont : la molécule CD16 qui constitue un récepteur pour le fragment Fc (Fragment cristallisable) des immunoglobulines de type G (IgG) et serait impliquée dans la cytotoxicité dépendante aux anticorps et la molécule CD56 qui appartient à la famille des protéines d'adhésion cellulaire de type N-CAM (« neural cell adhesion molecule ») qui interviennent dans les réactions d'adhésion entre cellules neurales et musculaires. Cette molécule a encore des fonctions inconnues chez les NK (Lanier *et al.* 1989) mais il est possible qu'elle joue un rôle dans

l'interaction entre les cellules NK et les autres cellules (Nitta *et al.* 1989; Suzuki *et al.* 1991). Ainsi, la majorité des cellules NK sont $CD16^+CD56^+CD3^-$.

De façon un peu plus détaillée, on distingue deux populations de NK matures distinctes basées sur la densité à leur surface du marqueur CD56. La majorité (90%) des NK ont une faible densité de CD56 ($CD56^{dim}$) tandis que 10 % ont une forte densité de CD56 ($CD56^{bright}$) (Lanier *et al.* 1986). Même si la fonction de CD56 n'est pas connue, la densité de son expression est corrélée à la présence d'autres marqueurs de surface qui confèrent des propriétés fonctionnelles uniques aux deux sous-types (figure 3).

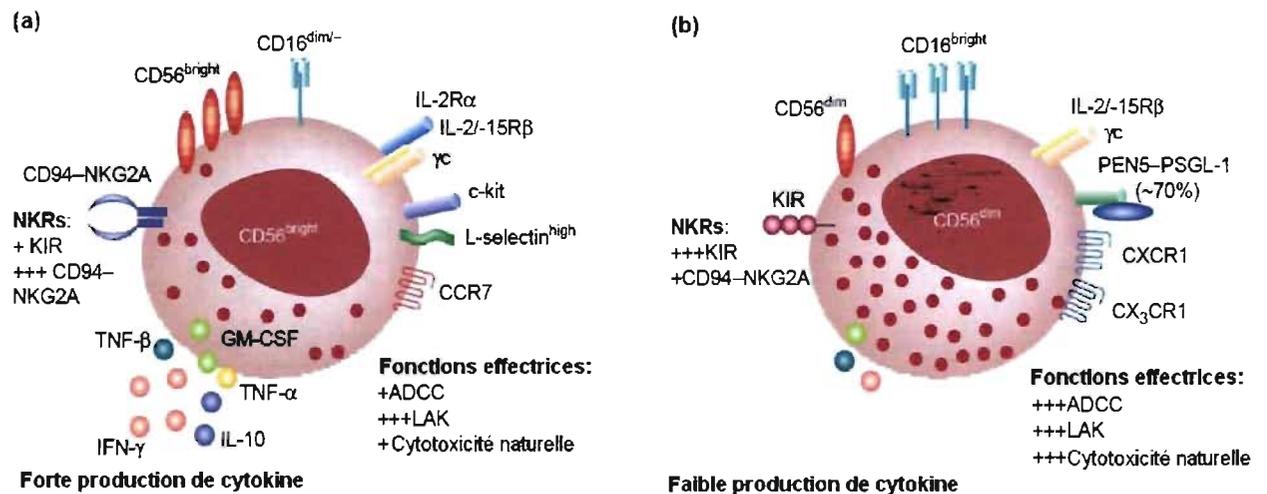


Figure 3 : Les différences entre les deux sous-populations de NK humain.

Représentation schématique des sous-populations des NK et leurs caractéristiques principales. (a) Les $CD56^{bright}$ correspondent à la population de cellules NK immunorégulatrices et (b) les $CD56^{dim}$ correspondent à la population de NK cytotoxiques. Adapté de Cooper *et al.*, 2001

Les cellules NK $CD56^{bright}$ sont de façon prédominante des cellules immunorégulatrices qui expriment le récepteur à l'IL-2 de haute affinité (chaînes α , β , et γ), et sécrètent des cytokines (l' $IFN-\gamma$, le facteur de stimulation de colonie de macrophages et granulocytes ($GM-CSF$), l' $IL-13$, l' $IL-10$, le $TNF-\alpha$, etc.). Par contre, ce sous-groupe a une faible cytotoxicité naturelle. Les cellules $CD56^{dim}$ sont essentiellement

des cellules cytotoxiques qui produisent une faible quantité de cytokines et qui expriment le récepteur à l'IL-2 d'affinité intermédiaire (chaînes α et β). La relation entre ces deux sous-populations est encore inconnue, il est possible qu'elles représentent deux sous-populations matures différentes de NK ou deux étapes distinctes de la voie de différenciation et de maturation (Lanier *et al.* 1986; Suzuki *et al.* 1991).

1.3.2.5 Reconnaissance de la cible

On a expliqué pendant plusieurs années le fonctionnement des NK par le principe du « missing self », le modèle de l'inhibition des effecteurs ou du signal négatif (Ljunggren et Karre 1990). Selon ce modèle, les cellules NK sont initialement activées par des molécules de surface. La lyse activée par ces récepteurs est interrompue par un signal inhibiteur engendré par la reconnaissance de CMH de classe I. En l'absence de molécules de classe I, le signal activateur engendré par la reconnaissance de certaines molécules de surface n'est pas interrompu et la cible est lysée.

Cependant, la réalité serait plus nuancée. L'activation d'une cellule NK serait le résultat d'effets opposés, inhibiteurs et activateurs, où les récepteurs inhibiteurs sensibles au CMH de classe I serviraient simplement à freiner l'effet des stimuli activateur. Il en découle que ce ne serait pas l'absence de molécules du CMH de classe I qui déclencherait l'activation des lymphocytes NK mais la présence de ligands activateurs non compensés par des signaux inhibiteurs suffisants (Lanier 2005).

Des récepteurs de cytokines et chimiokines présents à la surface des cellules NK peuvent également donner un signal d'activation ou de migration (Lanier 2005).

1.3.2.5.1 Récepteurs des cellules NK

IL existe trois superfamilles de récepteurs (tableau 1) qui ont été décrites pour les cellules NK ; (a) les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines (« killer immunoglobulin-like receptor » (KIR)) qui reconnaissent les CMH de classe I classique, (b) les récepteurs de type lectine C, CD94-NKG2 qui reconnaissent les CMH de classe I non-classique et (c) les récepteurs cytotoxiques naturels (NRC) (Lanier 1998).

1.3.2.5.1.1 Les récepteurs de type immunoglobuline (KIR)

Les KIR forment la superfamille la mieux caractérisée. Ils peuvent être classés selon la présence de deux ou de trois domaines (2D ou 3D) de type immunoglobuline dans sa partie extracellulaire (Colonna et Samaridis 1995; D'Andrea *et al.* 1995; Wagtmann *et al.* 1995). De plus, la longueur de leur queue intracellulaire permet une seconde subdivision (L et S). Les queues longues (L) modulent des signaux inhibiteurs par la présence du motif ITIM (« Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ») et les queues courtes (S) sont associées à des signaux activateurs par leur interaction avec des protéines portant les motifs ITAM (« Immunoreceptor tyrosine-based activation motif ») (Lanier 2005). Les KIR inhibiteurs se lient à différents isoformes des molécules du CMH : principalement les HLA-Cw, mais aussi des HLA-A et HLA-B (Colonna et Samaridis 1995; Biassoni *et al.* 1996). Certaines expériences suggèrent que les KIR activateurs reconnaissent des molécules HLA de classe I avec une affinité moindre que les KIR2DL, ce qui permettrait d'éviter la lyse de cellules saines exprimant un taux normal de molécules de classe I (Boyington *et al.* 2001).

1.3.2.5.1.2 Les récepteurs de type lectine C

La superfamille de molécules hétérodimériques de type lectine C est représentée par un hétérodimère, composé d'une sous-unité commune (CD94) qui se lie de façon covalente à une chaîne protéique de la famille NKG2. La sous-unité CD94 ne possède pas de domaine de transduction de signal ; la spécificité du récepteur et ses propriétés de signalisation passent donc par la chaîne NKG2 (Houchins *et al.* 1997). Il existe quatre isoformes de NKG2 ; NKG2A (et son variant d'épissage NKG2B), NKG2C, NKG2E (et son variant d'épissage NKG2H) et NKG2F (Houchins *et al.* 1991). La transduction du signal se fait aussi par la l'utilisation de motifs ITIM ou ITAM se trouvant sur les chaînes NKG2 (Houchins *et al.* 1997).

L'isoforme NKG2D reconnaît plusieurs ligands dérivés des CMH de classe I non classiques, (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 et ULBP3). Les molécules MICA et MICB sont fortement exprimées au cours du stress cellulaire, ainsi que sur les tumeurs

épithéliales, les leucémies et certains mélanomes. Ils peuvent également être induits par les infections virales et bactériennes (Lanier 2005).

1.3.2.5.1.3 Les récepteurs cytotoxiques naturels (NRC)

Les cellules NK peuvent lyser des cellules ayant perdu l'expression des molécules de CMH de classe I. Il existe donc un mécanisme d'activation indépendant des récepteurs pour ces molécules de CMH. Les NCR, récemment identifiés chez l'homme, jouent un rôle majeur dans le déclenchement de la cytotoxicité naturelle sans utiliser les molécules du CMH de classe I. Trois NCR appartenant à la super famille des immunoglobulines ont été décrits : NKp30, NKp44 et NKp46. Les ligands des NCR ne sont pour l'instant pas encore identifiés (Lanier 2005).

Tableau 1 : Récepteurs des cellules NK humaines

Récepteurs		Ligands
<u>Récepteur de type immunoglobuline (KIR)</u>		
<i>Inhibiteur</i>	<i>Activateur</i>	
KIR2L1	KIR2DS1	HLA-C groupe 2
KIR2L2	KIR2DS2	HLA-C groupe 1
KIR2L3		
	KIR2DL4	HLA-G
	KIR2DS4	Inconnu
KIRDL5	KIR2DS5	Inconnu
	KIRDS1	Inconnu
KIR3DL1		HLA-Bw4
KIR3DL2		HLA-A3, -A11
KIR3DL7		Inconnu
<u>Récepteur hétérodimérique de type lectine C</u>		
<i>Inhibiteur</i>	<i>Activateur</i>	
CD94 / NKG2A / B	CD94 / NKG2C	HLA-E
	CD94 / NKG2E / H	Inconnu
NKG2D		MICA, MICB, ULBP-1, -2, -3
<u>Récepteur à cytotoxicité naturelle (NRC)</u>		
NKp30		Inconnu
NKp46		Inconnu
NKp44		Inconnu

Adapté de Farag et Caligiuri, 2006

1.3.2.6 La lyse par les cellules NK

Les lymphocytes NK exercent leurs effets cytotoxiques sur leurs cibles essentiellement par trois grands mécanismes qui sont les mêmes tant chez les NK que chez les autres cellules cytotoxiques.

Le mécanisme le plus rapide et souvent le plus efficace est basé sur la libération, au contact d'une cellule cible, de molécules contenues dans des granules : la perforine et les granzymes B. La perforine va créer des pores dans la membrane de la cellule infectée facilitant l'entrée des granzymes B, une enzyme protéolytique permettant de cliver de nombreux substrats dont les caspases et de conduire à la mort par apoptose de la cellule. La cytotoxicité des NK dépendante de la perforine joue un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules tumorales (Farang *et al.* 2005).

Un second mécanisme met en jeu le ligand de Fas (FasL) membranaire ou sécrété par les NK qui ira se fixer sur un récepteur Fas (CD95) situé sur la cible. La transduction du signal après la liaison de FasL à Fas va déclencher un programme intracellulaire conduisant à l'apoptose de la cellule cible. Ce mode de lyse est plus lent et souvent moins efficace que la lyse perforine/granzyme B (Zamai *et al.* 1998).

Enfin, le troisième mécanisme utilise l'interaction entre le récepteur TRAIL (« TNF-related apoptosis-inducing ligand ») avec l'un des ses ligands (TRAIL-R1 ou DR4 et TRAIL-R2 ou DR5) conduisant aux mêmes types de conséquences que l'interaction FasL/Fas (Zamai *et al.* 1998; Smyth *et al.* 2005).

1.3.2.7 Rôles physiologiques des cellules NK

Dans les dernières années, il est devenu évident que le rôle des cellules NK ne réside pas seulement dans leur potentiel cytolytique (Biron 1997; Janeway et Medzhitov 2002). En effet, l'activation des cellules NK par des cibles cellulaires reconnues comme *non soi* entraîne non seulement la mise en route de la machinerie cytolytique, mais également la sécrétion de cytokines. Les cellules NK peuvent aussi être activées

directement par des cytokines produites par une réaction inflammatoire auxquelles les NK répondront par d'autres cytokines amplifiant cette réaction. Les cellules NK représentent donc une source de cytokines capables d'activer de nombreux types cellulaires impliqués dans les réponses immunes comme les DC, les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T. (Janeway et Medzhitov 2002).

Un exemple caractéristique des nouveaux rôles des NK, est le dialogue qui s'établit à l'initiation d'une réponse immune entre DC et NK. Ainsi, lorsque des DC sont activées via leurs récepteurs de type Toll par exemple, un contact physique s'établit avec les NK aux sites d'inflammation en réponse à une infection. L'interaction entre les DC et les NK résulte en une puissante activation bidirectionnelle, qui permettra de réguler l'intensité et la qualité de la réponse immunitaire. Les DC vont produire des cytokines comme l'IL-12, l'IL-2, l'IL-15, l'IL-18 ou l'IL-27 provoquant la prolifération des NK, l'augmentation de leurs potentiels cytolytiques et la sécrétion d'IFN- γ . En retour les cellules NK activées vont produire des cytokines permettant la maturation des DC (Zitvogel 2002).

1.3.3 Les cellules dendritiques (DC)

Les DC, ont été nommées ainsi à cause de leur prolongement cytoplasmique que l'on appelle dendrites. Ce sont des cellules phagocytaires, présentatrices d'antigènes, permettant entre autre, le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative dirigée contre des antigènes du *non-soi*.

Les DC immatures sont réparties dans l'ensemble des tissus de l'organisme, exerçant le rôle de sentinelle et phagocytant des agents pathogènes ou des cellules tumorales. Pendant qu'elles préparent les pathogènes à la présentation, elles migrent par la lymphe jusqu'aux organes lymphoïdes. Une fois à destination, les DC complètent leur maturation et présentent l'antigène aux lymphocytes T. De ces interactions découleront une activation de l'immunité innée et adaptative du système immunitaire (Banchereau *et al.* 2000).

Les DC peuvent se différencier par un progéniteur myéloïde ou un progéniteur lymphoïde générés dans la moelle osseuse qui donneront des DC de types différents. Le

progéniteur myéloïde donne naissance à deux types de DC immatures (cellules de Langerhans et les DC interstitielles) et deux types de DC précurseurs (monocytes et les cellules plasmacytoïdes). Les DC provenant de progéniteurs lymphoïdes s'appellent les DC plasmacytoïdes ou DC productrices d'IFN- γ (Paul 2003).

2. Les cytokines

2.1 Caractéristiques générales

2.1.1 Généralités

Du grec *cyto*, cellule, et *kinéo*, stimuler, le terme cytokine fut introduit en 1974 (Cohen *et al.* 1974). Les cytokines sont des protéines solubles de faible poids moléculaire synthétisées essentiellement par les cellules du système immunitaire. Elles permettent la communication avec d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Le terme *cytokine* est peu connu du grand public même si avec les hormones et les neuromodulateurs, ce sont les molécules essentielles à la communication de nos cellules.

Depuis la découverte de la première cytokine en 1957, elles provoquent beaucoup d'intérêt dans les domaines de la recherche et de la médecine. L'implication des cytokines a été démontrée dans des processus liés non seulement à la régulation des fonctions immunitaires, mais aussi dans des processus aussi variés que l'hématopoïèse, l'hémostase, l'embryogenèse ou la reproduction pour ne donner que quelques exemples (Janeway *et al.* 2003).

Elles représentent un réel intérêt de recherche étant donné qu'elles contribuent à des situations pathologiques ; auto-immunité, septicémie, maladies inflammatoires chroniques, cancer, hépatites virales, VIH (Janeway *et al.* 2003). Les cytokines peuvent aussi être utilisées comme des agents thérapeutiques (exemple : utilisation d'IFN- β contre la sclérose en plaques (Paty et Li 1993) ou l'IFN- γ pour l'hépatite C (Muir *et al.* 2006).)

2.1.2 Mécanismes d'action

Leurs actions peuvent être autocrine (sur les cellules productrices), paracrine (cellules adjacentes) ou endocrine (cellules à distance). Contrairement aux hormones dont le taux de sécrétion est continu, les cytokines ne sont habituellement pas sécrétées par des cellules au repos. Leur relâche ou leur synthèse nécessite généralement un signal d'activation.

Elles sont caractérisées par deux propriétés : (a) le pléïotropisme, qui signifie que chaque cytokine peut être sécrétée par plusieurs types cellulaires et agir sur différents types cellulaires, et (b) la redondance, qui signifie que des cytokines différentes peuvent avoir des actions identiques.

Le pléïotropisme d'action des cytokines explique aussi la complexité de leurs effets. Certaines génèrent des signaux contradictoires donc s'antagonisent. D'autres produisent des signaux synergiques. Ces interactions peuvent aussi expliquer leurs actions directes sur la cellule cible, soit par rétrocontrôle, positif ou négatif, de leur production réciproque (Janeway *et al.* 2003).

2.1.3 Récepteurs

Les effets biologiques d'une cytokine dépendent de sa liaison à des récepteurs spécifiques présents et de sa concentration. L'expression de son récepteur spécifique sur différents types cellulaires explique aussi souvent le pléïotropisme de ses activités.

La liaison des cytokines à leurs récepteurs spécifiques est de très forte affinité (Fitzgerald 2001). Ceci explique le besoin de très faibles quantités de cytokines pour la transduction du signal.

2.1.4 Classification des cytokines

Il y a aujourd'hui plus d'une cinquantaine de cytokines connues. Il existe plusieurs façons de les classer mais aucune de ces façons n'est reconnue de façon universelle. Il est

possible de les classer par (a) fonction (ex.: TNF), par (b) cellule productrice (ex.: Monokine, lymphokine), par (c) cellule productrice et cellule cible (ex.: Interleukine), par (d) séquence/structure, par (e) séquence de son récepteur ou par (f) voie de signalisation.

Cependant, un consensus non-officiel semble avoir été établi sur le regroupement des cytokines selon la structure de leur récepteur (Fitzgerald 2001). Il existe 6 superfamilles de récepteurs définies par des séquences semblables, plus particulièrement au niveau de leur domaine intracellulaire (voir figure 4).

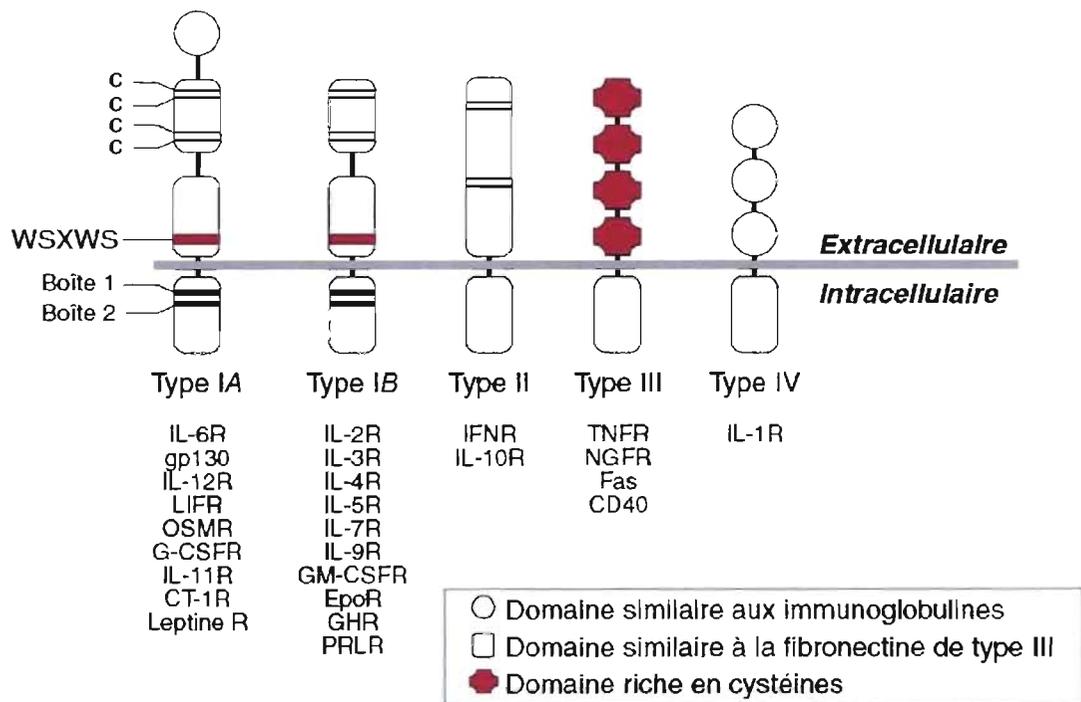


Figure 4 : Les 4 plus importantes superfamilles de récepteurs aux cytokines.

Représentation schématique des structures des récepteurs de type I, II, III et IV. Tiré de Vallières et Rivest 2000.

Il est intéressant de noter qu'au départ, le terme interleukine (IL) regroupait les cytokines permettant la communication entre deux populations de leucocytes (Oppenheim et Gery 1993). Maintenant ce terme est largement utilisé pour désigner n'importe quelle

nouvelle cytokine et ne donne plus d'indication sur ses propriétés biochimiques ou fonctionnelles.

2.2 Les cytokines de la famille de l'IL-6

2.2.1 Caractéristiques générales

2.2.1.1 Généralités

La famille de l'IL-6, aussi appelé famille de la glycoprotéine 130 (gp130), est un sous-groupe de cytokines qui se lient des récepteurs de la famille I appelé aussi récepteurs des hématopoïétines. Cette famille regroupe neuf cytokines : IL-6, IL-11, LIF (facteur d'inhibition de la leucémie), OSM (oncostatine M), CNTF (« ciliary neurotrophic factor »), CT-1 (cardiotrophine-1), CLC (« cardiotrophine-like cytokine »), NP (neuropoïétine) et IL-27 (Heinrich *et al.* 2003). Ces cytokines sont caractérisées par l'utilisation commune de la chaîne transductrice de signal gp130 et d'une structure reposant sur quatre longues hélices α (Bazan 1990). Elles jouent un rôle essentiel dans le système immunitaire, hématopoïétique, nerveux, cardiovasculaire et endocrinien, dans le métabolisme des os, l'inflammation, la régulation de la croissance cellulaire, de la différenciation cellulaire, survie cellulaire, etc (Hirano *et al.* 1997; Heinrich *et al.* 1998; Hirano 1998).

2.2.1.2 Les récepteurs de la famille de l'IL-6

2.2.1.2.1 Structure

Ces chaînes de récepteurs sont des glycoprotéines membranaires de type I ce qui signifie qu'elles ont une extrémité NH_2 orientée vers l'extérieur.

La portion extracellulaire est caractérisée par la présence d'au moins un module de liaison aux cytokines (MLC) constitué de deux domaines conservés d'environ 100 acides aminés. Le premier domaine possède 4 cystéines dont les positions sont conservées et sont

engagées dans des ponts disulfures intra-domaine. Le second domaine possède un motif WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser) (Bazan 1990; Thoreau *et al.* 1991; Taga et Kishimoto 1997). Ce motif s'est montré essentiel dans certains cas pour l'obtention de la conformation tertiaire du récepteur mais n'est pas directement impliqué dans la liaison du ligand. (Yawata *et al.* 1993; Taga et Kishimoto 1997). Les récepteurs de cette famille se distinguent aussi par un domaine de type immunoglobuline (IGD) constitué de sept feuillets β et d'un motif de type fibronectine III (FNIII) (Voir figure 5).

Les portions intracellulaires sont de longueur variable (13 à 577 acides aminés) et sans activité catalytique tyrosine kinase intrinsèque. Elles possèdent cependant, à proximité de la membrane, deux motifs appelés Boîte1 et Boîte 2 dont le premier est un site riche en proline jouant un rôle important dans la transduction du signal.

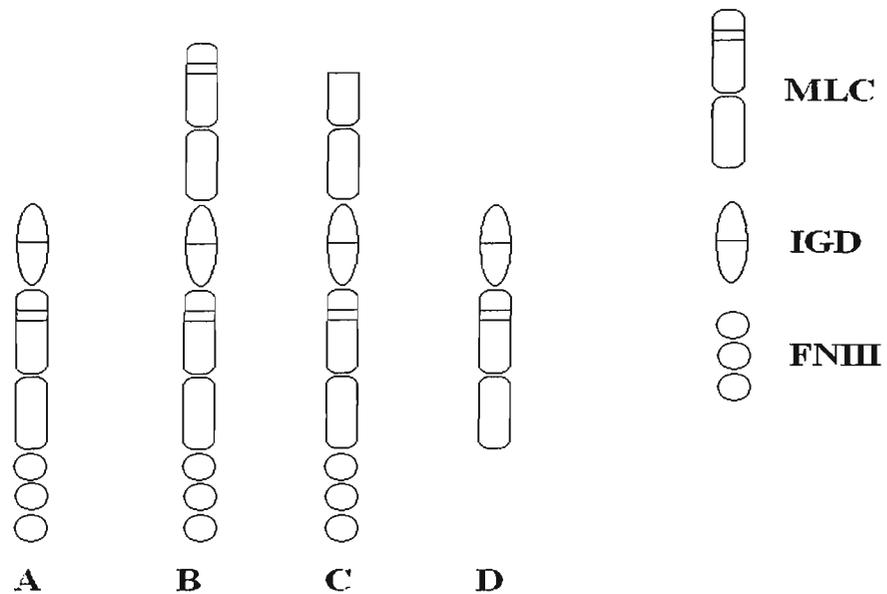


Figure 5: L'organisation des modules de structures des domaines extracellulaire des récepteurs de la famille de l'IL-6.

Les récepteurs sont généralement composés de 3 parties : le module de liaison aux cytokines (MLC), le domaine de type Ig (IGD) et les trois copies du domaine de type fibronectine III (FNIII). (A) gp130 (B) LIFR (C) OSMR (D) les récepteurs solubles (CNTFR, IL-6R, IL-11R). Adapté de Bravo et Heath 2000.

2.2.1.2.2 Formation de complexes

Les récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire des cytokines de la famille de l'IL-6 sont des complexes membranaires constitués de plusieurs chaînes (deux à trois). Les chaînes qui composent ces complexes sont divisées en deux groupes; les chaînes α non transductrices du signal qui confèrent l'affinité et la spécificité de la liaison cytokine-récepteur (CNTFR α , l'IL-6R α et l'IL-11R α) et les chaînes β transductrices du signal qui peuvent être communes à plusieurs récepteurs de cytokines apparentées (gp130, OSMR β et LIFR β) (figure 6) (Bravo, 2000). Toutes ces chaînes sont des protéines transmembranaires

sauf le CNTFR α qui est ancrés dans la membrane par une liaison de type glycosyl-phosphoinositol (GPI).

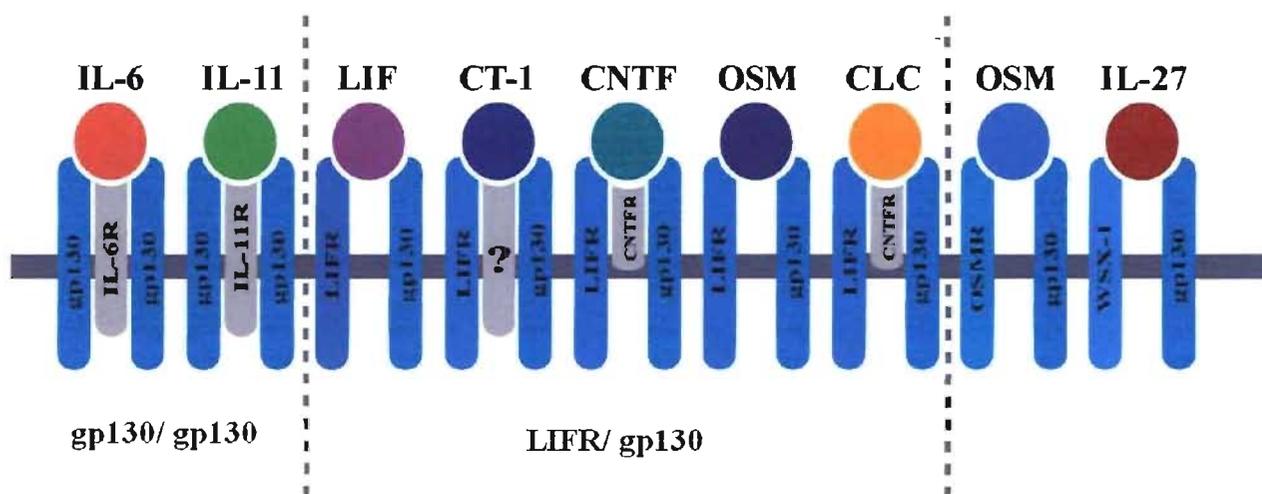


Figure 6 : Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6.

Représentation schématique des récepteurs de la famille de l'IL-6 qui sont composés de différentes combinaisons des sous-unités transductrices de signal gp130, LIFR et gp130. Adapté de Heinrich 2003

Le récepteur gp130 est exprimé de manière ubiquitaire mais les autres composants des récepteurs, en particulier les chaînes α , ont un profil d'expression plus restreint et fortement régulé conférant leur spécificité d'action aux cytokines (Taga et Kishimoto 1997).

Il existe aussi des formes solubles de certaines chaînes α du récepteur. Ces formes solubles proviennent soit d'un clivage des formes transmembranaires soit d'un épissage alternatif de l'ARNm. Elles peuvent amener à une séquestration des cytokines inhibant ainsi leur action ou dans quelques cas elles peuvent se lier aux cytokines et induire une réponse (Heinrich *et al.* 1998). Les exemples les plus connus de récepteurs solubles sont l'IL-6R (Yasukawa *et al.* 1990), l'IL-11R (Baumann *et al.* 1996; Neddermann *et al.* 1996) et le CNTFR α (Davis *et al.* 1993).

2.2.1.3 Structure des cytokines

Les cytokines de la famille de l'IL-6, comme toutes celles se liant aux récepteurs des cytokines de type I, sont formées de quatre longues hélices α anti-parallèles. Ces hélices possèdent entre 15 et 22 acides aminés, sont nommées chaînes A, B, C, D et sont connectées par des structures en forme de boucle (Figure 7). Les boucles reliant les hélices A à B et C à D sont plus longues ce qui permet une orientation parallèle entre elles, tandis que la boucle reliant les chaînes B à C est plus courte induisant une orientation antiparallèle (figure 7) (Bazan 1990).

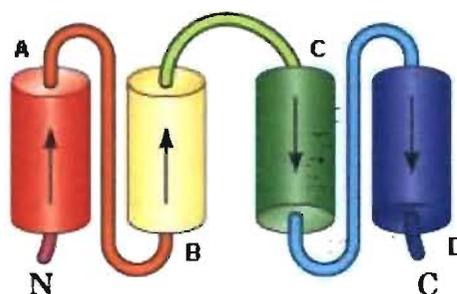


Figure 7: Représentation schématique d'une cytokine à 4 chaînes α .
Les hélices sont désignées A, B, C, D. Adapté de (Grotzinger *et al.* 1997)

Contrairement à l'IL-6 (et probablement l'IL-11) dont toutes les chaînes sont droites, LIF, OSM, CNTF et probablement CLC, CT-1 et NP ont une hélice A qui est courbée (Bravo et Heath 2000; Deller *et al.* 2000) (figure 8). Les cytokines dont les chaînes A sont droites signaleraient via des homodimères de gp130 alors que les cytokines à chaînes A courbées utiliseraient des hétérodimères (ex. gp130/LIFR β ou gp130/OSMR β) (Bravo et Heath 2000).

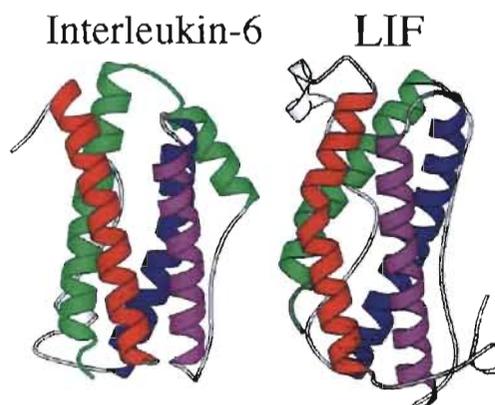


Figure 8: Représentation en ruban de la structure cristallographique de l'IL-6 et de LIF.

L'hélice A de l'IL-6 est droite tandis que celle du LIF est courbée. Tiré de Bravo *et al.*, 2000.

2.2.1.3.1 Sites d'interactions

Des études de mutagenèse sur l'IL-6, le CNTF et le LIF ont démontré que les cytokines de la famille de l'IL-6 possèdent trois sites distincts de liaison aux récepteurs nommés site I, II et III (Figure 9) (Paonessa *et al.* 1995; Barton 1996; Di Marco *et al.* 1996; Hudson *et al.* 1996; Grotzinger *et al.* 1997; Simpson *et al.* 1997). Ces sites d'interaction qui permettent la reconnaissance avec leurs récepteurs ne sont constitués que d'un très petit nombre d'acides aminés situés l'un près de l'autre dans l'espace.

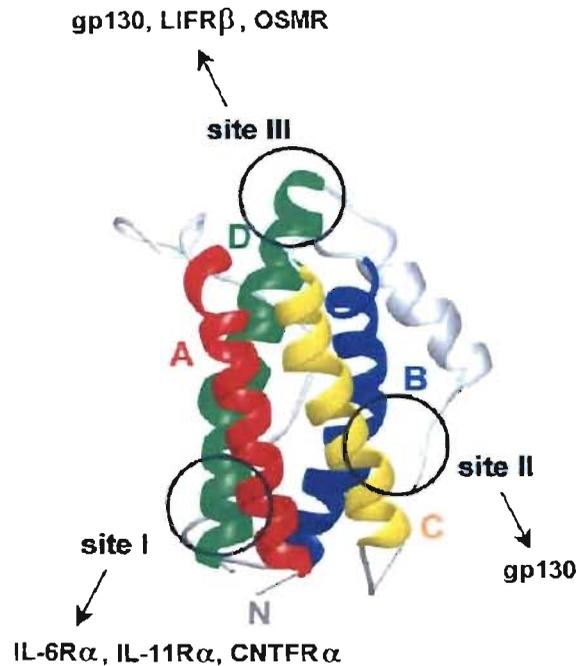


Figure 9 : Représentation des 3 sites d'interactions des cytokines de la famille de l'IL-6.
Basé sur la structure cristallographique de l'IL-6. Adapté de (Heinrich *et al.* 2003)

Le site I est composé de résidus provenant de la partie C terminal de l'hélice D et de la boucle A-B des cytokines. Le site I interagit avec le MLC de la chaîne α du récepteur et permet la spécificité de liaison à la chaîne α (IL-6R α , IL-11R α et CNTFR α).

Le site II est le site de liaison de gp130 pour toutes les cytokines de la famille de l'IL-6 et consiste en des résidus situés au milieu des hélices A et C de la cytokine et se lierait au MLC du récepteur.

Le site III permet le recrutement de la deuxième chaîne transductrice du signal, LIFR β et OSMR β ou d'un deuxième gp130. Il serait localisé au niveau N-terminal de l'hélice D et se lierait à l'IGD du récepteur (Bravo et Heath 2000; Heinrich *et al.* 2003).

Comme il existe deux sites de liaison physiquement distincts pour le récepteur gp130, (le module de liaison aux cytokines et le domaine de type IgG) (Paonessa *et al.*

1995) différentes stœchiométries ont été proposées pour représenter la liaison des cytokines à leur récepteur. L'IL-6 et l'IL-11 qui peuvent recruter deux gp130 pourraient former un complexe tétramérique ou hexamérique. Le complexe hexamérique serait formé de deux gp130, deux ligands et de deux copies de la chaîne α correspondante (Ward *et al.* 1994; De Serio *et al.* 1995).

Ce modèle structural hexamérique a récemment été confirmé par des études de cristallographie et de modélisation moléculaire (Varghese *et al.* 2002; Boulanger *et al.* 2003). Un complexe hexamérique a aussi été décrit pour le CNTF qui consisterait en deux molécules de CNTF, 2 de CNTFR α , 1 de gp130 et 1 de LIFR (De Serio *et al.* 1995).

2.2.1.4. Les voies de signalisation

La première étape de la transduction du signal est la liaison de la cytokine aux chaînes du récepteur ce qui amène une dimérisation des chaînes β (gp130, LIFR, OSMR). Cela permet aux protéines kinases Janus (JAK), protéines cytoplasmiques associées de façon constitutive aux chaînes gp130 et ayant une activité tyrosine kinase, de s'autophosphoryler. JAK1, JAK2 et TYK2 sont les membres de la famille des JAKs qui sont impliquées dans les réponses des cytokines de la famille de l'IL-6 (Berger *et al.* 1994; Lutticken *et al.* 1994; Stahl *et al.* 1994; Hermanns *et al.* 1999; Radtke *et al.* 2002). Cette auto-phosphorylation active les JAK qui en retour phosphorylent des résidus tyrosines de la queue cytoplasmique des chaînes β des récepteurs, générant ainsi des sites d'ancrage pour des molécules adaptatrices ou effectrices ayant des domaines SH2 comme les STAT (Transducteur du Signal et Activateur de la Transcription). Il existe sept membres de la familles des STAT (STAT1 à STAT6) mais seules STAT1, STAT3 et STAT5, dans le cas de l'OSM, semblent impliquées dans la transduction du signal induit par la famille de IL-6 (Fujitani *et al.* 1994; Zhong *et al.* 1994; Lai *et al.* 1995). Les STAT phosphorylés s'associent sous forme d'homo- ou d'hétérodimères capables de transloquer au noyau.

Après reconnaissance de motifs spécifiques d'ADN, ces molécules STAT initieront la transcription des gènes cibles.

La dimérisation des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 n'aboutit pas seulement à l'activation des JAK/STAT mais aussi à l'induction de la cascade des « Mitogen-Activated-Protein Kinase » (MAPK) (figure 10) et peut aussi induire une cascade impliquant les « Phosphatidylinositol 3-Kinase » (PI3K) (Heinrich *et al.* 2003).

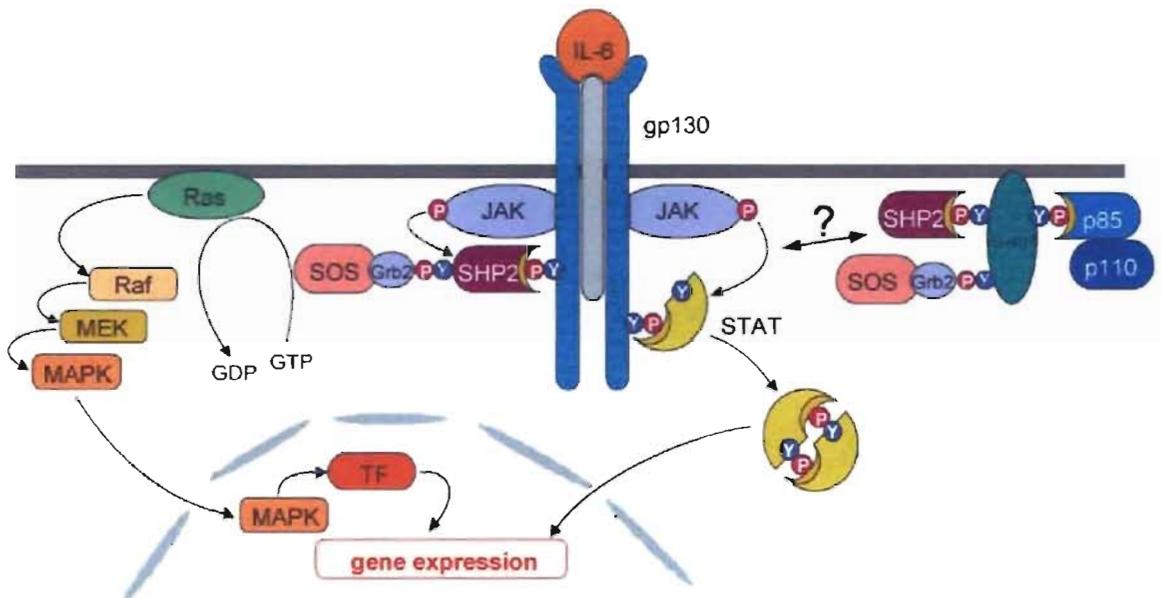


Figure 10 : Activation par l'IL-6 des voies de signalisation de JAK/STAT et des MAPK.

Tiré de Heinrich, 2003

2.2.2 La « cardiotrophin like cytokine » (CLC)

2.2.2.1 Caractéristiques générales

C'est en 1999 que CLC a été découvert par deux équipes indépendantes. Un groupe l'a appelé « novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3) pour ses

effets neurotrophiques et ses effets sur les cellules B (Senaldi *et al.* 1999) et l'autre groupe, cardiotrophin-like-cytokine (CLC) pour son homologie à CT-1 (Shi *et al.* 1999).

L'ARNm de CLC est exprimé dans une grande variété de tissus et d'organes suggérant un rôle biologique important. On le retrouve principalement dans les organes lymphoïdes secondaires tel que les ganglions lymphatiques et la rate, mais aussi dans la moelle osseuse, les ovaires, le placenta, les reins, les poumons les leucocytes et plusieurs autres tissus. L'ARNm de CLC est aussi retrouvé dans plusieurs tissus et organes au cours du développement ; dans les cellules neuroépithéliales fœtales, les tissus musculaires embryonnaires, les poumons, le rein, les dents, le cerveau, les muscles squelettiques (Uemura *et al.* 2002; Forger *et al.* 2003; de Bovis *et al.* 2005). Sa présence au niveau des organes lymphoïdes secondaires et au niveau embryonnaire laisse présager un rôle dans le système immunitaire et dans le développement.

CLC agit comme un deuxième ligand pour le récepteur du CNTF (Elson *et al.* 2000). Il est intéressant de noter que l'existence de ce second ligand du CNTFR important pour la survie des neurones durant le développement avait été suggéré pour expliquer les différences de phénotypes entre les souris déficientes en CNTFR α ou en CNTF. Les souris CNTFR α ^{-/-} meurent peu après la naissance et montrent une réduction significative du nombre de neurones moteurs (DeChiara *et al.* 1995). L'inactivation du gène codant pour CNTF chez la souris résulte en une faible perte de neurones moteurs ce qui provoque une faiblesse musculaire mineure chez les souris adultes (Masu *et al.* 1993). On retrouve une mutation inactivant CNTF chez l'humain, mais elle est silencieuse. En effet, une certaine proportion de la population japonaise (2.3 %) est homozygote pour une mutation qui inactive le gène du CNTF et ne montre aucun signe de pathologie neurologique (Takahashi *et al.* 1994). CNTFR est fortement exprimé durant le développement embryonnaire tandis que l'expression de CNTF n'est presque pas détectable (Ip *et al.* 1993).

2.2.2.3. Mécanisme de sécrétion

CLC possède un peptide signal et devrait être sécrétée de façon constitutive mais est retenue dans la cellule par un mécanisme encore inconnu. Il semble que pour sa sécrétion, CLC doit former un complexe avec d'autres facteurs. Jusqu'à maintenant deux partenaires avec lesquels CLC peut former un complexe hétéromérique permettant sa sécrétion ont été identifiés.

Le premier complexe, formé de CLC et du « cytokine-like factor-1 » (CLF-1, aussi connu sous le nom de NR6) a été identifié en 2000 par Elson *et al.* Ensuite en 2001, l'équipe de H. Gascan a démontré que le complexe formé de CLC et de la chaîne α soluble de son récepteur (sCNTFR α) pouvait aussi permettre la sécrétion de CLC. Il semble que ces partenaires ne servent qu'à la sécrétion car CLC semble pouvoir agir seul (Plun-Favreau *et al.* 2001).

2.2.2.4 Complexe CLC/CLF

2.2.2.4.1 Caractéristiques de CLF

CLF possède les caractéristiques d'une chaîne α des récepteurs de la famille de l'IL-6 : un domaine IGD précédé du motif WSEWS et des 4 cystéines (Elson *et al.* 1998). Cependant, il ne possède pas de séquence hydrophobe typique des domaines transmembranaires ou de motifs requis pour une ancre GPI. Cette protéine ne semble exister que sous une forme de récepteur soluble, contrairement à plusieurs autres récepteurs aux cytokines qui existent sous la forme soluble et la forme transmembranaire (Elson *et al.* 1998). D'un point de vue structurel, CLF ressemble aussi à deux autres récepteurs de type I que l'on retrouve seulement sous la forme soluble, EBI3 qui s'associe à p28 pour former l'IL-27 et à p40 qui s'associe par un pont disulfure à p35 ou à p19 pour former respectivement l'IL-12 et l'IL-23.

On retrouve l'ARNm de CLF au niveau de la rate, du thymus, des ganglions lymphatiques, l'appendice, de la moelle osseuse, du placenta, de l'estomac, du cœur, de la thyroïde et des ovaires (Elson *et al.* 1998).

Les séquences de CLF humain et murin sont conservées à 96% (Elson *et al.* 1998) au niveau des acides aminés. CLF serait donc un gène fortement conservé au cours de l'évolution ce qui suggère un rôle fonctionnel important. En effet, les souris déficientes pour cette protéine meurent peu de temps après la naissance et cette mort serait causée par une incapacité à téter (Alexander *et al.* 1999).

Une équipe a identifié chez ces souris CLF^{-/-}, une diminution des neurones moteurs lombaires et faciaux (Forger *et al.* 2003) qui pourrait expliquer l'incapacité à téter. Par contre, une analyse plus détaillée du phénotype de ces souris n'a pas été effectuée. La découverte d'une maladie causée par une inactivation de CLF chez les humains pourrait nous permettre de croire que la cause de la mort de ces souris n'est peut-être pas due à une incapacité physique de téter, mais une absence d'appétit.

2.2.2.4.2 Syndrome de transpiration au froid

Connu sous son nom anglais « cold-induced sweating syndrome » (CISS), cette maladie autosomale récessive est causée par des mutations dans CLF (CISS I) ou dans CLC (CISS II). La première description de cette maladie a été faite par Sohar *et al.* (Sohar *et al.* 1978) chez deux sœurs israéliennes qui répondaient aux environnements à basse température par une forte sudation sur de large partie de leur dos et de leur poitrine. Jusqu'à maintenant six patients, étant atteint d'un syndrome semblable, ont été décrits, dont cinq ayant des mutations au niveau du gène de CLF et un seulement atteint d'une mutation du gène de CLC.

2.2.2.4.2.1 CISS I

C'est seulement en 2003 que la cause de la maladie des deux sœurs israélienne a été découverte (Knappskog *et al.* 2003). Elles possèdent deux mutations homozygotes dans le gène codant pour CLF au niveau du codon 81 (CGC→CAC) et 374 (CTG→CGC). Ces

mutations induisent un changement d'acides aminés R81H et L374R. En plus du problème de transpiration au froid, elles ont aussi des modifications au niveau de la morphologie du visage et du palais, une voix nasillarde, une incapacité d'étendre complètement les coudes et une cyphoscoliose (Knappskog *et al.* 2003).

Le même groupe a aussi étudié le cas de deux frères norvégiens souffrant de transpiration au froid (Knappskog *et al.* 2003). Dès la naissance, ces frères connaissent des problèmes d'alimentation, ils ne têtent pas et doivent être hospitalisés pour être nourris. Ils sont incapables d'ouvrir complètement la bouche, ont une cyphoscoliose sévère progressive, une atrophie musculaire au niveau du dos découverte lors d'une chirurgie, un visage inexpressif dû à une insuffisance de l'activité des muscles faciaux. En plus de ces problèmes physiques, ils ont aussi une insensibilité au froid et à la chaleur. Ils peuvent jouer dans la neige jusqu'à avoir des engelures très sévères et ils peuvent passer leurs mains dans une flamme ou dans l'eau bouillante sans ressentir de douleur. Les analyses génétiques ont démontré qu'ils sont homozygotes pour une délétion de 2 codons (844 et 845) dans le gène de CLF menant à un changement de phase et à une protéine non fonctionnelle (Knappskog *et al.* 2003).

Le dernier cas, une jeune canadienne de 24 ans (Hahn *et al.* 2006; Rousseau *et al.* 2006) souffre de transpiration excessive en réponse au froid, aux sucreries, à l'appréhension et la peur, mais aucune transpiration à la chaleur modérée. Elle montre aussi des anomalies physiques, un visage étroit et un palais arché, une petite stature, une scoliose, une difficulté à étendre complètement les coudes et les doigts. Durant son enfance, elle a eu des difficultés à se nourrir ce qui a même amené à une brève hospitalisation. Lors de l'analyse génétique, deux mutations hétérozygotes (une faux sens et l'autre non-sens) 538C>T et 852G>T sur le gène de CLF a été trouvé, induisant des changements d'acides aminés Q180X et W284C (Hahn *et al.* 2006).

2.2.2.4.2.2 CISS II

Le seul cas connu jusqu'à maintenant du CISS II est un australien étudié pour la première fois à l'âge de 46 ans (Hahn *et al.* 2006). Il a aussi une transpiration excessive au

froid mais aucune au chaud. N'ayant aucun moyen de se refroidir en cas de chaleur, il doit s'asperger d'eau pour éviter l'évanouissement. Étant enfant, il a aussi connu des problèmes de nourritures. Comme les sujets CISS I, il présente des anomalies au niveau du palais, des coudes, du faciès, des doigts, des pieds et souffre d'une scoliose. Lors d'un nouvel examen à l'âge de 72, sa mobilité était réduite par une maladie dégénérative de la colonne vertébrale. Ce patient est hétérozygote pour deux mutations dans le gène codant pour CLC : une mutation au codon 321 (C→A induisant le changement d'acides aminés Y→codon stop) et une substitution au codon 590 (G→T induisant le changement d'acide aminé R197L) (Hahn *et al.* 2006; Rousseau *et al.* 2006). L'analyse plus poussée de ces mutants de CLC *in vitro* a permis de montrer que la première mutation non-sens conduit à une protéine tronquée non sécrétée (avec CLF ou CNTFR α) et non fonctionnelle. La deuxième mutation R197L se situe dans une région du site I essentielle à la liaison au CNTFR α . *In vitro*, le CLC R197L ne se lie plus au CNTFR α . En plus de ces deux mutations, ce patient est hétérozygote pour un variant de CLF (délétion d'un codon CTG entre les bases 73-75). Ce variant représente un polymorphisme commun retrouvé aussi dans la population saine (Rousseau *et al.* 2006).

2.2.2.4.2.3 Implication du complexe CLC/CLF

L'inactivation de CLC ou de CLF menant à la maladie du CISS fournit une forte évidence génétique de l'existence fonctionnelle du complexe CLC/CLF chez l'homme et suggèrent des fonctions uniques à cette cytokine.

Bien que CLC possède des fonctions au niveau neuronal, comme l'indique les symptômes du CISS, cette cytokine possède aussi des fonctions au niveau du système immunitaire. Pourquoi alors, les patients atteints du CISS n'ont-ils pas de phénotypes représentant les fonctions de CLC dans le système immunitaire?

Il est probable que les patients atteints du CISS ne développent simplement pas les symptômes reliés au système immunitaire. En effet, il est rare que des mutations au sein d'une cytokine provoquent un phénotype particulier et soient responsables d'une maladie

(Rousseau *et al.* 2006) Cela est dû à la grande redondance que l'on retrouve entre les différentes cytokines et leurs actions au niveau du système immunitaire. Les phénotypes que l'on retrouve chez ces patients seraient donc attribuables à des fonctions non-redondantes de CLC/CLF.

Les patients atteints du CISS sont caractérisé par plusieurs problèmes de morphologie soit au niveau de la colonne vertébrale soit au niveau du squelette du visage, des bras des mains et des pieds. CLC et CLF joue donc probablement un rôle au niveau du développement musculaire et squelettique embryonnaire.

Il est aussi fort probable que CLC et CLF joue un rôle au niveau de la fonction sudoripare. Les mécanismes anormaux de réponse au chaud ou au froid peuvent aussi provenir d'altération de la thermorégulation au niveau du système nerveux central.

Cependant, certains aspects des phénotypes chez les patients atteints du CISS comme l'insensibilité à la douleur induite par des stimuli thermique semble unique aux patient CLF^{-/-} (Knappskog *et al.* 2003; Rousseau *et al.* 2006) et n'a pas été rapporté chez le patient avec une mutation dans CLC. Ces différences pourraient être dues à des variations inter-individuelles, mais elles pourraient aussi refléter l'implication de CLF dans un autre complexe de cytokine.

2.2.2.5. Activités biologiques

Les activités biologiques de CLC peuvent être divisées sous trois grands axes; activités neurotrophiques, immunitaires et endocrines.

2.2.2.5.1 Activités neurotrophiques

Plusieurs études ont démontré d'importantes fonctions neurotrophiques de CLC. CLC supporte la survie des neurones moteurs et sympathiques embryonnaires (Senaldi *et al.* 1999; Elson *et al.* 2000; Plun-Favreau *et al.* 2001). CLC induit la différenciation des cellules neuroépithéliales fœtales en astrocytes (Uemura *et al.* 2002). Des injections *in vivo* de CLC induisent une augmentation du nombre de neurones au niveau de la moelle épinière

lombaire mais non au niveau brachial ou thoracique (Forger *et al.* 2003). CLC possède aussi des activités neuroprotectrices au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine *in vivo* (Schuettauf *et al.* 2005).

2.2.2.4.2. Stimulation des cellules B

Tout comme l'IL-6 (Akira *et al.* 1993), CLC possède d'importants effets sur les cellules B (Senaldi *et al.* 1999; Senaldi *et al.* 2002). En injection péritonéale, CLC induit une hyperplasie des ganglions lymphatiques montrant de larges follicules secondaires et centres germinatifs due à une expansion du nombre de lymphocytes B (Senaldi *et al.* 1999).

Chez les cellules B murines, CLC stimule directement la production des IgM, IgG, IgA et potentialise la prolifération induite par les anticorps anti-IgM (Senaldi *et al.* 2002). Des souris transgéniques exprimant CLC sous le promoteur de l'apolipoprotéine (exprimée dans le foie) ont été générées (Senaldi *et al.* 2002). Ces souris montrent une hyperplasie des cellules B, un plus grand nombre de cellules B dans la rate, les ganglions lymphatiques ainsi que dans le sang périphérique. Elles présentent une augmentation sérique des concentrations d'IgG, d'IgE, d'IgG2b, d'IgG3, d'anticorps anti-ADN double brins IgM/IgG et d'amyloïde A plasmatique. La mesure des taux d'anticorps spécifiques circulant démontre que la production d'IgM, d'IgA et d'IgE spécifiques d'un antigène est augmentée alors que celle d'IgG2a et d'IgG3 est diminuée (Senaldi *et al.* 2002).

CLC régule donc la stimulation des lymphocytes B et la production d'anticorps en induisant préférentiellement une réponse de type Th2 (Senaldi *et al.* 2002).

2.2.2.4.3. Modulations neuroimmunoendocrines

Plusieurs cytokines de la famille de l'IL-6 ont été impliquée dans l'interface neuroendocrine (Arzt 2001; Auernhammer et Melmed 2001; Auernhammer *et al.* 2004). Des injections *in vivo* de CLC chez la souris induisent une augmentation de la production

de cortisone par l'IL-1 (Benigni *et al.* 1996; Senaldi *et al.* 1999). Selon les résultats de ces expériences *in vitro*, CLC est un stimulateur des fonctions corticotrophes.

2.2.2.5.4 Autres activités de CLC

Récemment de nouvelles études ont été faites sur CLC lui donnant un spectre d'action très large. CLC pourrait donc jouer un rôle au niveau de la pathophysiologie des myélomes multiples. En effet, il a été décrit comme un facteur important de survie et de croissance pour les myélomes humains (Burger *et al.* 2003).

CLC pourrait aussi jouer un rôle au niveau du rein car elle induit l'apparition de structure mature de néphrons exprimant des marqueurs tubulaires et glomérulaires au niveau du mésenchyme métanéphrique de rat (Schmidt-Ott *et al.* 2005).

Enfin, CLC aurait un effet dans le contrôle circadien de l'activité locomotrice en étant un facteur régulateur du passage du repos à l'activité durant une période journalière (Kraves et Weitz 2006).

2.2.3 Interleukine-27 (IL-27)

L'IL-27 tout comme CLC/CLF, peut être classé dans famille de l'IL-12, car c'est un hétérodimère et dans la famille de l'IL-6 et son récepteur utilise gp130. Cette interleukine est composé du récepteur soluble EBI3, originellement décrit comme un facteur sécrété par les cellules B transformé par le virus de l'Epstein Barr (Devergne *et al.* 1996), et de la cytokine à quatre hélices α p28 qui à été découvert grâce à son homologie aux cytokines de la famille de l'IL-6/IL-12 (Pflanz *et al.* 2002). C'est en 2002 que le groupe de Pflanz a découvert l'association entre ces deux protéines (Pflanz *et al.* 2002). p28 possède une série de 13 acides glutamiques consécutifs entre les hélices C et D, une structure observée dans aucune autre des cytokines de la famille IL-6/IL-12.

La voie de signalisation de l'IL-27 passe par un récepteur hétérodimérique qui comprend gp130 et une chaîne appelée TCCR, WSX-1 ou IL-27R. L'IL-27R a été identifié

par un premier groupe par recherche de molécules analogues à gp130 (Sprecher *et al.* 1998) et par un deuxième groupe à partir de leucocytes de sang périphérique et de rate par analogie aux récepteurs de type I (Chen *et al.* 2000). La chaîne IL-27R est un récepteur de type I possédant le module de liaison aux cytokines comprenant les 4 cystéines et le motif WSXWS. La chaîne IL-27R a une structure proche de gp130 et est homologue à l'IL-12R β 2 (Chen *et al.* 2000). Contrairement à gp130 qui est exprimé de façon ubiquitaire (Taga et Kishimoto 1997), l'IL-27R est principalement exprimé sur des cellules du système immunitaire telles que les cellules NK, les Treg, les CD4⁺ naïves et mémoire (Villarino *et al.* 2004) suggérant un rôle de l'IL-27 dans l'immunité innée et adaptative. L'IL-27 est principalement sécrétée par les cellules présentatrices d'antigènes particulièrement les macrophages et les DC. Son expression est rapidement stimulé lors de l'activation des ces cellules (Pflanz *et al.* 2004).

L'IL-27 est surtout connue pour son rôle dans le développement de la réponse Th1, mais il y a de plus en plus de données suggérant qu'elle pourrait aussi inhiber la réponse Th2, lui conférant ainsi des effets pro-et anti-inflammatoires.

2.2.3.1 Effets pro-inflammatoires de l'IL-27

Les premières études ont démontré que l'IL-27 pouvait agir comme une cytokine pro-inflammatoire grâce à sa capacité d'augmenter la production d'IFN- γ de façon autonome chez les CD4⁺ naïves et en synergie avec IL-12 chez les cellules NK humaines (Pflanz *et al.* 2002). Ces propriétés favorisent la réponse Th1. Le développement de la réponse Th1 par l'IL-27 est en partie dû à l'induction du facteur de transcription T-bet qui cible des gènes impliqués dans la réponse Th1, comme l'IFN- γ et IL-12R β 2 (Hibbert *et al.* 2003; Takeda *et al.* 2003). De plus, comme pour l'IL-12, la liaison de l'IL-27 à son récepteur active STAT4 chez les cellules CD4⁺ naïves les amenant à exprimer un phénotype de cellules Th1.

L'activation des cellules T résulte en un rétrocontrôle négatif sur l'expression de IL-27R, (Chen *et al.* 2000) et ces résultats suggèrent un modèle dans lequel l'IL-27 pourrait sensibiliser les CD4⁺ naïves à la polarisation Th1 de l'IL-12 (Robinson et O'Garra 2002).

Des études sur des souris déficientes pour l'IL-27R, ont révélé que l'IL-27 est requise pour l'initiation précoce de la réponse Th1, et que ces souris ont une plus grande susceptibilité aux infections provoquées par des pathogènes intracellulaires tel que *Leishmania major* (Yoshida *et al.* 2001; Artis *et al.* 2004) et *Listeria monocytogenes* (Chen *et al.* 2000). Cependant, durant une infection chronique de *Leishmania major*, les souris déficientes en IL-27R ou en EB13 sont capable de développer une réponse suffisamment efficace pour contrôler la réplication du parasite (Artis *et al.* 2004; Zahn *et al.* 2005). De plus, lorsqu'elles sont soumises à une mycobactérie non virulente (bacillus Calmette Guérin) (Yoshida *et al.* 2001) ou durant une infection chronique par *Mycobacterium tuberculosis* (Pearl *et al.* 2004; Holscher *et al.* 2005) les souris déficientes en IL-12R génèrent une réponse Th1 comparable aux souris de type sauvage.

L'ensemble de ces études semble démontrer que l'IL-27 serait importante au niveau de l'initiation et non pas au niveau du maintien de la réponse Th1.

2.2.3.2 Effets anti-inflammatoires de l'IL-27

Des études plus récentes sur les souris déficientes en IL-27R suggèrent, contrairement à ce que montre les premières études, que le rôle principal de l'IL-27 *in vivo* ne serait pas de déterminer la polarité (Th1/Th2) de la réponse des cellules CD4⁺, mais de moduler l'intensité de l'inflammation induite par les pathogènes.

L'infection des souris IL-27R^{-/-} avec *Toxoplasma gondii*, *Trypanozoma cruzi* ou *Mycobacterium tuberculosis* amène une exagération de la réponse inflammatoire avec une augmentation de la prolifération des cellules CD4⁺ et une production accrue de cytokines pro-inflammatoires tel que IFN- γ , IL-4, TNF- α et IL-6 conduisant à une maladie inflammatoire létale (Hamano *et al.* 2003; Villarino *et al.* 2003; Holscher *et al.* 2005). L'IL-27 aiderait donc à atténuer la réponse inflammatoire induite par l'infection. De même,

dans un modèle murin d'hépatite, les souris IL-27R^{-/-} sont plus sensibles à la maladie avec une hyperproduction d'IL-4, d'INF γ et de cytokines pro-inflammatoires par les NKT (Yamanaka *et al.* 2004). La réponse de type Th2 dans les souris IL-27R^{-/-} est exagérée suite à une infection par des helminthes laissant supposer un rôle inhibiteur dans la réponse Th2 au niveau de la prolifération des lymphocytes T et de la production des cytokines de type Th2 (Artis *et al.* 2004).

L'addition d'IL-27 recombinant chez les cellules T naïves en culture sous des conditions de polarisation Th2, résulte en une diminution du « GATA-Binding protein 3 » (GATA-3), un facteur de transcription important dans la réponse Th2 (Lucas *et al.* 2003). En parallèle avec la diminution de GATA-3, se produit aussi une diminution de l'IL-4, une cytokine impliquées dans la réponse Th2.

Ces résultats suggèrent que IL-27 joue un rôle dans la limitation de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire innée et adaptative en modulant la stimulation de la réponse Th1 et l'inhibition de la réponse Th2.

Hypothèse et objectif

Comme nous l'avons déjà mentionné, les cytokines possèdent un intérêt important en étant de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de diverses maladies. La compréhension de leurs fonctions est donc devenue une composante essentielle de la recherche.

Pour ce projet, nous voulions établir si la protéine CLF, participant au complexe CLC/CLF pouvait être impliquée dans la formation d'une autre cytokine. Cette hypothèse nous est venue de la différence de phénotype entre les patients CISS I et CISS II.

L'objectif de ce projet sera donc de découvrir si CLF peut interagir avec d'autre partenaire que CLC, et si oui, de caractériser le mode d'action de cette nouvelle cytokine.

Article

IL-27 p28 subunit forms a secreted complex with CLF activating NK cells¹

Angélique Guay-Giroux², Dorothee Duluc³, Sandrine Crabé², Marie-Ève Poupart², Simon Blanchard³, Isabelle Cognet³, Greg Elson⁴, Hugues Gascan³, François Rousseau^{3,5}, Sylvie Chevalier³, Pascale Jeannin³ and Jean-François Gauchat^{2,6}

²Département de Pharmacologie, INSERM U743, Université de Montréal, Montréal, Canada; ³INSERM U564, CHU Angers, Angers, France and

⁴NovImmune, Geneva, Switzerland.

⁵Present address : Genentech Inc, 1 DNA way, South San-Francisco, USA

Running title : The composite cytokine p28/CLF activates NK cells

¹This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (MOP-57832). J.F.G. is a Canada Research Chair recipient.

⁶ Address correspondence to Dr Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, C.P 6128, succursale Centre-ville, Montréal QC H3C 3J7, Canada.

E-mail : [information retirée / information withdrawn]

⁷Abbreviations used in this paper: CISS, cold induced sweating syndrome; CLC, cardiotrophin-like cytokine; CLF, cytokine-like factor 1; CNTF, ciliary neurotrophic factor; EB13, Epstein-Barr virus-induced gene 3;

Contribution des auteurs

Toutes les constructions de vecteur, les expériences de co-immunoprécipitation, les purifications de protéines et les expériences de liaison ont été faites à Montréal principalement par la première auteure. Toutes les expériences utilisant des cellules primaires humaines ont été faites par nos collaborateurs d'Angers avec notre cytokine purifiée et la première auteure a assisté à plusieurs de ces expériences lors d'un stage de 6 semaines dans leur laboratoire.

Abstract

IL-27 belongs to a growing family of composite cytokines formed by the interaction between cytokine subunits and soluble cytokine receptors, also comprising IL-12, IL-23, p35/EBI3 and CLC/CLF. Multiple activities have been described for IL-27, such as the capacity to co-activate naïve CD4⁺ T, NK and B cells. Studies on the roles of IL-27 in mice indicate a mix of pro and anti-inflammatory functions. IL-27 comprises a cytokine subunit p28, bound to a soluble cytokine receptor, EBI3. The IL-27 p28 subunit closest known homologue, cardiotrophin-like cytokine (CLC), is secreted as a complex with the soluble cytokine receptor CLF. As p28 and CLF mRNA are co-expressed by activated dendritic cells (DC), we tested if the two proteins could form an alternative composite cytokine. Co-transfection experiments indicate that p28 and CLF can form a stable, secreted complex. The p28/CLF complex did not bind or activate the IL-27 receptor (formed by gp130 and IL-27R) or the CLC/CLF receptor (formed by CNTFR α , gp130 and LIFR β). Accordingly, we failed to observe activation of cell lines responsive to CLC/CLF or IL-27 in response to p28/CLF. Unlike IL-27, p28/CLF did not activate naïve CD4⁺ T cells. Screening for p28/CLF biological activities on human immunocompetent cells showed that the composite cytokine strongly increased IFN- γ production by IL-2 or IFN- γ activated NK cells. However, no effect on NK cytotoxicity was observed. This new composite cytokine could therefore participate in the cross-talk between DC and NK cells and have therapeutic applications in pathologies in which selective NK cell activation would be beneficial.

Introduction

IL-27 is a composite cytokine of the IL-6/IL-12 family formed by the association of a four helix bundle cytokine, p28 with a soluble cytokine receptor, Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) (Pflanz et al., 2002). IL-27 is produced by activated antigen presenting cells (Pflanz et al., 2002) and signals through a receptor complex formed by IL-

27R (also named WSX-1 or T cell cytokine receptor) and CD130 (gp130) (Pflanz et al., 2004). IL-27R is mainly expressed by immunocompetent cells and IL-27R^{-/-} mice are viable and fertile (Taga and Kishimoto, 1997; Yoshida et al., 1996; Sprecher et al., 1998; Chen et al., 2000; Pflanz et al., 2004; Villarino et al., 2005; Murakami et al., 2004; Murakami et al., 2004). *In vitro*, IL-27 has multiple and contrasting biological activities, such as the capacity to sustain activation of naïve CD4⁺ T cells, to promote differentiation of T cells in Th1, to limit IL-2 production by T cells, to suppress the development of Th-17 cells, to increase CD8 T cell effector capacity, to support activation of NK cells, to modulate B cell immunoglobulin class switching and mast cell activation. (Pflanz et al., 2002; Lucas et al., 2003; Kamiya et al., 2004; Morishima et al., 2005; Yoshimoto et al., 2004; Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006; Pflanz et al., 2004; Owaki et al., 2006; Villarino et al., 2006). Whereas initial analysis of the functions of IL-27 *in vivo* using mice deficient for IL-27R pointed toward a role of the cytokine in Th1 differentiation, more recent analysis indicate an important function in controlling the extent of Th1, Th2 and Th-17 immune response *in vivo* during acute or chronic infection as well as inflammation (Chen et al., 2000; Yoshida et al., 2001; Villarino et al., 2003; Hamano et al., 2003; Artis et al., 2004; Rosas et al., 2006; Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006; Pearl et al., 2004). Inactivation of EBI3 in mice indicates a non redundant role of composite cytokines comprising this soluble cytokine receptor (i.e. IL-27 and p35/EBI3 (Devergne et al., 1997; Pflanz et al., 2002)) in Th2 and Th1 responses *in vivo* and results in a marked decrease in invariant NK T cells (Nieuwenhuis et al., 2002; Zahn et al., 2005). Neutralisation of IL-27 *in vivo* using anti-p28 antibodies has been reported to suppress adjuvant-induced arthritis and ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Goldberg et al., 2004b; Goldberg et al., 2004a). These observations made with the anti-p28 antibodies are at odd with recent observations of EAE exacerbation in IL-27R deficient mice and the effect of IL-27 injection in the EAE model remains to be determined (Batten et al., 2006).

The IL-27 p28 subunit is evolutionary related to IL-11 and cardiotrophin-like cytokine (CLC; also referred to as novel neurotrophin-1, B-cell stimulating factor-3 or CLCF1 (Shi et al., 1999; Senaldi et al., 1999; Pflanz et al., 2002)). Like IL-27, CLC form a composite cytokine with a soluble cytokine receptor partner, CLF (also named NR6 or CLRF1; (Alexander et al., 1999)) (Elson et al., 2000; Elson et al., 1998). This composite cytokine, CLC/CLF is a ligand for the ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR) (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001). Studies in mice deficient for CLF indicate nonredundant CLC/CLF functions in nervous system development (Alexander et al., 1999; Forger et al., 2003). Recently, patients with mutations in the genes coding for CLF and CLC have been identified (Knappskog et al., 2003; Rousseau et al., 2006). Inactivation of either CLF or CLC leads to “cold induced sweating syndrome” (CISS), providing a strong genetic evidence for the functional relevance of the CLC/CLF complex in human development. However, some aspects of the phenotypes of CISS patients such as the insensibility to pain induced by noxious thermal stimuli seem unique to CLF^{-/-} patients and have not been reported for the patient with a mutation in CLC (Knappskog et al., 2003; Rousseau et al., 2006). Whereas this difference could be explained by inter-individual variation, it could also reflect the involvement of CLF in other composite cytokines. This prompted us to examine if CLF could form a complex with cytokines other than CLC. Our results indicate that both human and mouse IL-27 p28 subunits can form stable, secreted complexes with CLF. Analysis of the properties of this new complex indicates that p28/CLF differs from both CLC/CLF and IL-27. It does not bind CNTFR or IL-27R and does not appear to exhibit the broad range of biological activities of IL-27. Current results indicate that p28/CLF activates human and mouse NK cells.

Material and Methods

Plasmid constructions

To produce a bicistronic vector encoding for protein C epitope tagged p28 and Flag tagged p28, the human p28 full-length cDNA (IRAU969H1198D; RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin, Germany) was amplified by PCR with the primers: 5'-AAGCTAGCGCCACCCATGGGCCAGACGGCAGGCGA-3' and 5'-CCACCTGGTCCTCGGGCTGGGGCTCAATGTT-3' and cloned into PCR2.1 TOPO using a TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) following the manufacturer's instruction. The amplified p28 fragment was fully sequenced using an ABI-PRISM 3100 AVANT genetic analyser (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada) and re-cloned in pcDNA5hCLCprotCiresCLF (Cognet et al., 2005) by removing the CLC cDNA using the *NheI* and *SexAI* restriction enzymes. The CLF cDNA was modified by introducing a sequence coding for a FLAG epitope (DYKDDDD) at the COOH terminus of the protein. This construction called pcDNA5 p28protCiresCLFflag was used to generate pcDNA5 derivatives coding for either p28protC or CLFflag alone by recloning the *NheI*-*HindIII* restriction fragment coding for p28protC or the *KpnI*-*XhoI* the restriction fragment coding for CLFflag in the corresponding restriction sites of the pcDNA5/FRT (Invitrogen).

To generate a bicistronic vector encoding for mouse p28 and mouse CLF, the mouse p28 cDNA (RIKEN clone I830047N17, Dnaform, Tsukuba, Ibaraki, Japan) was amplified by PCR using a mix of the primers 5'-TAGCTAGCGTCGACACCATGGGCCAGGTGACAGGAGA-3' (400 nM), 5'-ATGTACACTACTTACCATCGATTAACCGTGGATCTACTGATCTTCGGAATCCCAGGCTGAGCCTG-3' (20 nM) and 5'-GGAATCCCAGGCTGAGCCTG-3' (400 nM) and cloned between the *NheI* and *BsrGI* of the bicistronic expression vector pcDNA5mCLCprotCAvitagmCLF (Cognet et al., 2005). The sequence coding for the Flag epitope tag was introduced by cloning the synthetic DNA fragment 5'-GATCCTGCCCTCGGGCAGACGGGGTGCGGCGAGAGGTCCTGCCGGCTAAACTCGACTACAAAGACGATGACGACAAGTGA-3' between the restriction site *BamHI* of the CLF cDNA and *XhoI* of the pcDNA5 vector. The bicistronic expression vector pcDNA5mP28protCIRESmCLFflag was verified by DNA sequencing. To generate a

monocistronic pcDNA5 derivative encoding for mp28 the segment of the vector pcDNA5mP28protCIRESmCLFflag coding for the IRES and mCLFflag was deleted using the restriction enzymes *BsrGI* and *PmeI*. To produce a monocistronic derivative coding for mCLFFlag, the mP28 cDNA was deleted from the vector pcDNA5mp28protCIRESmCLFflag using the restriction sites *NheI* and *BsrGI*.

A pcDNA5 derivative encoding human IL-27R (pcDNA5IL-27R) was produced by re-cloning full length IL-27R cDNA (Accession number NM_004843; Origene Technologies Inc, Rockville, MD, USA; AC# NM_004843) in the *NotI* restriction site of pcDNA5.

P28 site directed mutagenesis

The p28 cDNA was subjected to site directed mutagenesis using a QuickChange™ Multiple Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions and fully sequenced. The mutated fragment was introduced in the plasmid pcDNA5mP28protCIRESmCLFflag.

Generation of stable transfectants

Each plasmid were cotransfected with the Flp recombinase coding plasmid pOG44 (Invitrogen) in the HEK-293 derivative Flp-In™-293 (Invitrogen) using the lipofection agent Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Transfected clones were selected using hygromycin (100 µg/ml, Invitrogen) and characterised by immunoprecipitation and Western Blot analysis or flow cytometry (pcDNA5hIL-27R).

Immunoprecipitations and Western Blotting

Cells expressing human or mouse p28protC, CLFflag, p28prot/CLFflag or GFP were grown in DMEM complemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin (all from Invitrogen) in 175 cm² culture flask (Sartsted, Montreal, QC, Canada). Supernatants were collected and concentrated 20 times on centrifugal filtration units (Amicon-Ultra, Millipore, Bedford, MA, USA). Supernatants were then incubated overnight at 4°C with 10 µl anti-protein C agarose (Roche Applied Sciences, Laval, QC, Canada) or 20 µl anti-FLAG M2-agarose (Sigma). Following extensive washing the precipitates were separated by SDS- PAGE before being transferred on a Immobilon-P membrane (Millipore). Membranes were then probes with HRP-conjugated anti-protein C (Roche Applied Sciences) or anti-FLAG (M2; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and visualized by ECL (Pierce, Biolynx, ON, Canada).

Recombinant protein purification

For the production of the mp28/CLF or hp28/CLF complexes, transfectants cells were expanded in DMEM supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin and 100 µg/ml hygromycin (all from Invitrogen) to confluence. Confluent cells were maintained for one week in DMEM supplemented with 1% FBS. Cell culture supernatants were pooled. Batches of supernatants (3L) were filtered and concentrated by centrifugation (Centricon-Plus-70, Millipore) and the complexes were purified by affinity chromatography on a one ml anti-protein C agarose (Roche Applied Sciences). Purified proteins were dialysed against RPMI 1640 medium (Invitrogen). LPS concentration was determined using limulus amebocyte lysate test (Cambrex) and was never greater than 0.1 ng/ug (1 EU/ug). Protein concentration was determined by SDS-PAGE and Coomassie blue staining using BSA as standard.

Proliferation assays

Ba/FIII (Ba/F3 cells transfected with the tripartite CNTFR i.e. CD130, hLIFR β and hCNTFR α) or Ba/FII (Ba/F3 cells transfected with the two CNTFR transducing signalling subunits CD130 and LIFR β) (A kind gift from Dr. K. J. Kallen, Christian Albrechts Universität zu Kiel, Germany; (Kallen et al., 1999).were maintained as described (Elson et al., 2000) The cells (5×10^3 cells/well in 96 well plates) were incubated in triplicates with indicated dilutions of the recombinant proteins for 72 h in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. Proliferation was measured using a fluorometric assay (Alamarblue; Serotec, Cederlane, ON, Canada). The fluorescence of cultures medium was measured at 590 nm (excitation wavelength, 530 nm) with a Wallac Victor² 1420 Multi-label Microplate Reader (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Woodbridge, ON, Canada). Mouse CNTF and CLC/CLF were produced and purified as described elsewhere (Cognet et al., 2005;Cognet et al., 2004) and used as controls for the proliferation assay.

Isolation of mouse splenocytes and NK

Spleen from female C57BL/6 mice (6-8 weeks) were isolated and disrupted by mechanical dislocation. Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation on Histopaque® (Sigma-Aldrich). NK cells were isolated with the EasySep mouse panNK selection kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) according to the manufacturer's instruction. Enrichment of the recovered NK cells was confirmed by flow cytometric analysis (FACScalibur cytofluorometer; BD Biosciences Mississauga, ON, Canada) and was routinely greater than 80%.

Human cell purification and DC generation.

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by standard density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). CD14⁺ monocytes were isolated by positive selection from PBMC using MACS technology,

according to the manufacturers' instructions (Miltenyi Biotec). Cells were cultured in culture medium (CM) consisting in RPMI 1640 medium (Biowhittaker Cambrex, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Biowhittaker Cambrex). Immature dendritic cells (DC) were differentiated from monocytes cultured for 5 d in CM at 10^6 cells/ml in the presence or absence of 20 ng/ml IL-4. At day 4 DC were activated or not for 8 h either with 20 ng/ml LPS (Sigma, St Louis, MO). For RT-PCR experiment, Briefly, total cytoplasmic RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen Life Technologies), treated with RNase-free DNase (Promega), and reverse transcribed using the Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) following the manufacturer's recommendations. PCR amplification was performed with an amount of cDNA corresponding to 50 ng of starting total RNA (5 min at 94°C followed by 30 cycles (30 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 1 min at 72°C) followed by a final extension of 7 min at 72°C). The primer sequences used for PCR are : hp28, sense 5'-GCGGAATCTCACCTGCCA-3', antisense 5'-GGAAACATCAGGGAGCTGCTCT-3' hCLF, sense 5'-GGATCAGGAGCCCACACAGC-3', antisense 5'-AGCGGCAGGTCAAGTCCTTC-3'. RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA. Amplified fragments were size-separated by electrophoresis and visualized by ethidium bromide.

Human NK cell purification and activation.

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy volunteers by standard density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). CD3⁻ CD56⁺ NK cells were purified from PBMC by positive selection using the MACS technology (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) followed by fluorescence-activated cell sorting (FACS; FACSaria[®] cytofluoromètre, Beckton Dickinson, Erembodegen, Belgium) using FITC-labeled anti-

CD3 and PE-labeled anti-CD56 mAbs (both from BD Biosciences, San Jose, CA) as previously described.(Chalifour *et al.* 2004) Throughout the study the purity of the NK cell populations used was > 99%. Cells were cultured in complete medium consisting in RPMI 1640 medium (Biowhittaker Cambrex, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids, 10 mM Hepes, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Biowhittaker Cambrex) at 10^6 cells/ml. NK cells at 1×10^6 cells/ml were stimulated with 50 ng/ml hp28/CLF in the absence or presence of 20 or 200 U/ml IL-2, 5 or 25 ng/ml IL-12 (both from R&D Systems, Abington, UK) for 48 h in 48-well plates (Costar, Cambridge, MA). IFN- γ was then quantified in the cell free supernatants using capture and detection Abs from Mabtech AB (Stockholm, Sweden, sensitivity 4 pg/ml).

LDH release cytotoxicity assay

After overnight pre-treatment with IL-2 (1000U/ml), IL-2 (25U/ml)/p28/CLF (100ng/ml) or IL-2 (25U/ml)/IL-27 (100ng/ml), CD56+ NK at 1×10^6 cells/ml were added to target cells (K562) in a 96-well U-bottom plates at effector/target indicated. The final volume was 200ul per well. The plates were incubated for 4 h (37°C, 5% CO₂). After centrifugation at 250 x g/5min, 50 ul aliquots of the supernatants were withdrawn and the content of LDH, released from the target cells, was measured with Cyto Tox96 kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturers instruction.

Analysis of cell surface activation markers

Cell surface expression of activation marker (CD69 and CD54) on NK after treatment. I was determined using FACS analysis. Cells were incubated 24h or 48 h with or without IL-2 (20U/ml) and p28/CLF (50ng/ml) The cells were stained with FITC-labeled anti-CD69 mAb or PE-labeled anti-CD54 (Serotec, Kildington, United Kingdom). Results are

expressed in mean fluorescence intensity (MFI) after subtracting the MFI obtained with the control antibody.

Cytokine binding assays

Flp-inTM-293 transfected with the pcDNA5/FRT derivatives coding for CNTFR α were assessed for receptor expression using anti-CNTFR α (Elson et al., 2000; Plun-Favreau et al., 2001) as described previously (Cognet et al., 2005). Transfectants expressing IL-27R were tested stained using anti-IL-27R or isotype control and the signal revealed with goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 633 (1/500, Molecular Probes, Invitrogen). Fluorescence was measured by flow cytometry using a FACSCaliburTM cytofluorometer (BD biosciences).

For the cytokine binding assays, Ba/FIII, Ba/FII, CNTFR α and IL-27 expressing Flp-inTM-293 cells were incubated for 1 h on ice with concentrated supernatants from cells expressing either p28protC/CLFflag or purified p28proC/CLFflag, CLCprotC/CLF, CNTFprotC (1 μ g/ml). The binding was then revealed with mouse anti-ProtC (5 μ g/ml) and goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 633. Dead cells were excluded by propidium iodide staining (1 μ g/ml). Fluorescence was assessed by flow cytometry.

Western blot analysis of STAT3 phosphorylation in TF-1 or EB1

The TF-1 cell line was expanded in RPMI 1640 supplemented with 2 ng/ml human GM-CSF and 10% FCS. The EB1 cell line was maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. The two cell lines were starved overnight and activated 10 minutes at 37°C with 500 ng/ml of hp28/CLF, LIF or CNTF produced as described (Elson et al., 2000; Cognet et al., 2005). Reaction was stopped by the addition of ice-cold PBS. Cells were harvested and resuspended in lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 40 mM β -glycerophosphate, 5 mM EDTA, 1% Triton) and subjected to Western blot analysis using anti-phospho STAT3 (Y705) and anti-phospho Stat1 (Y701) Abs (Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Membranes were stripped overnight in 0.1 mM glycine-HCl pH 2.78, and re-probed with Abs specific for STAT3 and STAT1. (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Signals were revealed by ECL.

Measurement of STAT1 and 3 activations by flow cytometry

Mouse splenocytes were starved for 2 hours in RPMI 1640 and activated 15 min at 37C° with mIL-27 (R&D systems) or mp28/CLF. For FACS analysis, cells were washed twice in cold PBS and resuspended in PBS (final concentration at 5 x10⁶/ml). Cells were fixed with the addition of one volume of cytofix (BD Bioscience) for 10 min at 37C°, centrifuged, resuspended in ice-cold Perm-III (1ml/10⁶ cells; BD Bioscience) and incubated on ice for 30 min. After two washes in PBS 1% BSA, cells were rehydrated in PBS, 1% BSA, 0.02% Azide for 1h on ice, stained with either Alexa Fluor 647-labelled anti-phospho-STAT1 (Y701) or PE-labelled anti-phospho STAT3 (Y705) for 30 min at room temperature, washed and fluorescence analysed by flow cytometry.

Results

Co-expressed IL-27 p28 subunit and CLF form a secreted complex

The soluble cytokine receptor CLF forms a secreted complex with the cytokine CLC (Elson et al., 2000). To evaluate if it could form an analogous complex with other cytokines of the IL-6 family, we generated stable transfectants expressing epitope-tagged derivatives of the cytokines and CLF alone or in combination in the human embryonic kidney fibroblast cell line HEK-293. The culture medium was subjected to immunoprecipitation with tag-specific mAbs coupled to resin and analysed by Western blotting. When culture medium from transfectants co-expressing derivatives of IL-27 p28 subunit (p28 protC) and CLF (CLFflag) was immunoprecipitated with beads coupled to the

anti-protC mAb recognizing the p28 epitope tag and the purified fractions assayed by Western blot with an anti-flag mAb, we detected CLFflag. This indicated the presence of a p28/CLF complex in the cell culture medium (Fig. 1A). This p28/CLF complex could also be identified using beads coupled to anti-flag and Western blot analysis with anti-protC mAb (Fig. 1A).

The formation of a complex with a soluble cytokine receptor is necessary for CLC secretion when the cytokine is expressed in transfectants *in vitro* (Elson et al., 2000; Plun-Favreau et al., 2001) and the similarity of the phenotype of CISS patients with mutations in CLC and CLF suggests that this interaction is also occurring *in vivo* in human (Knappskog et al., 2003; Rousseau et al., 2006). Analysis of the HEK-293 human and mouse p28 transfectants culture medium by immunoprecipitation and Western blot indicate that whereas p28 forms a complex when co-expressed with CLF, secretion occur in the absence of the soluble cytokine receptor (Fig. 1A and data not shown), in line with previous reports indicating secretion of mouse p28 in the absence of EB13 (Pflanz et al., 2002).

To investigate if an equivalent complex could form between mouse p28 and CLF, we generated transfectants co-expressing mouse p28protC and mouse CLFflag and analysed their culture medium for mouse p28/CLF complexes by immunoprecipitation and Western blot. Similar to their human orthologs, mouse p28 and CLF could be co-immunoprecipitated as a complex (data not shown).

IL-27p28/CLF complex involves p28 cytokine binding site III

Cytokines of the IL-6 family which activates tripartite receptors, such as CLC, interact successively with the receptor chains through three binding sites numbered from 1 to 3 by analogy with growth hormone (de Vos et al., 1992; Bravo and Heath, 2000). The binding site I is involved in the formation of the initial complex with the receptor alpha chain, binding site 2 in the interaction with CD130 and site 3 in the recruitment of the second receptor signalling chain, represented by LIFR β in the case of CLC (de Vos et al.,

1992;Bravo and Heath, 2000;Perret et al., 2004). We analysed previously the binding sites of CLC by mutagenesis and showed that, whereas binding site 1 was, as expected involved in the interaction with CNTFR α , formation a complex with CLF was mediated trough binding site 3 (Perret et al., 2004). We used a similar mutagenesis strategy to investigate if p28 was, like CLC, interacting with CLF through binding site 3. Based on the previous CLC sites 1 and 3 mutagenesis (Perret et al., 2004) and the alignment of CLC and p28 amino acid sequences (Fig. 1B), we replaced the codons coding for p28 site I W97 and site 3 W197 with codons coding for alanine in the cDNA derivative coding for the protein C epitope tagged cytokine. These mutated p28protC were co-expressed with CLFflag, and the formation of complexes assessed by immunoprecipitation and Western blot analysis (Fig. 1A). Co-immunoprecipitation was abolished in binding site 3 A197W mutant (Fig. 1A). This indicates that p28/CLF complex (Fig. 1A), like CLC/CLF (Perret et al., 2004) represent unusual interactions between cytokine binding site 3 and a soluble cytokine receptor. The observation that the p28-CLF co-immunoprecipitation could be specifically prevented by a single amino acid substitution in binding site 3 supports that the complex observed is specific (Fig. 1A). We did not further investigate the specificity of p28/CLF interaction using transfection with cDNA coding for other putative soluble cytokine receptor partners as such study has been reported previously using comparable HEK-293 transfectants to test if hp28 binds with IL-11 receptor or IL-12p40 (Pflanz et al., 2002).

The mRNA coding for p28 and CLF are co-expressed in activated monocyte-derived dendritic cells (DC)

As a first step to investigate if the p28/CLF can be produced by immunocompetent cells we used RT-PCR to assess for parallel mRNA expression. Expression of IL-27 mRNA has been previously observed in activated antigen-presenting cells such as DC (Pflanz et al., 2004). As shown in Fig. 2, LPS activated human DC, contrary to non

activated human DC, express the mRNA coding for both p28 and CLF, indicating that these cells have the potential to secrete the p28/CLF complex, although the RNA synthesis does not prove the protein expression.

The p28/CLF complex does not bind or activate the CNTFR

Our search for a second CLF cytokine partner was initiated by the dissimilarity between the phenotypes of CISS patient with mutations inactivating CLF or CLC (Knappskog et al., 2003; Rousseau et al., 2006), which could reflect the involvement of CLF in another neurotrophic composite cytokine. We therefore investigated if p28/CLF represented, like CLC/CLF, a ligand for the CNTFR. To evaluate binding to CNTFR α , we used stable HEK-293 cells transfectants expressing this receptor α chain (Cognet et al., 2005). When transfectants were incubated with epitope-tagged p28/CLF and the binding was revealed using APC-labelled anti-protein C mAb, no signal could be detected (Fig. 3A). We next investigated if CLC could induce a biological response through the CNTFR using a derivative of the IL-3 dependent Ba/F3 cell line rendered responsive to CNTFR ligands by transfection with the cDNA coding for CNTFR α , CD130 and LIFR β (Kallen et al., 1999). Whereas a specific proliferation was observed when the cells were cultivated in the presence of CNTF or CLC/CLF, the cells failed to expand in response to p28/CLF (Fig. 3B). These results indicate that p28/CLF is not a third human CNTFR ligand.

The p28/CLF complex does not bind to the IL-27R or activates IL-27R expressing cells

IL-27 activates a receptor formed by a unique chain IL-27R and CD130, the signalling chain common to the IL-6 family receptors (Pflanz et al., 2004). IL-27R is sufficient for binding to the composite cytokine (Pflanz et al., 2002). The formation of a complex between p28 and EB13 is required for receptor recognition and neither p28 nor

EBI3 alone bind to IL-27R (Pflanz et al., 2002). We investigated if CLF could substitute for EBI3 in forming an alternative complex which would bind to IL-27R. We generated HEK-293 cells transfectants over-expressing IL-27R. Expression of the receptor was verified using a specific anti-IL-17R Ab (Fig. 4A). When these cells were incubated with concentrated culture medium containing epitope-tagged p28/CLF complex or the composite cytokine purified by immunoaffinity chromatography, no binding could be revealed using either anti-proteinC or anti-flag mAbs, respectively specific for the epitope tags of p28 and CLF (Fig. 4A). To investigate the capacity of p28/CLF to induce signalling through IL-27R, we used the TF-1 cell line, which express low levels of IL-27R and in which STAT3 phosphorylation can be induced by the cytokine (Fig. 4B). No response could be detected in response to p28/CLF (Fig. 4B) by Western blot using anti-phospho-STAT3 Ab.

The functional IL-27R is broadly expressed in the immune system and, accordingly, its activation lead to tyrosine phosphorylation of STATs, notably STAT1 and STAT3 in a large number of different immune cells (Takeda et al., 2003; Hibbert et al., 2003; Pflanz et al., 2004). To investigate more directly if IL-27 and p28/CLF have different cellular targets, we compared the phosphorylation of STAT1 and STAT3 in unfractionated mouse spleen cells stimulated for 15 minutes with identical concentrations of mouse p28/CLF or mouse IL-27. Analysis of STAT1 and STAT3 intracellular phosphorylation by phosphospecific flow cytometry (Hibbert et al., 2003) using mAbs specific for phospho-STAT1 (Y701) and phospho-STAT3 (Y705) indicated a marked increase of both STAT1 and STAT3 phosphorylation in a large fraction of the splenocytes in response to IL-27 (Fig. 4C). Such response was not detected in cells incubated with an identical concentration of p28/CLF (Fig. 4C).

The p28/CLF complex activates human NK cells

The analysis of STAT1 and STAT3 phosphorylation in response to p28/CLF suggests that immune cells express the p28/CLF receptor only upon activation or that the

p28/CLF responsive subset represent only a small fraction of splenocytes (Fig. 4C). This data together with the observation that activated DC express the mRNA coding for both p28 and CLF (Fig. 2) prompted us to test if NK cells, a population of immune cells well known to be involved in cross-talk with DC (Walzer et al., 2005; Zitvogel et al., 2006), could respond to the composite cytokine. Human NK cells were isolated by magnetic beads cell sorting and incubated with p28/CLF alone or in combination with IL-2 or IL-12 and the production of IFN- γ was measured by ELISA. Whereas no production of IFN- γ was detected when the NK cells were incubated with p28/CLF alone for 48 hours, a clear up-regulation of the response induced by IL-2 or IL-12 was reproducibly observed (Fig. 5A). The effect detected was dose dependant (Fig. 5B). We analysed the effect of the composite cytokine on the expression of the NK activation markers CD54 and CD69 and observed that it was up-regulated on NK cells activated with IL-2 (Fig. 5C). We next investigated if p28/CLF could also modulate perforin/granzyme-B mediated NK cells cytotoxic activity using K562 as target, as these cells have been shown to be killed mainly by this pathway (Zamai et al., 1998). No increase in the capacity of the IL-2 stimulated NK cells to kill target cells *in vitro* could be observed (Fig. 6).

Discussion

We observed that the p28 subunit of IL-27 could form a new secreted composite cytokine with the soluble cytokine receptor CLF. Mutagenesis studies indicate that the formation of the p28/CLF complex involves the cytokine binding site 3, as previously observed for CLC/CLF (Perret et al., 2004).

Our study was initiated with the hypothesis that p28/CLF could represent, together with CLC/CLF a secreted ligand for the tripartite CNTF. Comparison between CNTF, CLC/CLF, and p28/CLF binding properties and biological activities on CNTFR expressing cells failed to indicate that p28/CLF is a CNTFR ligand, rendering rather unlikely that p28/CLF share neurotrophic activities with CNTF or CLC/CLF (Sendtner et al., 1994; Sleeman et al., 2000; Elson et al., 2000).

We therefore investigated if p28/CLF could represent a second ligand for the IL-27R. Binding to the IL-27R or induction of IL-27R mediated STAT1 and STAT3 phosphorylation was not observed with p28/CLF. These results confirmed previous studies demonstrating that the two subunits of the IL-27 composite cytokine, p28 and EBI3 are required for IL-27R binding and activation (Pflanz et al., 2004) and indicated that CLF could not substitute for EBI3, even if the two proteins are structurally related (Alexander et al., 1999).

Comparison between mouse IL-27 and p28/CLF for the capacity to induce STAT1 and STAT3 phosphorylation in mouse splenocytes further supported the conclusions that IL-27 and p28/CLF have different receptors: unlike IL-27, p28/CLF did not directly activate JAK/STAT signalling in a significant portion of the cells of this secondary lymphoid organ. This suggests that p28/CLF, unlike IL-27, has a limited immune cell target population or that it acts on activated cells only.

Previously reported studies on IL-27 mRNA expression pattern indicate that, whereas IL-27 has a large panel of cellular targets and biological activities, its production is restricted to activated antigen presenting cells such as monocytes and DC (Pflanz et al., 2004). We observed that activated monocyte-derived DC could also express mRNA coding for CLF and have therefore the potential to secrete p28/CLF. We attempted to demonstrate directly p28/CLF complex production by activated DC using an ELISA generated by combining commercial anti-p28 and in-house generated anti-CLF mAbs. This ELISA gave a positive result with activated DC culture medium. Unfortunately, control experiments with stable transfectants producing CLC/CLF indicated that this ELISA could not discriminate between CLC/CLF and p28/CLF (data not shown).

The observation that activated DC express mRNA coding for p28/CLF upon activation by LPS prompted us to evaluate if the composite cytokine could act on NK cells as the function of these cells is known to be modulated by DC *in vitro* and *in vivo* (Andoniou et al., 2005; Fernandez et al., 1999; Yu et al., 2001; Nishioka et al., 2001; Gerosa et al., 2002; Andrews et al., 2003). NK cells are important components of the innate

immune response and, through their production of cytokine and lysis of infected or transformed cells are crucial for both controlling infection and immune surveillance (Trinchieri, 1989;Biron et al., 1999). Whereas no responses were detected in unstimulated human NK cells *in vitro*, reproducible up-regulations of IL-2 or IL-12 induced productions of IFN- γ were observed. Co-incubation of NK cells with p28/CLF led to increased expression of the activation markers CD54 and CD69. It did not modulate the NK cell cytotoxic activities assessed by measuring the killing of the cell line K562. These observations suggest that the perforin/granzyme B-based pathway, which has been reported to be the main pathway mediating K562 cytolysis (Zamai et al., 1998), is not affected by the composite cytokine.

The increase in IFN- γ production detected indicates that the production of one of the key NK cell mediator is regulated by p28/CLF. IFN- γ is known to be important in the NK cell–DC cross-talk: This cytokine is involved in the induction of NK cells FasL/Fas mediated cytotoxicity by DC (Yu et al., 2001) and can modulate DC activity toward induction of CD4⁺ Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells (Biron et al., 1999;Adam et al., 2005;Mailliard et al., 2003). The observation that NK activation and IFN- γ production is up-regulated by p28/CLF whereas cytotoxic activity is not affected is in line with previous reports analysing the effects of DC-produced cytokine on NK cells which indicates that regulation of cytotoxicity is mediated by type I interferons whereas production of IFN- γ is regulated by cytokines such as IL-12 and IL-18 (Orange and Biron, 1996;Andoniou et al., 2005). Human NK cells have been subdivided in CD56^{bright} and CD56^{dim} subsets, with distinct functional and phenotypic properties (Cooper et al., 2001). The CD56^{bright} NK cells have the ability to produce high levels of immunoregulatory cytokines, notably IFN- γ but are poorly cytotoxic (Cooper et al., 2001;Fehniger et al., 2003). By contrast the CD56^{dim} NK cells produce low levels of cytokines but are potent cytotoxic effectors (Cooper et al., 2001). It will be of interest to examine if the ability of p28/CLF to modulate NK cell IFN- γ production without increasing cytotoxicity reflects a selective effect on CD56^{bright} cells, which could be due to a restricted expression of the p28/CLF receptor. In line with this

hypothesis, selective expression by CD56^{bright} NK cells of another cytokine receptor, the high affinity IL-2R has been described (Caligiuri et al., 1990).

The role of cytokine produced by DC in the activation of NK cells is well established (Gerosa et al., 2002; Yu et al., 2001; Walzer et al., 2005; Ferlazzo et al., 2004; Andoniou et al., 2005; Orange and Biron, 1996). This comprises secreted composite cytokines of the IL-12/IL-27 family and cytokine complexes expressed at the surface of the DC such as the IL-15/IL-15R α chain complex (Pflanz et al., 2002; Orange and Biron, 1996; Koka et al., 2004; Nguyen et al., 2002; Biron et al., 1999; Ferlazzo et al., 2004; Dubois et al., 2002; Pflanz et al., 2002). Our results indicate that p28/CLF could together with the structurally related IL-12 or with IL-2 participate in the cross-talk between DC and NK. Current results suggest a narrower range of cellular target than for IL-27 which receptor is broadly expressed on immune cells and has, accordingly, pleiotropic activities (Pflanz et al., 2002; Lucas et al., 2003; Kamiya et al., 2004; Morishima et al., 2005; Yoshimoto et al., 2004; Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006; Pflanz et al., 2004; Owaki et al., 2006; Villarino et al., 2006). If confirmed by more extended investigation, the p28/CLF restricted biological activity profile could be beneficial for therapeutic application. Notably, IL-27 has potent anti-tumour effects in mouse cancer models and these effects are, at least partially, mediated by NK cells (Hisada et al., 2004; Salcedo et al., 2004; Chiyo et al., 2005; Oniki et al., 2006). It will be interesting to examine if such anti-tumour effects are shared by p28/CLF.

In the CLC/CLF complex, the role of the soluble cytokine receptor chain *in vivo* is indicated by the phenotype of CLF^{-/-} patients (Knappskog et al., 2003; Rousseau et al., 2006), but *in vitro*, activities of CLC and CLC/CLF are indistinguishable (Elson et al., 2000; Plun-Favreau et al., 2001). The activities of p28 and p28/CLF remain to be directly compared. Results reported during the course of this investigation indicate that mouse p28 share with IL-27 the capacity to induce the differentiation of CD4⁺ Th-17 cells (Stumhofer et al., 2006). This would suggest that, like for CLC, the presence of CLF is not necessary for p28 biological activity *in vitro*.

The formation of a stable p28/CLF complex offers a window of opportunities for the biochemical modification of the properties of the cytokine. For example, CLF could be fused with protein segments increasing half life *in vivo* such as Ig Fc fragments (Fernandez-Botran et al., 2002) or redirecting the cytokine to a subset of receptor expressing cells, as elegantly demonstrated previously for CNTF/CNTFR α complex (Economides et al., 1995). The observation that CLF interacts with the binding site 3 of p28 suggests also that the soluble cytokine receptor could represent a valuable fusion partner for the generation of cytokine traps (Economides et al., 2003) aimed at neutralising p28 or IL-27 biological activities *in vivo*.

In conclusion, we showed here that IL-27 p28 subunit can form an alternative complex with the soluble cytokine receptor CLF, previously known to interact with CLC. The p28/CLF complex does not seem to bind or activate the identified receptors of the structurally related complexes CLC/CLF or IL-27. The composite cytokine p28/CLF is active on NK cells and could therefore be beneficial for therapies in which stimulation of NK cell innate immune response is beneficial.

Figure 2: IL-27 p28 and CLF mRNA are co-expressed in LPS-stimulated monocyte-derived DC. Total RNA was isolated from human immature DC differentiated from monocytes cultured for 5 days in CM at 10^6 cells/ml and activated or not at day 4 for 8 h either with 20 ng/ml LPS. RNA was subjected to RT-PCR with hp28, hCLF and hGAPDH specific primers. -RT: no reverse transcriptase added before PCR (n=2).

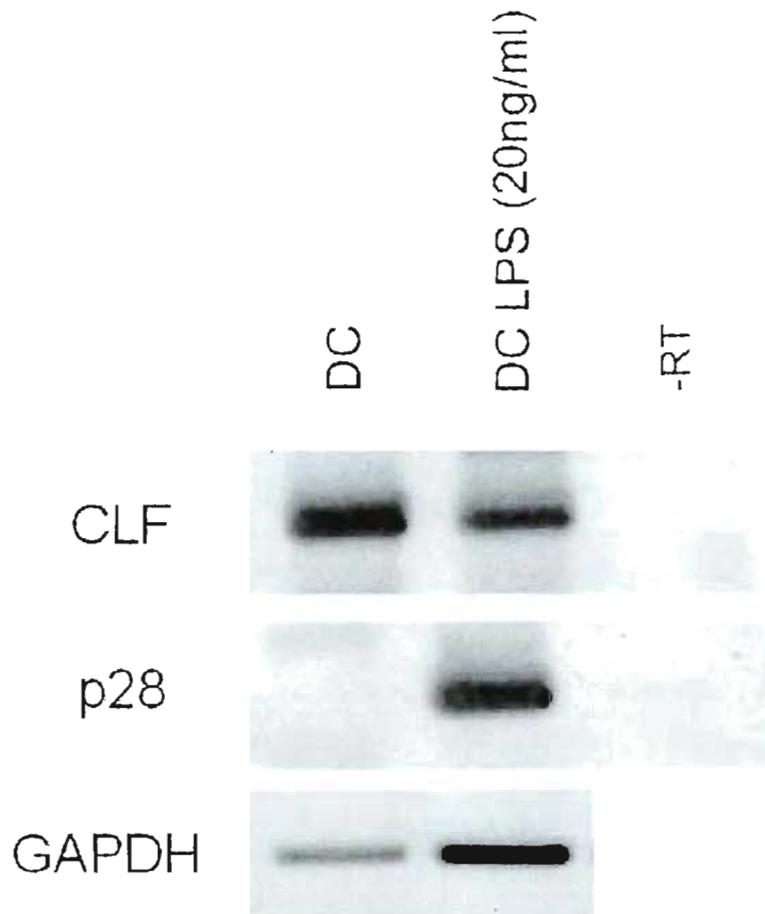


Figure 3: p28/CLF does not bind or activate the CNTFR (A) Transfectants expressing the human CNTFR were incubated with p28/CLF. The binding was then revealed with a mouse anti-ProtC and goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 633. The filled histogram shows the binding of hp28/CLF on mock transfected Flp-inTM-293 cells (B) p28/CLF does not induce the proliferation of Ba/FIII. Human CNTF and CLC/CLF were used as a positives controls for proliferation of Ba/FIII cells. Ba/FIII cells (5×10^3 cells/well in 96 well plates) were cultured in the presence of serial dilutions of the indicated cytokine for 3 days. Proliferation was measured in triplicates by Alamar blue. Errors bars represent s.e.m. RFU: relative fluorescent unit (n=3).

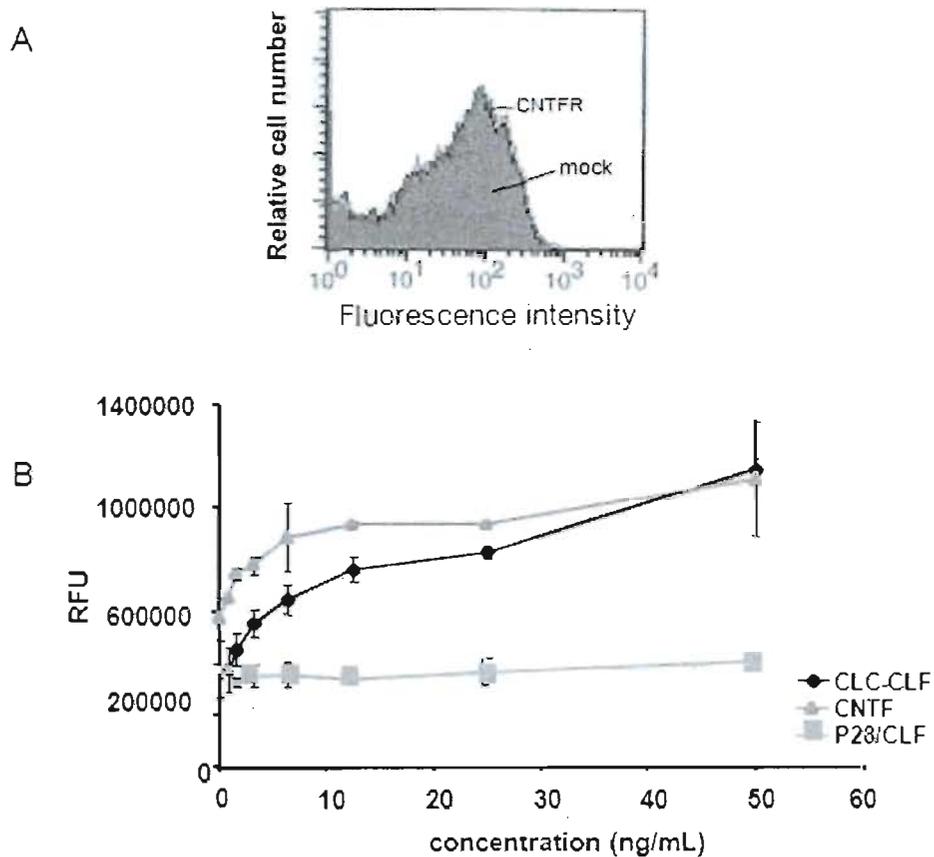


Figure 4: p28/CLF does not bind or activate the IL-27R (A) Transfectants expressing human IL-27 R were incubated with hp28/CLF. The binding was then revealed with a mouse anti-ProtC and goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 633. The filled histogram shows the absence of binding of hp28/CLF on mock transfected Flp-inTM-293 cells. (B) p28/CLF does not activate STAT3 in TF1 cells. TF1 cells were serum and cytokine starved overnight and then stimulated for 10 min with the indicated cytokines. Stimulated cells were lysed and subjected to SDS-PAGE and Western blot. Membranes were probed with anti-STAT3, anti-phospho-STAT3 antibody and the signal revealed with ECL. (C) p28/CLF does not activated mouse splenocytes. Unfractionated mouse spleen cells stimulated for 15 minutes with p28/CL or IL-27. For FACS analysis of STAT phosphorylation, cells were fixed, permeabilised and stained with anti-phospho-STAT1 and anti-phospho-STAT3 (n=3).

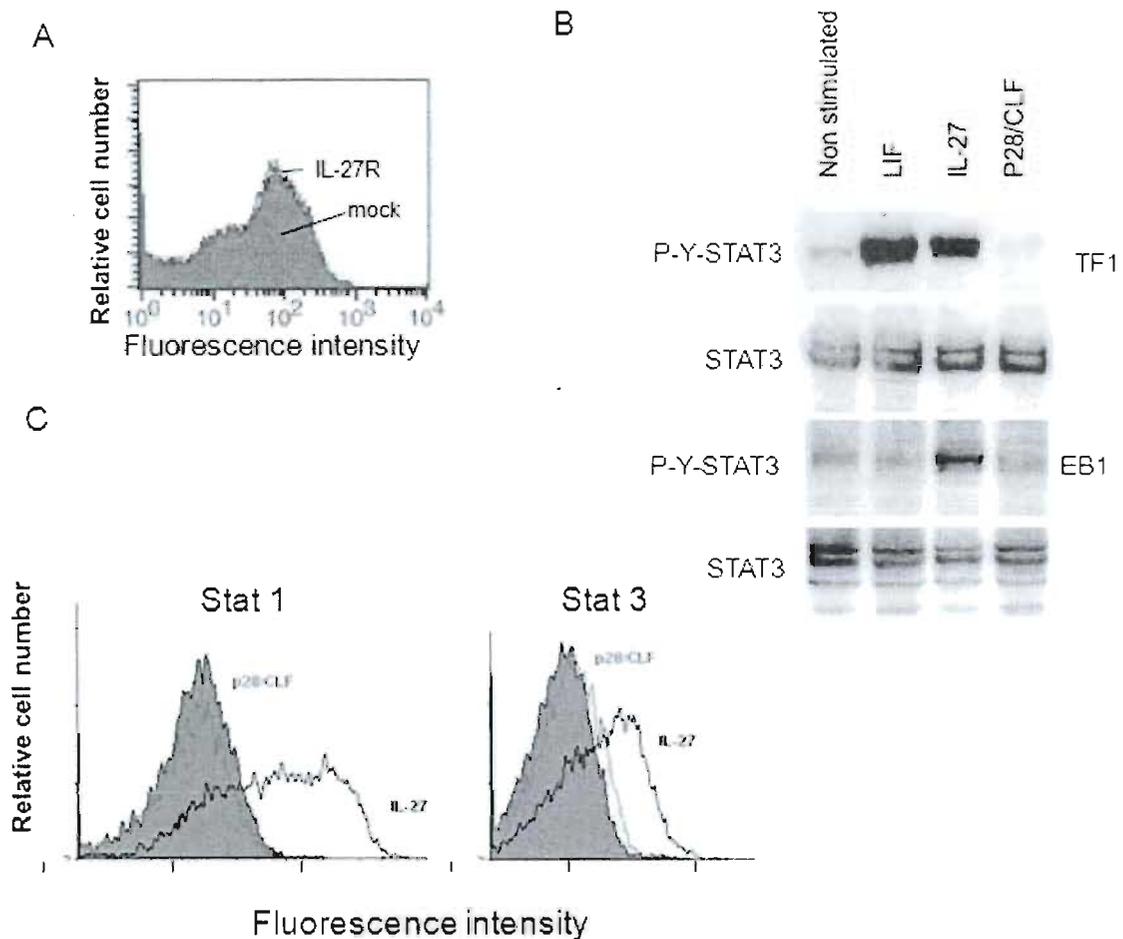


Figure 5: p28/CLF activates human NK cells (A) p28/CLF increases IFN- γ production by human NK cells. Detection of IFN γ by ELISA on culture medium of stimulated NK (1×10^6 cells/ml) with 50ng/ml of p28/CLF with or without indicated concentration of IL-2 or IL-12. The results come from 3 healthy volunteers (B) Production of IFN γ by NK cells in response of increases dose of p28/CLF in presence of IL-2 or IL-12. (C) p28/CLF synergises with IL-2 to induce CD54 or CD69 up-regulation on NK cells after 24 or 48 h stimulation with IL-2 (20 U/ml) and/or p28/CLF(50ng/ml). Cell surface expression of activation marker was determined using FACS analysis. Results are expressed in mean fluorescence intensity (MFI) after subtracting the MFI obtained with the control antibody. Errors bars represent s.e.m (n=2).

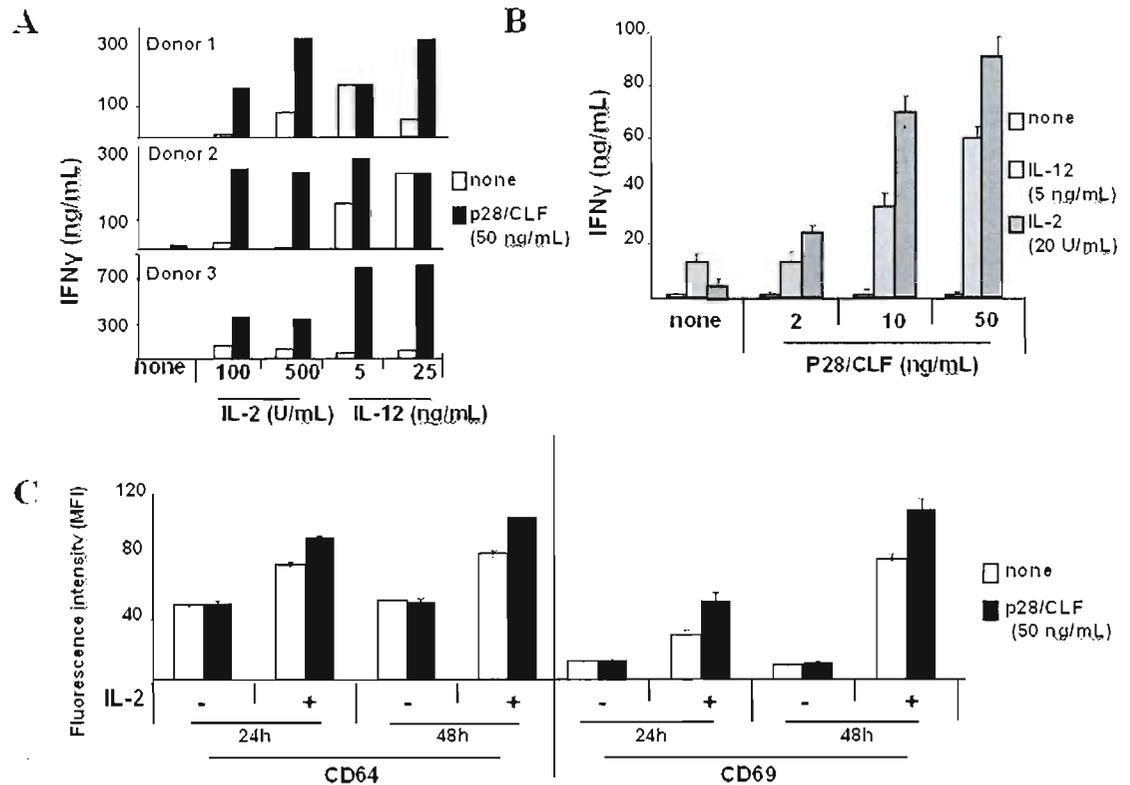
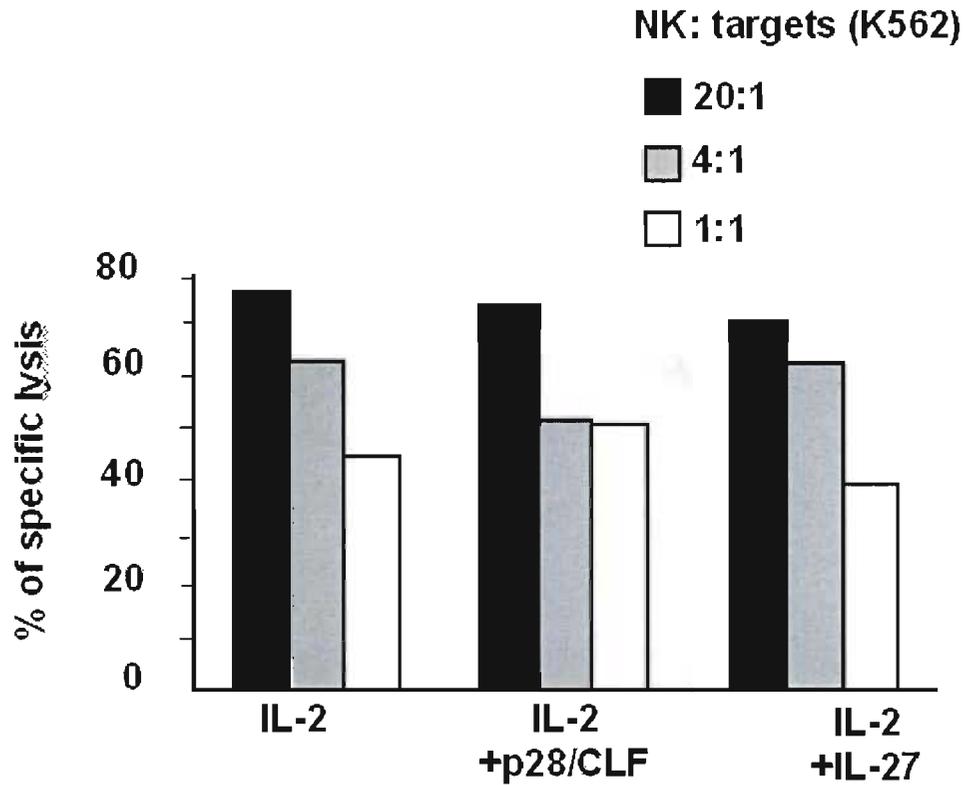


Figure 6 : p28CLF does not increase cytotoxicity of NK cells.

After overnight pre-treatment with IL-2 (1000U/ml), IL-2 (25U/ml)/p28/CLF (100ng/ml) or IL-2 (25U/ml)/IL-27(100ng/ml). CD56+ NK(1×10^6 cells/ml) cells were added to target cells (K562) in a 96-well U-bottom plates at effector/target indicated. The final volume was 200ul per well. The plates were incubated for 4 h after centrifugation at $250 \times g/5\text{min}$, 50 ul aliquots of the supernatants were withdrawn and the content of LDH, released from the target cells, was measured with Cyto Tox96 kit (n=2).



Bibliography

Adam C, King S, Allgeier T, Braumuller H, Luking C, Mysliwietz J, Kriegeskorte A, Busch D H, Rocken M and Mocikat R (2005) DC-NK Cell Cross Talk As a Novel CD4+ T-Cell-Independent Pathway for Antitumor CTL Induction. *Blood* **106**:338-344.

Alexander WS, Rakar S, Robb L, Farley A, Willson T A, Zhang J G, Hartley L, Kikuchi Y, Kojima T, Nomura H, Hasegawa M, Maeda M, Fabri L, Jachno K, Nash A, Metcalf D, Nicola N A and Hilton D J (1999) Suckling Defect in Mice Lacking the Soluble Haemopoietin Receptor NR6. *Curr Biol*-8.

Andoniou CE, van Dommelen S L, Voigt V, Andrews D M, Brizard G, sselin-Paturel C, Delale T, Stacey K J, Trinchieri G and gli-Esposti M A (2005) Interaction Between Conventional Dendritic Cells and Natural Killer Cells Is Integral to the Activation of Effective Antiviral Immunity. *Nat Immunol* **6**:1011-1019.

Andrews DM, Scalzo A A, Yokoyama W M, Smyth M J and gli-Esposti M A (2003) Functional Interactions Between Dendritic Cells and NK Cells During Viral Infection. *Nat Immunol* **4**:175-181.

Artis D, Villarino A, Silverman M, He W, Thornton E M, Mu S, Summer S, Covey T M, Huang E, Yoshida H, Koretzky G, Goldschmidt M, Wu G D, de Sauvage F, Miller H R, Saris C J, Scott P and Hunter C A (2004) The IL-27 Receptor (WSX-1) Is an Inhibitor of Innate and Adaptive Elements of Type 2 Immunity. *J Immunol*-34.

Batten M, Li J, Yi S, Kljavin N M, Danilenko D M, Lucas S, Lee J, de Sauvage F J and Ghilardi N (2006) Interleukin 27 Limits Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing the Development of Interleukin 17-Producing T Cells. *Nat Immunol* **7**:929-936.

Biron CA, Nguyen K B, Pien G C, Cousens L P and Salazar-Mather T P (1999) Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**:189-220.

Bravo J and Heath J K (2000) Receptor Recognition by Gp130 Cytokines. *EMBO J* **19**:2399-2411.

Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley T J, Levine H, Smith K A and Ritz J (1990) Functional Consequences of Interleukin 2 Receptor Expression on Resting Human Lymphocytes. Identification of a Novel Natural Killer Cell Subset With High Affinity Receptors. *J Exp Med* **171**:1509-1526.

Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, N'Guyen t, Thieblemont N, Delneste Y (2004) Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* **104**:1778-1783.

Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie M H, Gurney A, Grewal I S and de Sauvage F J (2000) Development of Th1-Type Immune Responses Requires the Type I Cytokine Receptor TCCR. *Nature* **407**:916-920.

Chiyo M, Shimosato O, Yu L, Kawamura K, Iizasa T, Fujisawa T and Tagawa M (2005) Expression of IL-27 in Murine Carcinoma Cells Produces Antitumor Effects and Induces Protective Immunity in Inoculated Host Animals. *Int J Cancer*-42.

Cognet I, Guilhot F, Chevalier S, Guay-Giroux A, Bert A, Elson G C, Gascan H and Gauchat J F (2004) Expression of Biologically Active Mouse Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) and Soluble CNTFRalpha in Escherichia Coli and Characterization of Their Functional Specificities. *Eur Cytokine Netw*-62.

Cognet I, Guilhot F, Gabriac M, Chevalier S, Chouikh Y, Herman-Bert A, Guay-Giroux A, Corneau S, Magistrelli G, Elson G C, Gascan H and Gauchat J F (2005) Cardiotrophin-Like

Cytokine Labelling Using Bir A Biotin Ligase: a Sensitive Tool to Study Receptor Expression by Immune and Non-Immune Cells. *J Immunol Methods*-2.

Cooper MA, Fehniger T A and Caligiuri M A (2001) The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets. *Trends Immunol* **22**:633-640.

de Vos AM, Ultsch M and Kossiakoff A A (1992) Human Growth Hormone and Extracellular Domain of Its Receptor: Crystal Structure of the Complex. *Science* **255**:306-312.

Devergne O, Birkenbach M and Kieff E (1997) Epstein-Barr Virus-Induced Gene 3 and the P35 Subunit of Interleukin 12 Form a Novel Heterodimeric Hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*-6.

Dubois S, Mariner J, Waldmann T A and Tagaya Y (2002) IL-15Ralpha Recycles and Presents IL-15 In Trans to Neighboring Cells. *Immunity* **17**:537-547.

Economides AN, Carpenter L R, Rudge J S, Wong V, Koehler-Stec E M, Hartnett C, Pyles E A, Xu X, Daly T J, Young M R, Fandl J P, Lee F, Carver S, McNay J, Bailey K, Ramakanth S, Hutabarat R, Huang T T, Radziejewski C, Yancopoulos G D and Stahl N (2003) Cytokine Traps: Multi-Component, High-Affinity Blockers of Cytokine Action. *Nat Med* **9**:47-52.

Economides AN, Ravetch J V, Yancopoulos G D and Stahl N (1995) Designer Cytokines: Targeting Actions to Cells of Choice. *Science* **270**:1351-1353.

Elson GC, Graber P, Losberger C, Herren S, Gretener D, Menoud L N, Wells T N, Kosco-Vilbois M H and Gauchat J F (1998) Cytokine-Like Factor-1, a Novel Soluble Protein, Shares Homology With Members of the Cytokine Type I Receptor Family. *J Immunol*-9.

Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac A B, Delneste Y, Bonnefoy J Y, Gauchat J F and Gascan H (2000) CLF

Associates With CLC to Form a Functional Heteromeric Ligand for the CNTF Receptor Complex. *Nat Neurosci*-72.

Fehniger TA, Cooper M A, Nuovo G J, Cella M, Facchetti F, Colonna M and Caligiuri M A (2003) CD56bright Natural Killer Cells Are Present in Human Lymph Nodes and Are Activated by T Cell-Derived IL-2: a Potential New Link Between Adaptive and Innate Immunity. *Blood* **101**:3052-3057.

Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller W A, Moretta L and Munz C (2004) Distinct Roles of IL-12 and IL-15 in Human Natural Killer Cell Activation by Dendritic Cells From Secondary Lymphoid Organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16606-16611.

Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E and Zitvogel L (1999) Dendritic Cells Directly Trigger NK Cell Functions: Cross-Talk Relevant in Innate Anti-Tumor Immune Responses in Vivo. *Nat Med* **5**:405-411.

Fernandez-Botran R, Crespo F A and Sun X (2002) Soluble Cytokine Receptors in Biological Therapy. *Expert Opin Biol Ther* **2**:585-605.

Forger NG, Prevette D, Delapeyriere O, de Bovis B, Wang S, Bartlett P and Oppenheim R W (2003) Cardiotrophin-Like Cytokine/Cytokine-Like Factor 1 Is an Essential Trophic Factor for Lumbar and Facial Motoneurons in Vivo. *J Neurosci*-8.

Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G and Trinchieri G (2002) Reciprocal Activating Interaction Between Natural Killer Cells and Dendritic Cells. *J Exp Med* **195**:327-333.

Goldberg R, Wildbaum G, Zohar Y, Maor G and Karin N (2004a) Suppression of Ongoing Adjuvant-Induced Arthritis by Neutralizing the Function of the P28 Subunit of IL-27. *J Immunol*-8.

Goldberg R, Zohar Y, Wildbaum G, Geron Y, Maor G and Karin N (2004b) Suppression of Ongoing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Neutralizing the Function of the P28 Subunit of IL-27. *J Immunol*-71.

Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak T W, Yoshimura A and Yoshida H (2003) WSX-1 Is Required for Resistance to Trypanosoma Cruzi Infection by Regulation of Proinflammatory Cytokine Production. *Immunity* **19**:657-667.

Hibbert L, Pflanz S, de Waal M R and Kastelein R A (2003) IL-27 and IFN-Alpha Signal Via Stat1 and Stat3 and Induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in Naive T Cells. *J Interferon Cytokine Res*-22.

Hisada M, Kamiya S, Fujita K, Belladonna M L, Aoki T, Koyanagi Y, Mizuguchi J and Yoshimoto T (2004) Potent Antitumor Activity of Interleukin-27. *Cancer Res*-6.

Kallen KJ, Grotzinger J, Lelievre E, Vollmer P, Aasland D, Renne C, Mullberg J, Myer zum Buschenfelde K H, Gascan H and Rose-John S (1999) Receptor Recognition Sites of Cytokines Are Organized As Exchangeable Modules. Transfer of the Leukemia Inhibitory Factor Receptor-Binding Site From Ciliary Neurotrophic Factor to Interleukin-6. *J Biol Chem* **274**:11859-11867.

Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J and Yoshimoto T (2004) An Indispensable Role for STAT1 in IL-27-Induced T-Bet Expression but Not Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *J Immunol*-7.

Knappskog PM, Majewski J, Livneh A, Nilsen P T, Bringsli J S, Ott J and Boman H (2003) Cold-Induced Sweating Syndrome Is Caused by Mutations in the CRLF1 Gene. *Am J Hum Genet* **72**:375-383.

Koka R, Burkett P, Chien M, Chai S, Boone D L and Ma A (2004) Cutting Edge: Murine Dendritic Cells Require IL-15R Alpha to Prime NK Cells. *J Immunol* **173**:3594-3598.

Lelievre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, Froger J, Guillet C, Elson G C, Gauchat J F and Gascan H (2001) Signaling Pathways Recruited by the Cardiotrophin-Like Cytokine/Cytokine-Like Factor-1 Composite Cytokine: Specific Requirement of the Membrane-Bound Form of Ciliary Neurotrophic Factor Receptor Alpha Component. *J Biol Chem* **276**:84.

Lucas S, Ghilardi N, Li J and de Sauvage F J (2003) IL-27 Regulates IL-12 Responsiveness of Naive CD4⁺ T Cells Through Stat1-Dependent and -Independent Mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:52.

Mailliard RB, Son Y I, Redlinger R, Coates P T, Giermasz A, Morel P A, Storkus W J and Kalinski P (2003) Dendritic Cells Mediate NK Cell Help for Th1 and CTL Responses: Two-Signal Requirement for the Induction of NK Cell Helper Function. *J Immunol* **171**:2366-2373.

Morishima N, Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Mizuguchi J and Yoshimoto T (2005) Augmentation of Effector CD8⁺ T Cell Generation With Enhanced Granzyme B Expression by IL-27. *J Immunol* **175**:93.

Murakami M, Kamimura D and Hirano T (2004) New IL-6 (Gp130) Family Cytokine Members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth Factors* **22**:7.

Nguyen KB, Salazar-Mather T P, Dalod M Y, Van Deusen J B, Wei X Q, Liew F Y, Caligiuri M A, Durbin J E and Biron C A (2002) Coordinated and Distinct Roles for IFN-

Alpha Beta, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. *J Immunol* **169**:4279-4287.

Nieuwenhuis EE, Neurath M F, Corazza N, Iijima H, Trgovcich J, Wirtz S, Glickman J, Bailey D, Yoshida M, Galle P R, Kronenberg M, Birkenbach M and Blumberg R S (2002) Disruption of T Helper 2-Immune Responses in Epstein-Barr Virus-Induced Gene 3-Deficient Mice. *Proc Natl Acad Sci US A* **6**.

Nishioka Y, Nishimura N, Suzuki Y and Sone S (2001) Human Monocyte-Derived and CD83(+) Blood Dendritic Cells Enhance NK Cell-Mediated Cytotoxicity. *Eur J Immunol* **31**:2633-2641.

Oniki S, Nagai H, Horikawa T, Furukawa J, Belladonna M L, Yoshimoto T, Hara I and Nishigori C (2006) Interleukin-23 and Interleukin-27 Exert Quite Different Antitumor and Vaccine Effects on Poorly Immunogenic Melanoma. *Cancer Res* **66**:6395-6404.

Orange JS and Biron C A (1996) An Absolute and Restricted Requirement for IL-12 in Natural Killer Cell IFN-Gamma Production and Antiviral Defense. Studies of Natural Killer and T Cell Responses in Contrasting Viral Infections. *J Immunol* **156**:1138-1142.

Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, Takeda K, Fukai F, Mizuguchi J and Yoshimoto T (2006) IL-27 Suppresses CD28-Mediated [Correction of Medicated] IL-2 Production Through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J Immunol* **176**:2773-2780.

Pearl JE, Khader S A, Solache A, Gilmartin L, Ghilardi N, deSavage F and Cooper A M (2004) IL-27 Signaling Compromises Control of Bacterial Growth in Mycobacteria-Infected Mice. *J Immunol* **6**.

Perret D, Guillet C, Elson G, Froger J, Plun-Favreau H, Rousseau F, Chabbert M, Gauchat J F and Gascan H (2004) Two Different Contact Sites Are Recruited by Cardiotrophin-Like

Cytokine (CLC) to Generate the CLC/CLF and CLC/SCNTFRalpha Composite Cytokines. *J Biol Chem*-70.

Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan J F, Phillips J H, McClanahan T K, de Waal M R and Kastelein R A (2004) WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27. *J Immunol*-31.

Pflanz S, Timans J C, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein W M, Mattson J D, Wagner J L, To W, Zurawski S, McClanahan T K, Gorman D M, Bazan J F, de Waal M R, Rennick D and Kastelein R A (2002) IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and P28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4(+) T Cells. *Immunity*-90.

Plun-Favreau H, Elson G, Chabbert M, Froger J, Delapeyriere O, Lelievre E, Guillet C, Hermann J, Gauchat J F, Gascan H and Chevalier S (2001) The Ciliary Neurotrophic Factor Receptor Alpha Component Induces the Secretion of and Is Required for Functional Responses to Cardiotrophin-Like Cytokine. *EMBO J*-703.

Rosas LE, Satoskar A A, Roth K M, Keiser T L, Barbi J, Hunter C, de Sauvage F J and Satoskar A R (2006) Interleukin-27R (WSX-1/T-Cell Cytokine Receptor) Gene-Deficient Mice Display Enhanced Resistance to *Leishmania Donovanii* Infection but Develop Severe Liver Immunopathology. *Am J Pathol* **168**:158-169.

Rousseau F, Gauchat J F, McLeod J G, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, Cognet I, Froger J, Hahn A F, Knappskog P M, Gascan H and Boman H (2006) Inactivation of Cardiotrophin-Like Cytokine, a Second Ligand for Ciliary Neurotrophic Factor Receptor, Leads to Cold-Induced Sweating Syndrome in a Patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:10068-10073.

Salcedo R, Stauffer J K, Lincoln E, Back T C, Hixon J A, Hahn C, Shafer-Weaver K, Malyguine A, Kastelein R and Wigginton J M (2004) IL-27 Mediates Complete Regression

of Orthotopic Primary and Metastatic Murine Neuroblastoma Tumors: Role for CD8+ T Cells. *J Immunol*-82.

Senaldi G, Varnum B C, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee C L, Freeman D, Manu F, Simonet W S, Boone T and Chang M S (1999) Novel Neurotrophin-1/B Cell-Stimulating Factor-3: a Cytokine of the IL-6 Family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11458-11463.

Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes R A and Thoenen H (1994) Ciliary Neurotrophic Factor. *J Neurobiol* **25**:1436-1453.

Shi Y, Wang W, Yourey P A, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, Ruben S and Alderson R F (1999) Computational EST Database Analysis Identifies a Novel Member of the Neuropoietic Cytokine Family. *Biochem Biophys Res Commun*-8.

Sleeman MW, Anderson K D, Lambert P D, Yancopoulos G D and Wiegand S J (2000) The Ciliary Neurotrophic Factor and Its Receptor, CNTFR Alpha. *Pharm Acta Helv* **74**:265-272.

Sprecher CA, Grant F J, Baumgartner J W, Presnell S R, Schrader S K, Yamagiwa T, Whitmore T E, O'Hara P J and Foster D F (1998) Cloning and Characterization of a Novel Class I Cytokine Receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **246**:82-90.

Stumhofer JS, Laurence A, Wilson E H, Huang E, Tato C M, Johnson L M, Villarino A V, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris C J, O'Shea J J, Hennighausen L, Ernst M and Hunter C A (2006) Interleukin 27 Negatively Regulates the Development of Interleukin 17-Producing T Helper Cells During Chronic Inflammation of the Central Nervous System. *Nat Immunol* **7**:937-945.

Taga T and Kishimoto T (1997) Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu Rev Immunol* **15**:797-819.

Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak T W, Yoshimura A and Yoshida H (2003) Cutting Edge: Role of IL-27/WSX-1 Signaling for Induction of T-Bet Through Activation of STAT1 During Initial Th1 Commitment. *J Immunol* 171:90-95.

Trinchieri G (1989) Biology of Natural Killer Cells. *Adv Immunol* 47:187-376.

Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein R A, Saris C and Hunter C A (2003) The IL-27R (WSX-1) Is Required to Suppress T Cell Hyperactivity During Infection. *Immunity* 19:645-655.

Villarino AV, Larkin J, III, Saris C J, Caton A J, Lucas S, Wong T, de Sauvage F J and Hunter C A (2005) Positive and Negative Regulation of the IL-27 Receptor During Lymphoid Cell Activation. *J Immunol* 175:91-98.

Villarino AV, Stumhofer J S, Saris C J, Kastelein R A, de Sauvage F J and Hunter C A (2006) IL-27 Limits IL-2 Production During Th1 Differentiation. *J Immunol* 176:237-247.

Walzer T, Dalod M, Robbins S H, Zitvogel L and Vivier E (2005) Natural-Killer Cells and Dendritic Cells: "l'Union Fait La Force". *Blood* 106:2252-2258.

Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, Xia M, Wakeham A C, Nishina H, Potter J, Saris C J and Mak T W (2001) WSX-1 Is Required for the Initiation of Th1 Responses and Resistance to L. Major Infection. *Immunity* 15:569-578.

Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang W Z, Mori C, Shiota K, Yoshida N and Kishimoto T (1996) Targeted Disruption of Gp130, a Common Signal Transducer for the Interleukin 6 Family of Cytokines, Leads to Myocardial and Hematological Disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:407-411.

Yoshimoto T, Okada K, Morishima N, Kamiya S, Owaki T, Asakawa M, Iwakura Y, Fukai F and Mizuguchi J (2004) Induction of IgG2a Class Switching in B Cells by IL-27. *J Immunol* **173**:85-91.

Yu Y, Hagihara M, Ando K, Gansuvd B, Matsuzawa H, Tsuchiya T, Ueda Y, Inoue H, Hotta T and Kato S (2001) Enhancement of Human Cord Blood CD34+ Cell-Derived NK Cell Cytotoxicity by Dendritic Cells. *J Immunol* **166**:1590-1600.

Zahn S, Wirtz S, Birkenbach M, Blumberg R S, Neurath M F and von Stebut E (2005) Impaired Th1 Responses in Mice Deficient in Epstein-Barr Virus-Induced Gene 3 and Challenged With Physiological Doses of Leishmania Major. *Eur J Immunol* **35**:12-21.

Zamai L, Ahmad M, Bennett I M, Azzoni L, Alnemri E S and Perussia B (1998) Natural Killer (NK) Cell-Mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. *J Exp Med* **188**:2375-2380.

Zitvogel L, Terme M, Borg C and Trinchieri G (2006) Dendritic Cell-NK Cell Cross-Talk: Regulation and Physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol* **298**:157-174.

Discussion

Pour expliquer les différences de phénotype entre les patients CISS I (mutations dans le gène *CLRF1* codant pour CLF) et CISS II (mutations dans le gène *CLCF1* codant pour CLC) nous avons émis l'hypothèse que CLF était impliqué dans la formation d'une autre cytokine composite que CLC/CLF. En effet, l'insensibilité à la douleur induite par des stimuli thermiques semble apparaître seulement dans le cas d'une mutation dans *CLRF1* et non dans le cas d'une mutation dans *CLCF1* (Knappskog *et al.* 2003; Rousseau *et al.* 2006). Jusqu'à maintenant, les seules activités connues de CLF venaient de son interaction avec la protéine CLC. Même si cette différence pouvait être due à des variations inter-individuelles, elle pourrait également refléter une activité biologique propre de CLF ou de son implication dans un autre complexe de cytokine de type IL-12.

CLF possède la structure d'un récepteur de cytokine de type I sous une forme soluble et a une grande homologie avec certains récepteurs comme le récepteur à la prolactine ou gp130. Il est probable que l'action de CLF se fasse par son interaction avec une autre sous-unité de type cytokine et qu'il jouerait le rôle d'un récepteur soluble. Nous avons donc choisi de nous pencher sur l'hypothèse de l'existence d'un deuxième partenaire d'action pour CLF.

Les cytokines composites font partie d'une famille émergente comptant de plus en plus de membres. Il existe plusieurs exemples de l'utilisation redondante des sous-unités formant ces cytokines. Un exemple est le partage des sous-unités de l'IL-12 avec d'autres cytokines. L'IL-12, la première cytokine composite découverte, est formée de p35 et de p40, dont p35 est la sous-unité de forme cytokine (équivalent à CLC) et p40 qui est la sous-unité de type récepteur soluble (équivalent à CLF). Récemment, il a été découvert que p40 peut aussi former un complexe avec p19 pour former l'IL-23 (Oppmann *et al.* 2000) et que p35 peut former un complexe avec la sous-unité EB13 de l'IL-27 (Devergne *et al.* 1997). De plus, dans la famille de l'IL-6 il existe de nombreuses redondances dans l'utilisation des chaînes de récepteurs (ex : gp130 et LIFR). Il est donc tout à fait plausible de suggérer que CLF possède plusieurs ligands.

Pour la recherche d'un candidat, nous avons testé des cytokines de la famille de l'IL-6 et de l'IL-12 proche de l'IL-27 par leur degré de phylogénie (Pflanz *et al.* 2004). L'un des plus proche homologue de CLC était la sous-unité p28 de la cytokine composite IL-27 (p28/EBI3).

2. Interaction entre p28 et CLF

Pour vérifier l'hypothèse de la possible liaison entre p28 et CLF, nous avons généré des vecteurs dont l'introduction d'un site d'entrée interne ribosomale (IRES) mène à l'expression d'un ARNm bicistronique permettant la coexpression d'une quantité comparable de p28 et de CLF. Pour les transfections, nous avons utilisé le système Flp-In™ dans les lignées de fibroblastes HEK 293. Ce système possède l'avantage d'assurer l'intégration par recombinaison homologue d'une seule copie de nos vecteurs d'expression dans le génome de la cellule sous un même promoteur. Cela nous permet d'assurer l'uniformité de l'expression des cytokines.

Pour nous permettre d'immunoprécipiter et de détecter par immunobuvardage de type Western les deux sous-unités nous avons introduit en fusion avec nos protéines des étiquettes. Pour p28 nous avons utilisé une étiquette protéine C (protC) et pour CLF nous avons utilisé une étiquette FLAG.

À partir des surnageants des cellules transfectées avec p28/CLF ou avec les cytokines seules utilisées comme contrôles, nous avons fait des expériences de co-immunoprécipitation. Dans ce système, nous avons prouvé que p28 et CLF pouvaient être co-immunoprécipités aussi bien en précipitant p28 avec un anticorps dirigé contre son étiquette protC qu'en précipitant CLF avec un anticorps dirigée contre son étiquette FLAG (Figure1 Article).

2.1 Mutants

Dans le but de mieux caractériser l'interaction entre p28 et CLF, nous avons voulu voir par quel site l'interaction pouvait se faire. Pour cela nous savions, par l'alignement des séquences de p28 et CLC et leur modélisation en structure en trois dimensions, que l'organisation structurale du site I et du site III est conservée entre ces deux cytokines. Pour les mutations dans p28, nous nous sommes basés sur des acides aminés déjà utilisés pour de la mutagenèse des sites d'interaction I et III dans CLC (Perret *et al.* 2004) et sur les alignements de p28 et CLC.

Nous avons remplacé W97 (pour le site I) et W197 (pour le site III) par des alanines, dans la construction codant pour hp28protC/hCLFFlag. La co-immunoprécipitation du complexe avec une mutation du site I n'a pas encore été complétée, mais nous avons observé que la mutation du site III abolit l'interaction entre les 2 sous-unités.

L'abolition de l'interaction entre p28 et CLF par une mutation du site I démontre que p28 se lie à CLF par le même site que se lie CLC. Cela montre aussi, que la liaison entre p28 et CLF est spécifique étant donné que le changement d'un seul acide aminé peut briser complètement l'interaction.

3. Production du complexe

L'identification des activités biologiques de la cytokine composite p28/CLF, nécessitait sa production et sa purification. Dans le laboratoire, nous utilisons 2 méthodes d'expression de protéines recombinantes. L'une est basée sur un système procaryote et l'autre sur un système eucaryote. Le système procaryote consiste à cloner le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur de bactériophage T7 inductible et d'introduire par transformation le vecteur d'expression dans le dérivé BL21 de la bactérie *E. coli*. Dans ce dérivé, l'expression de la polymérase T7 est sous le contrôle du promoteur *Lac* et peut être

induite par l'IPTG (Borck *et al.* 1976). Ce système possède plusieurs avantages, il bénéficie de la rapidité de croissance des bactéries pour produire la protéine d'intérêt en peu de temps et en grande quantité. Nous avons pu exprimer aussi bien CLF que p28 dans les bactéries BL21. Par contre, comme la production se fait dans *E. coli*, une grande quantité de LPS se trouve dans notre protéine purifiée. Le LPS est un constituant des membranes des bactéries gram-négatives et il affecte les réponses biologiques grâce à son activation non spécifique des cellules du système immunitaire. Comme nous voulions nous servir de cette protéine purifiée pour chercher l'activité de p28/CLF nous ne voulions pas que les effets biologiques observés soient dus au LPS plutôt qu'à la nouvelle cytokine elle-même. Il existe des systèmes de colonne d'affinité permettant de purifier les protéines recombinantes du LPS. Nous avons essayé deux de ces systèmes (bille couplée à de la Polymyxine B, Sigma et Endotrap, Cambrex) mais aucune de ces méthodes n'a fonctionnées pour éliminer le LPS du p28.

La purification utilisant un système eucaryote, est basée sur la même démarche que celle utilisée pour la production de surnageants pour les co-immunoprécipitations. Cette méthode est plus longue et plus coûteuse mais elle à l'avantage de se faire en milieu stérile. Dans toutes les étapes de ces purifications, (filtration, concentration, chromatographie d'affinité, dialyse) une attention particulière doit être portée pour empêcher l'introduction de contaminants comme des bactéries, des champignons ou du LPS. Dans ce but, chaque instrument, milieu de culture ou sérum utilisés doit être certifié stérile et sans agent pyrogène. Nous avons également éliminé le LPS de la verrerie en la placant au four pasteur à 175°C pendant au moins 3 heures. Chaque production de cytokine a été testée pour la présence de LPS par le test de « Limulus amebocyte lysate » (LAL), approuvé par la « Food and Drug administration » et la quantité de LPS est maintenue en dessous d'une unité d'endotoxine par µg de protéines recombinantes. La mesure de contamination est exprimée en unité d'endotoxine (EU), normalement 1 ng de LPS correspond à 1-10 EU.

4. Récepteur

Nous avons tenté d'identifier le récepteur de cette nouvelle cytokine. Nos premières hypothèses étaient que le récepteur utilisé pouvait être celui de CLC/CLF (CNTFR) ou de IL-27 (IL-27R). Nous avons effectué des essais de liaison sur des cellules transfectées avec des ADNc codant pour la chaîne CNTFR α spécifique à CLC (ou CNTF) ou pour la chaîne WSX-1 spécifique à l'IL-27. Aucune liaison de p28/CLF n'a été détectée par cytométrie en flux sur ces transfectants. Cependant, à ce point, nous ne pouvions pas rejeter totalement l'hypothèse que p28/CLF se lierait à l'une ou l'autre de ces chaînes. En effet, l'affinité de cette cytokine pourrait être moins forte que celle de CLC/CLF ou l'IL-27, ce qui expliquerait que l'on puisse détecter la liaison de ces dernières sur leur récepteur respectif mais, que l'on ne détecte pas celle de p28/CLF. De plus, la méthode de transfection que nous avons utilisée n'est pas la méthode permettant le plus grand nombre de récepteur à la surface (ex : transduction par un rétrovirus utilisé pour découvrir le récepteur de l'IL-27 (Pflanz *et al.* 2004)). Ces deux raisons pourraient avoir pour conséquences que la limite de détection de la méthode utilisée n'a pas permis de voir la liaison.

Pour approfondir l'hypothèse que le récepteur de p28/CLF pourrait être CNTFR ou IL-27R, nous avons évalué l'activation de ces récepteurs en utilisant des lignées cellulaires répondant à CLC/CLF ou à l'IL-27.

Notre laboratoire dispose d'une lignée de cellules Ba/F3 transfectée avec les trois chaînes du récepteur du CNTFR (LIFR, gp130, CNTFR α) qui répond à CLC/CLF ou à CNTF en proliférant. Ces cellules n'ont montré aucune prolifération en réponse à p28/CLF permettant de conclure que cette cytokine n'active par le CNTFR.

Pour l'IL-27R, nous avons utilisé deux lignées répondant à l'IL-27 en phosphorylant STAT1 et STAT3. La lignée TF1 est une lignée cellulaire humaine dérivée d'un érythroblaste d'un patient atteint d'érythroleucémie et la lignée EB1 est issue de lymphocyte B d'un patient atteint d'un lymphome de Burkitt. Aucune phosphorylation des STAT n'a été observée en réponse à la stimulation par p28/CLF.

Une comparaison entre la capacité de p28/CLF et de l'IL-27 à induire la phosphorylation de STAT 1 et STAT3 chez les splénocytes de souris supporte aussi nos conclusions que l'IL-27 et p28/CLF ont des récepteurs différents. Contrairement à l'IL-27, p28/CLF n'induit pas de manière détectable la voie des JAK/STAT de façon assez importante pour détecter un signal dans les cellules de la rate. Cela pourrait suggérer que p28/CLF aurait plutôt un effet limité sur de petites populations de cellules immunitaires ou ait besoin d'une pré-activation des cellules.

Nos résultats confirment des études précédentes qui démontrent que les deux sous-unité de l'IL-27, p28 et EBI3 sont requises pour l'activation du récepteur (Pflanz et al., 2004) et indique que CLF ne peut être un substitut pour EBI3 même si ces deux protéines sont structurellement apparentées (Alexander et al., 1999).

Nous avons également testé une lignée cellulaire fibroblastique humaine répondant à l'OSM (cytokine de la famille de l'IL-6), les T98G, en phosphorylant STAT1, STAT3 et MAPK (Figure 1 Annexe). Une fois encore, aucune activation par p28/CLF n'a été détectée. Il semble donc que p28/CLF n'active pas le récepteur de l'OSM.

Afin de poursuivre la recherche du récepteur, nous avons commencé à produire des vecteurs comportant des ADNc codant pour les chaînes des différents récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-12 et de l'IL-6. Ces vecteurs permettront de faire des études de liaison par cytométrie en flux. Nous avons déjà fait des tests avec certains de ces ADNc (IL-13R, IL-23R, IL-12R) mais aucune de ces chaînes n'est ressortie positive (figure 2 Annexe). Une difficulté inhérente à ce criblage se trouve dans le fait que nous ne possédons aucun contrôle pour démontrer que la cellule exprime bien le récepteur. Pour cela, il faudrait pour chaque transfectant posséder un anticorps contre chaque récepteur ou ligand ou de produire des ligands recombinants possédant une étiquette. Un résultat positif aurait pu orienter nos recherches, mais les résultats négatifs obtenus ne permettent pas d'éliminer de manière définitive des candidats de récepteurs.

5. Activités biologiques

5.1 Système immunitaire

Nous avons observé que p28/CLF n'interagissait pas avec le récepteur du CNTF. Il est donc plus probable que cette cytokine ait une action au niveau du système immunitaire, comme les autres membres de la famille de l'IL-6 plutôt que des effets neurotrophiques comme CLC/CLF.

Des études précédentes sur le patron d'expression de l'ARNm de l'IL-27 indique que même si cette cytokine active une grande variété de cellules, sa production est restreinte aux cellules présentatrices d'antigène telles que les monocytes et les DC (Pflanz *et al.* 2004).

Nous avons observé que les DC dérivées de monocytes pouvaient également exprimer l'ARNm de p28 et de CLF. Nous avons tenté de montrer par ELISA la présence du complexe dans le surnageant de ces cellules en utilisant un anti-p28 commercial et un anti-CLF maison. L'ELISA a donné un résultat positif pour la présence du complexe dans le surnageants des DC activés. Malheureusement, un contrôle contenant du CLC/CLF nous démontre que cet ELISA ne peut discriminer entre le CLC/CLF et le p28/CLF (Voir figure 3 Annexe). Comme il existe très peu d'anticorps commerciaux pour le p28 humain nous n'avons pas confirmé les résultats de l'ELISA avec un anticorps qui ne fait pas de réaction croisée avec CLC.

Étant donné que l'ARNm de p28/CLF est exprimé par les DC et qu'il est donc possible que cette cytokine y soit exprimée, même si nous n'avons pu le montrer, nous nous sommes penchés principalement sur les cellules qui interagissent avec celles-ci dans notre recherche d'activités biologiques. Nous avons effectué une grande variété de test d'activités sur différentes cellules immunitaires humaines : la prolifération des cellules CD4⁺ naïves et mémoires (RA/RO) (Figure 4a et 4b Annexe) et des cellules Treg (CD 25⁺⁺) (Figure 5

Annexe) ainsi que la production d'IFN- γ par les cellules NK. Nous avons émis l'hypothèse, d'après nos résultats de stimulation de splénocytes de souris, que 28/CLF ne pourrait agir que sur des cellules préactivées. L'activation des cellules permet souvent l'expression de certains récepteurs comme nous l'avons vu dans l'introduction qui permettront à des cytokines, qui n'agissent pas sur la cellule au repos d'agir sur la cellule activée. Nous avons donc tenté de faire chaque expérience avec des cellules préactivées. Par exemple, nous avons utilisé l'IL-2 et l'IL-12 qui sont des facteurs stimulants des NK produits par les DC (Reis e Sousa 2001).

Sur cette batterie de test, seules les cellules NK ont répondu à p28/CLF. En effet, nous avons observé de façon reproductible, significative et selon une courbe dose réponse, qu'en présence d'IL-2 ou d'IL-12, p28/CLF provoque une augmentation marquée de la production d'IFN- γ chez les cellules NK humaines.

5.2 Caractérisation de l'effet sur les NK

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les cellules NK sont une composante essentielle de la réponse innée et, par leur production de cytokines et leur cytotoxicité sur les cellules infectées ou tumorales, sont cruciales face aux infections ainsi que pour l'immunosurveillance.

5.2.1 Production d'IFN- γ

L'IFN- γ est un facteur clé de la régulation de l'immunité adaptative par des cellules de l'immunité innée en jouant un rôle très important dans l'interaction bidirectionnelle des cellules NK et des DC. Cette cytokine favorise l'activation des phagocytes, la production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène et le développement de la réponse des cellules Th-1 produisant des cytokines pro-inflammatoires.

Nous avons observé une forte synergie entre p28/CLF et IL-2 ou l'IL-12 pour la production d'IFN- γ . La synergie entre deux cytokines dans l'induction de la production

d'IFN- γ est un mécanisme fréquent observé chez les cellules NK. En effets, l'IL-12, l'IL-15 ou l'IL-18 seules n'induisent pas une augmentation significative d'IFN- γ par les cellules NK non activées. Par contre, en combinaison, deux de ces cytokines sont de puissants inducteurs de la production d'IFN- γ (Fehniger *et al.* 1999). Le mécanisme d'action de cette synergie implique souvent que l'une ou l'autre des cytokines active un facteur permettant à l'autre d'agir. Par exemple, le mécanisme d'action par lequel l'IL-27 agit en synergie avec l'IL-12 pour produire de l'IFN- γ serait l'induction par l'IL-27 de la production du facteur de transcription T-Bet. Ce facteur module l'expression la chaîne de récepteur IL-12R β 2 permettant ainsi à la cellule d'être plus sensible à l'IL-12 (Hibbert *et al.* 2003; Takeda *et al.* 2003).

5.2.2 Cytotoxicité

D'autres tests ont ensuite été effectués pour pousser plus loin la connaissance de l'action de p28/CLF sur les cellules NK. p28/CLF permet l'augmentation des marqueurs d'activation classiques des cellules NK, le CD54 et le CD69. Des tests de cytotoxicité sur la lignée cellulaire humaine K562 montrent que p28/CLF ne module pas l'activité cytotoxique sur cette lignée. En fait, ce test de cytotoxicité nous indique que p28/CLF n'induit pas d'apoptose par le système perforine/granzyme B (Zamai *et al.* 1998). En effet, la cible utilisée, les cellules K562, qui sont des cellules erythroleucémiques, sont habituellement résistantes à l'apoptose induite par FasL (Landowski *et al.* 1999), TNF- α (Jia *et al.* 1996), et TRAIL (Di Pietro *et al.* 2001). Il serait intéressant de faire des expériences complémentaires avec d'autres cellules [par exemple les jurkat Fas+/DR4+ (clone J32) (Zamai *et al.* 1998)] sensibles aux cytotoxicités médiées par Fas, TRAIL et TNF- α .

Dans cet ordre d'idée, nous avons effectué des PCR quantitatives et les résultats préliminaires sur des NK venant de deux volontaires différents indiquent que pour l'un des donneurs l'expression de TRAIL, de TNF- α et de FasL augmentent en présence d'IL-2 ou d'IL-12. Les résultats entre les deux donneurs diffèrent beaucoup. Le système immunitaire de deux personnes différentes, considérant que ces personnes ne sont pas dans un

environnement contrôlé, leurs cellules immunitaires peuvent être plus ou moins en état d'activation ou plus ou moins réactive aux stimuli *in vitro*. Pour établir une certitude de l'augmentation de TRAIL et FasL il faudra attendre les résultats de ces expériences avec des NK provenant d'autres donneurs.

L'absence de cytotoxicité médiée par perforine/granzyme B et la possible augmentation de FasL observée par PCR quantitative induites par p28/CLF sont en accord avec l'observation que l'IFN- γ serait un facteur essentiel dans l'induction par les DC de la cytotoxicité par FasL/Fas chez les cellules NK (Yu *et al.* 2001). Ce ne sont pas les mêmes stimuli qui induisent les différents mécanismes de cytotoxicité. En effet, l'IL-12 augmente la cytotoxicité en induisant l'expression de la perforine et l'IL-18, provoque l'apoptose induite par FasL.

Conclusion

Nos études ont permis de découvrir un nouveau complexe hétérodimérique de la famille de l'IL-6/IL-12. Ce nouveau complexe composée de la sous-unité p28 de l'IL-27 et de CLF connu pour s'associer à la cytokine CLC ne semble activer ni l'IL-27R, ni le CNTFR. La caractérisation de p28/CLF nous a amené à observer que l'ARNm des deux sous-unités était produits par les DC et que le complexe avait un effet sur les cellules NK. Nos résultats semblent indiquer que p28/CLF pourrait, en synergie avec l'IL-2 ou l'IL-12, participer à l'interaction bidirectionnelle entre les cellules NK et les DC.

Nous avons vu que l'interaction entre les cellules NK et les DC était une composante primordiale de la réponse immunitaire. Cette nouvelle cytokine pourrait donc jouer un rôle dans ces interactions encore mal connues. Une meilleure compréhension des molécules intervenant dans l'interaction entre les DC et les NK permettra peut-être de produire des stratégies d'immunothérapie plus efficace en permettant d'obtenir une réponse immunitaire la plus efficace. De plus, si une étude extensive pouvait confirmer l'action biologique spécifique de p28/CLF sur les NK, cette cytokine pourrait être très bénéfique pour des thérapies dans lesquelles la stimulation des cellules NK est thérapeutique, comme dans le cas des infections virales ou des tumeurs.

Cependant, beaucoup d'informations restent à découvrir sur cette nouvelle cytokine. Par exemple, il serait intéressant de voir si la capacité de p28/CLF de moduler l'INF- γ est due à une action spécifique sur les NK CD56^{bright}. Les cellules NK CD56^{bright}, qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction, forment une sous-population de NK capables de sécréter une grande quantité de cytokines immunorégulatrices, notamment de l'IFN- γ , et ayant une très faible cytotoxicité (Cooper *et al.* 2001; Fehniger *et al.* 2003). Cette action spécifique pourrait être due à l'expression restreinte de son récepteur. Cette connaissance pourrait nous donner une piste afin de trouver le récepteur spécifique de cette nouvelle cytokine. En effet, une expression sélective de l'IL-12R à haute affinité sur les cellules NK CD56^{bright} a été décrite (Caligiuri *et al.* 1990).

Il serait également intéressant de comprendre par quel mécanisme p28/CLF agit pour augmenter la réponse à l'IL-2 ou à l'IL-12. L'activation des cellules NK par p28/CLF

provoque-t-elle l'expression des récepteurs de ces cytokines sur le même modèle que l'IL-27 induit l'expression du récepteur de l'IL-12R β 2?

Il serait également important de comparer l'activité biologique de p28/CLF avec p28. Au début de notre investigation, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, des études avaient démontré que la présence des deux sous-unités de l'IL-27 (p28 et EB13) étaient requises pour l'activation du récepteur. Des études plus récentes démontrent toutefois que p28 seul pourrait, comme le fait l'IL-27, induire la différenciation des cellules CD4⁺ Th17 (Stumhofer *et al.* 2006).

Finalement, il est important de mentionner que malgré l'hypothèse initial qui a permis la découverte de cette nouvelle cytokine, l'insensibilité à la douleur est présente chez les patients CISS I mais non II, nos résultats et les méthodes développées dans notre laboratoire nous ont mené à explorer le côté système immunitaire plutôt que le côté système nerveux. Il n'en reste pas moins qu'il sera très intéressant et important dans le futur de vérifier si cette nouvelle utilisation de CLF est la bonne réponse à cette différence de phénotype.

Bibliographie

- Akira S., Taga T., Kishimoto T. (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54:1-78
- Alexander W.S., Rakar S., Robb L., Farley A., Willson T.A., Zhang J.G., Hartley L., Kikuchi Y., Kojima T., Nomura H., Hasegawa M., Maeda M., Fabri L., Jachno K., Nash A., Metcalf D., Nicola N.A., Hilton D.J. (1999) Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* 9:605-608
- Artis D., Johnson L.M., Joyce K., Saris C., Villarino A., Hunter C.A., Scott P. (2004) Cutting edge: early IL-4 production governs the requirement for IL-27-WSX-1 signaling in the development of protective Th1 cytokine responses following *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172:4672-4675
- Artis D., Villarino A., Silverman M., He W., Thornton E.M., Mu S., Summer S., Covey T.M., Huang E., Yoshida H., Koretzky G., Goldschmidt M., Wu G.D., de Sauvage F., Miller H.R., Saris C.J., Scott P., Hunter C.A. (2004) The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* 173:5626-5634
- Arzt E. (2001) gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways. *J Clin Invest* 108:1729-1733
- Auernhammer C.J., Kopp F.B., Vlotides G., Dorn F., Isele N.B., Spottl G., Cengic N., Weber M.M., Senaldi G., Engelhardt D. (2004) Comparative study of gp130 cytokine effects on corticotroph AtT-20 cells--redundancy or specificity of neuroimmunoendocrine modulators? *Neuroimmunomodulation* 11:224-232
- Auernhammer C.J., Melmed S. (2001) The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *J Clin Invest* 108:1735-1740
- Baecher-Allan C., Hafler D.A. (2004) Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 200:273-276
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811
- Barton B.E. (1996) The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev* 16:87-109
- Baumann H., Wang Y., Morella K.K., Lai C.F., Dams H., Hilton D.J., Hawley R.G., Mackiewicz A. (1996) Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. *J Immunol* 157:284-290
- Bazan J.F. (1990) Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11:350-354
- Benigni F., Fantuzzi G., Sacco S., Sironi M., Pozzi P., Dinarello C.A., Sipe J.D., Poli V., Cappelletti M., Paonessa G., Pennica D., Panayotatos N., Ghezzi P. (1996) Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* 87:1851-1854
- Berger L.C., Hawley T.S., Lust J.A., Goldman S.J., Hawley R.G. (1994) Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. *Biochem Biophys Res Commun* 202:596-605

- Biassoni R., Cantoni C., Falco M., Verdiani S., Bottino C., Vitale M., Conte R., Poggi A., Moretta A., Moretta L. (1996) The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 183:645-650
- Biron C.A. (1997) Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol* 9:24-34
- Borck K., Beggs J.D., Brammar W.J., Hopkins A.S., Murray N.E. (1976) The construction in vitro of transducing derivatives of phage lambda. *Mol Gen Genet* 146:199-207
- Boulanger M.J., Chow D.C., Brevnova E.E., Garcia K.C. (2003) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300:2101-2104
- Boyington J.C., Brooks A.G., Sun P.D. (2001) Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. *Immunol Rev* 181:66-78
- Bravo J., Heath J.K. (2000) Receptor recognition by gp130 cytokines. *Embo J* 19:2399-2411
- Bukowski J.F., Woda B.A., Habu S., Okumura K., Welsh R.M. (1983) Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol* 131:1531-1538
- Burger R., Bakker F., Guenther A., Baum W., Schmidt-Arras D., Hideshima T., Tai Y.T., Shringarpure R., Catley L., Senaldi G., Gramatzki M., Anderson K.C. (2003) Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival. *Br J Haematol* 123:869-878
- Campbell N.A. (1995) *Biologie*. Saint-Laurent: Éditions du nouveau pédagogique Inc.
- Chalifour A., Jeannin P., Gauchat J.F., Blaecke A., Malissard M., N'Guyen T., Thieblemont N., Delneste Y. (2004) Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104:1778-1783
- Chen Q., Ghilardi N., Wang H., Baker T., Xie M.H., Gurney A., Grewal I.S., de Sauvage F.J. (2000) Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407:916-920
- Cohen S., Bigazzi P.E., Yoshida T. (1974) Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 12:150-159
- Colonna M., Samaridis J. (1995) Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268:405-408
- Colucci F., Caligiuri M.A., Di Santo J.P. (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3:413-425
- Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640

- D'Andrea A., Chang C., Franz-Bacon K., McClanahan T., Phillips J.H., Lanier L.L. (1995) Molecular cloning of NKBL1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol* 155:2306-2310
- Davis S., Aldrich T.H., Ip N.Y., Stahl N., Scherer S., Farruggella T., DiStefano P.S., Curtis R., Panayotatos N., Gascan H., et al. (1993) Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259:1736-1739
- de Bovis B., Derouet D., Gauchat J.F., Elson G., Gascan H., Delapeyriere O. (2005) clc is co-expressed with clf or cntfr in developing mouse muscles. *Cell Commun Signal* 3:1
- De Serio A., Graziani R., Laufer R., Ciliberto G., Paonessa G. (1995) In vitro binding of ciliary neurotrophic factor to its receptors: evidence for the formation of an IL-6-type hexameric complex. *J Mol Biol* 254:795-800
- DeChiara T.M., Vejsada R., Poueymirou W.T., Acheson A., Suri C., Conover J.C., Friedman B., McClain J., Pan L., Stahl N., Ip N.Y., Yancopoulos G.D. (1995) Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83:313-322
- Deller M.C., Hudson K.R., Ikemizu S., Bravo J., Jones E.Y., Heath J.K. (2000) Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure* 8:863-874
- Devergne O., Birkenbach M., Kieff E. (1997) Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12041-12046
- Devergne O., Hummel M., Koeppen H., Le Beau M.M., Nathanson E.C., Kieff E., Birkenbach M. (1996) A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* 70:1143-1153
- Di Marco A., Gloaguen I., Graziani R., Paonessa G., Saggio I., Hudson K.R., Laufer R. (1996) Identification of ciliary neurotrophic factor (CNTF) residues essential for leukemia inhibitory factor receptor binding and generation of CNTF receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9247-9252
- Di Pietro R., Secchiero P., Rana R., Gibellini D., Visani G., Bemis K., Zamai L., Miscia S., Zauli G. (2001) Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)--mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1. *Blood* 97:2596-2603
- Eidenschenk C., Dunne J., Jouanguy E., Fourlinnie C., Gineau L., Bacq D., McMahon C., Smith O., Casanova J.L., Abel L., Feighery C. (2006) A novel primary immunodeficiency with specific natural-killer cell deficiency maps to the centromeric region of chromosome 8. *Am J Hum Genet* 78:721-727
- Elson G.C., Graber P., Losberger C., Herren S., Gretener D., Menoud L.N., Wells T.N., Kosco-Vilbois M.H., Gauchat J.F. (1998) Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol* 161:1371-1379

- Elson G.C., Lelievre E., Guillet C., Chevalier S., Plun-Favreau H., Froger J., Suard I., de Coignac A.B., Delneste Y., Bonnefoy J.Y., Gauchat J.F., Gascan H. (2000) CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3:867-872
- Fehniger T.A., Cooper M.A., Nuovo G.J., Cella M., Facchetti F., Colonna M., Caligiuri M.A. (2003) CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052-3057
- Fehniger T.A., Shah M.H., Turner M.J., VanDeusen J.B., Whitman S.P., Cooper M.A., Suzuki K., Wechser M., Goodsaid F., Caligiuri M.A. (1999) Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 162:4511-4520
- Fitzgerald K., O'Neill, LAJ., Gearing, A., Callard RE. (2001) *The cytokine factsbook*. San Diego: Academic Press
- Forger N.G., Prevette D., deLapeyriere O., de Bovis B., Wang S., Bartlett P., Oppenheim R.W. (2003) Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* 23:8854-8858
- Fujitani Y., Nakajima K., Kojima H., Nakae K., Takeda T., Hirano T. (1994) Transcriptional activation of the IL-6 response element in the junB promoter is mediated by multiple Stat family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1181-1187
- Grotzinger J., Kurapkat G., Wollmer A., Kalai M., Rose-John S. (1997) The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins* 27:96-109
- Hahn A.F., Jones D.L., Knappskog P.M., Boman H., McLeod J.G. (2006) Cold-induced sweating syndrome A report of two cases and demonstration of genetic heterogeneity. *J Neurol Sci*
- Hamano S., Himeno K., Miyazaki Y., Ishii K., Yamanaka A., Takeda A., Zhang M., Hisaeda H., Mak T.W., Yoshimura A., Yoshida H. (2003) WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19:657-667
- Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Muller-Newen G., Schaper F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20
- Heinrich P.C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2):297-314
- Hermanns H.M., Radtke S., Haan C., Schmitz-Van de Leur H., Tavernier J., Heinrich P.C., Behrmann I. (1999) Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130. *J Immunol* 163:6651-6658

- Hibbert L., Pflanz S., De Waal Malefyt R., Kastelein R.A. (2003) IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 23:513-522
- Hirano T. (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-284
- Hirano T., Nakajima K., Hibi M. (1997) Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:241-252
- Holscher C., Holscher A., Ruckerl D., Yoshimoto T., Yoshida H., Mak T., Saris C., Ehlers S. (2005) The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol* 174:3534-3544
- Houchins J.P., Lanier L.L., Niemi E.C., Phillips J.H., Ryan J.C. (1997) Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* 158:3603-3609
- Houchins J.P., Yabe T., McSherry C., Bach F.H. (1991) DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173:1017-1020
- Hudson K.R., Vernallis A.B., Heath J.K. (1996) Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. *J Biol Chem* 271:11971-11978
- Ip N.Y., McClain J., Barrezueta N.X., Aldrich T.H., Pan L., Li Y., Wiegand S.J., Friedman B., Davis S., Yancopoulos G.D. (1993) The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron* 10:89-102
- Janeway C.A., Jr., Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (2003) *Immunobiologie*. Paris: De Boeck Université
- Jia L., Kelsey S.M., Grahn M.F., Jiang X.R., Newland A.C. (1996) Increased activity and sensitivity of mitochondrial respiratory enzymes to tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition is associated with increased cytotoxicity in drug-resistant leukemic cell lines. *Blood* 87:2401-2410
- Knappskog P.M., Majewski J., Livneh A., Nilsen P.T., Bringsli J.S., Ott J., Boman H. (2003) Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum Genet* 72:375-383
- Kraves S., Weitz C.J. (2006) A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci* 9:212-219
- Lai C.F., Ripperger J., Morella K.K., Wang Y., Gearing D.P., Horseman N.D., Campos S.P., Fey G.H., Baumann H. (1995) STAT3 and STAT5B are targets of two different signal pathways activated by hematopoietin receptors and control transcription via separate cytokine response elements. *J Biol Chem* 270:23254-23257
- Landowski T.H., Shain K.H., Oshiro M.M., Buyuksal I., Painter J.S., Dalton W.S. (1999) Myeloma cells selected for resistance to CD95-mediated apoptosis are not cross-

- resistant to cytotoxic drugs: evidence for independent mechanisms of caspase activation. *Blood* 94:265-274
- Lanier L.L. (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:359-393
- Lanier L.L. (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274
- Lanier L.L., Le A.M., Civin C.I., Loken M.R., Phillips J.H. (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:4480-4486
- Lanier L.L., Testi R., Bindl J., Phillips J.H. (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169:2233-2238
- Ljunggren H.G., Karre K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244
- Lucas S., Ghilardi N., Li J., de Sauvage F.J. (2003) IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15047-15052
- Lutticken C., Wegenka U.M., Yuan J., Buschmann J., Schindler C., Ziemiecki A., Harpur A.G., Wilks A.F., Yasukawa K., Taga T., et al. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263:89-92
- Masu Y., Wolf E., Holtmann B., Sendtner M., Brem G., Thoenen H. (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365:27-32
- Meylan E., Tschopp J., Karin M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442:39-44
- Muir A.J., Sylvestre P.B., Rockey D.C. (2006) Interferon gamma-1b for the treatment of fibrosis in chronic hepatitis C infection. *J Viral Hepat* 13:322-328
- Neddermann P., Graziani R., Ciliberto G., Paonessa G. (1996) Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. *J Biol Chem* 271:30986-30991
- Nitta T., Yagita H., Sato K., Okumura K. (1989) Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 170:1757-1761
- Oppenheim J.J., Gery I. (1993) From lymphokine to interleukin 1 (IL-1). *Immunol Today* 14:232-234
- Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J.C., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K., Zonin F., Vaisberg E., Churakova T., Liu M., Gorman D., Wagner J., Zurawski S., Liu Y., Abrams J.S., Moore K.W., Rennick D., de Waal-Malefyt R., Hannum C., Bazan J.F., Kastelein R.A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-725
- Orange J.S. (2002) Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* 4:1545-1558

- Paonessa G., Graziani R., De Serio A., Savino R., Ciapponi L., Lahm A., Salvati A.L., Toniatti C., Ciliberto G. (1995) Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *Embo J* 14:1942-1951
- Paty D.W., Li D.K. (1993) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43:662-667
- Paul W.E. (2003) *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Pearl J.E., Khader S.A., Solache A., Gilmartin L., Ghilardi N., deSavauge F., Cooper A.M. (2004) IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice. *J Immunol* 173:7490-7496
- Perret D., Guillet C., Elson G., Froger J., Plun-Favreau H., Rousseau F., Chabbert M., Gauchat J.F., Gascan H. (2004) Two different contact sites are recruited by cardiotrophin-like cytokine (CLC) to generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFRalpha composite cytokines. *J Biol Chem* 279:43961-43970
- Pflanz S., Hibbert L., Mattson J., Rosales R., Vaisberg E., Bazan J.F., Phillips J.H., McClanahan T.K., de Waal Malefyt R., Kastelein R.A. (2004) WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172:2225-2231
- Pflanz S., Timans J.C., Cheung J., Rosales R., Kanzler H., Gilbert J., Hibbert L., Churakova T., Travis M., Vaisberg E., Blumenschein W.M., Mattson J.D., Wagner J.L., To W., Zurawski S., McClanahan T.K., Gorman D.M., Bazan J.F., de Waal Malefyt R., Rennick D., Kastelein R.A. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16:779-790
- Plun-Favreau H., Elson G., Chabbert M., Froger J., deLapeyriere O., Lelievre E., Guillet C., Hermann J., Gauchat J.F., Gascan H., Chevalier S. (2001) The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *Embo J* 20:1692-1703
- Radtke S., Hermanns H.M., Haan C., Schmitz-Van De Leur H., Gascan H., Heinrich P.C., Behrmann I. (2002) Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J Biol Chem* 277:11297-11305
- Reis e Sousa C. (2001) Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 14:495-498
- Robertson M.J., Ritz J. (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76:2421-2438
- Robinson D.S., O'Garra A. (2002) Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* 16:755-758
- Rousseau F., Gauchat J.F., McLeod J.G., Chevalier S., Guillet C., Guilhot F., Cognet I., Froger J., Hahn A.F., Knappskog P.M., Gascan H., Boman H. (2006) Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor,

- leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10068-10073
- Schmidt-Ott K.M., Yang J., Chen X., Wang H., Paragas N., Mori K., Li J.Y., Lu B., Costantini F., Schiffer M., Bottinger E., Barasch J. (2005) Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol* 16:1993-2002
- Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189
- Schuettauf F., Zurakowski D., Quinto K., Varde M.A., Besch D., Laties A., Anderson R., Wen R. (2005) Neuroprotective effects of cardiotrophin-like cytokine on retinal ganglion cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243:1036-1042
- Senaldi G., Stolina M., Guo J., Faggioni R., McCabe S., Kaufman S.A., Van G., Xu W., Fletcher F.A., Boone T., Chang M.S., Sarmiento U., Cattley R.C. (2002) Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol* 168:5690-5698
- Senaldi G., Varnum B.C., Sarmiento U., Starnes C., Lile J., Scully S., Guo J., Elliott G., McNinch J., Shaklee C.L., Freeman D., Manu F., Simonet W.S., Boone T., Chang M.S. (1999) Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11458-11463
- Shi Y., Wang W., Yourey P.A., Gohari S., Zukauskas D., Zhang J., Ruben S., Alderson R.F. (1999) Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* 262:132-138
- Simpson R.J., Hammacher A., Smith D.K., Matthews J.M., Ward L.D. (1997) Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 6:929-955
- Smyth M.J., Cretney E., Kelly J.M., Westwood J.A., Street S.E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S.L., Degli-Esposti M.A., Hayakawa Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-510
- Sohar E., Shoenfeld Y., Udassin R., Magazanik A., Revach M. (1978) Cold-induced profuse sweating on back and chest. A new genetic entity? *Lancet* 2:1073-1074
- Sprecher C.A., Grant F.J., Baumgartner J.W., Presnell S.R., Schrader S.K., Yamagiwa T., Whitmore T.E., O'Hara P.J., Foster D.F. (1998) Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 246:82-90
- Stahl N., Boulton T.G., Farruggella T., Ip N.Y., Davis S., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen O., Barbieri G., Pellegrini S., et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263:92-95
- Stumhofer J.S., Laurence A., Wilson E.H., Huang E., Tato C.M., Johnson L.M., Villarino A.V., Huang Q., Yoshimura A., Sehy D., Saris C.J., O'Shea J.J., Hennighausen L., Ernst M., Hunter C.A. (2006) Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 7:937-945

- Suzuki N., Suzuki T., Engleman E.G. (1991) Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells. *J Exp Med* 173:1451-1461
- Taga T., Kishimoto T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819
- Takahashi R., Yokoji H., Misawa H., Hayashi M., Hu J., Deguchi T. (1994) A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* 7:79-84
- Takeda A., Hamano S., Yamanaka A., Hanada T., Ishibashi T., Mak T.W., Yoshimura A., Yoshida H. (2003) Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170:4886-4890
- Thoreau E., Petridou B., Kelly P.A., Djiane J., Mornon J.P. (1991) Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett* 282:26-31
- Uemura A., Takizawa T., Ochiai W., Yanagisawa M., Nakashima K., Taga T. (2002) Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18:1-7
- Vallières L., Rivest S. (2000) L'interleukine-6 dans le système nerveux central. *Médecine/sciences* 16:936-944
- Varghese J.N., Moritz R.L., Lou M.Z., Van Donkelaar A., Ji H., Ivancic N., Branson K.M., Hall N.E., Simpson R.J. (2002) Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15959-15964
- Villarino A., Hibbert L., Lieberman L., Wilson E., Mak T., Yoshida H., Kastelein R.A., Saris C., Hunter C.A. (2003) The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19:645-655
- Villarino A.V., Huang E., Hunter C.A. (2004) Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* 173:715-720
- Vremec D., O'Keeffe M., Hochrein H., Fuchsberger M., Caminschi I., Lahoud M., Shortman K. (2006) Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood*
- Wagtmann N., Biassoni R., Cantoni C., Verdiani S., Malnati M.S., Vitale M., Bottino C., Moretta L., Moretta A., Long E.O. (1995) Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 2:439-449
- Ward L.D., Howlett G.J., Discolo G., Yasukawa K., Hammacher A., Moritz R.L., Simpson R.J. (1994) High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* 269:23286-23289
- Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R., Gavrieli M., Murphy K.M. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24:677-688

- Yamanaka A., Hamano S., Miyazaki Y., Ishii K., Takeda A., Mak T.W., Himeno K., Yoshimura A., Yoshida H. (2004) Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 172:3590-3596
- Yasukawa K., Saito T., Fukunaga T., Sekimori Y., Koishihara Y., Fukui H., Ohsugi Y., Matsuda T., Yawata H., Hirano T., et al. (1990) Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. *J Biochem (Tokyo)* 108:673-676
- Yawata H., Yasukawa K., Natsuka S., Murakami M., Yamasaki K., Hibi M., Taga T., Kishimoto T. (1993) Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *Embo J* 12:1705-1712
- Yoshida H., Hamano S., Senaldi G., Covey T., Faggioni R., Mu S., Xia M., Wakeham A.C., Nishina H., Potter J., Saris C.J., Mak T.W. (2001) WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. *Immunity* 15:569-578
- Yu Y., Hagihara M., Ando K., Gansuvd B., Matsuzawa H., Tsuchiya T., Ueda Y., Inoue H., Hotta T., Kato S. (2001) Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J Immunol* 166:1590-1600
- Zahn S., Wirtz S., Birkenbach M., Blumberg R.S., Neurath M.F., von Stebut E. (2005) Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 35:1106-1112
- Zamai L., Ahmad M., Bennett I.M., Azzoni L., Alnemri E.S., Perussia B. (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188:2375-2380
- Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E., Jr. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264:95-98
- Zitvogel L. (2002) Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med* 195:F9-14

Annexe 1-Résultats

Figure 1 : Activation des T98G. La lignée T98G a été maintenue dans du RPMI 1640 (Biowhittaker Cambrex, Verviers, Belgique) en présence de 10% sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France) et 2 mM L-glutamine (Biowhittaker Cambrex). Les cellules ont subi une déplétion en sérum sur une nuit et une activation de 10 minutes avec 500ng/ml de d'IL-27, d'oncostatine ou de hp28/CLF. La réaction a été arrêtée avec du PBS froid et les cellules resuspendues dans du tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH7.4, 100mM NaCl, 50mM NaF, 40mM β -glycérophosphate, 5mM EDTA, 1% Triton). Les lysats cellulaires ont été soumis à un immunobuvardage de type Western et ont été analysés avec les anticorps polyclonaux anti-phospho-705-STAT3-HRP, anti-phospho-701-Stat1-HRP et anti-phospho-MAPK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

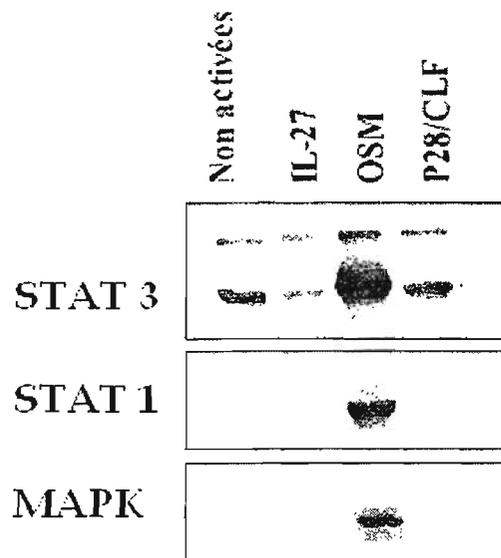


Figure 2 : Liaison de la cytokine p28/CLF sur différents transfectants. Des transfectants cos exprimant IL-13R, IL-12R ou IL-23R ont été incubés avec p28/CLF. La liaison est révélée avec un anticorps de souris anti-protC et ensuite un anticorps de chèvre anti-souris IgG Alexa Fluor 633. L'histogramme plein représente la liaison de p28/CLF sur des cellules cos non-transfectées (mock). Aucune liaison n'est détectée.

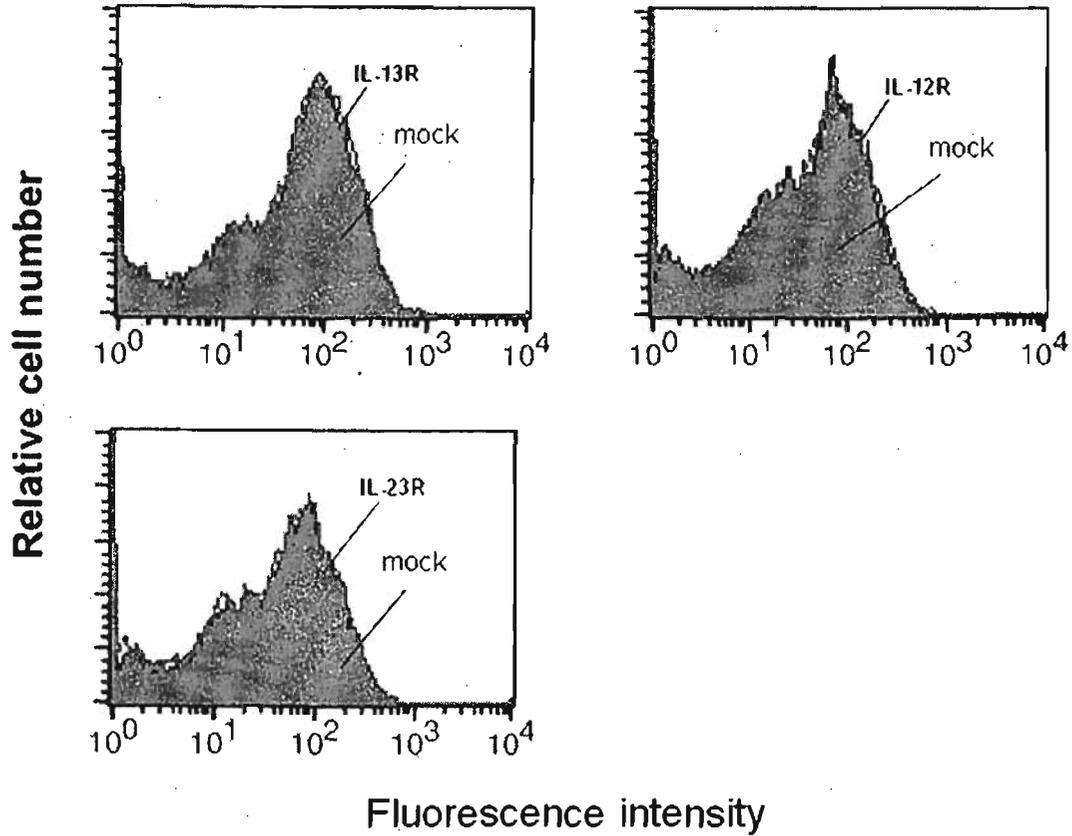


Figure 3 : Dosage de p28/CLF par ELISA dans les surnageants de DC activées au LPS. Le dosage de p28/CLF a été fait de surnageant de cellules 293 exprimant p28/CLF , p28 seul, CLF seul ou de DC provenant de 2 volontaires sains différents, activées ou non par 20ng de LPS en présence de p28/CLF purifié. Les anticorps utilisés sont ; l'anticorps primaire un anti-hp28 monoclonal de rat (3ug/ml) suivi d'un anticorps anti-CLF maison biotinylée en utilisant le NHS-LC-Biotin (3mg/ml) (Pierce), et d'un streptavidine-HRP(1/1000) (Amersham).

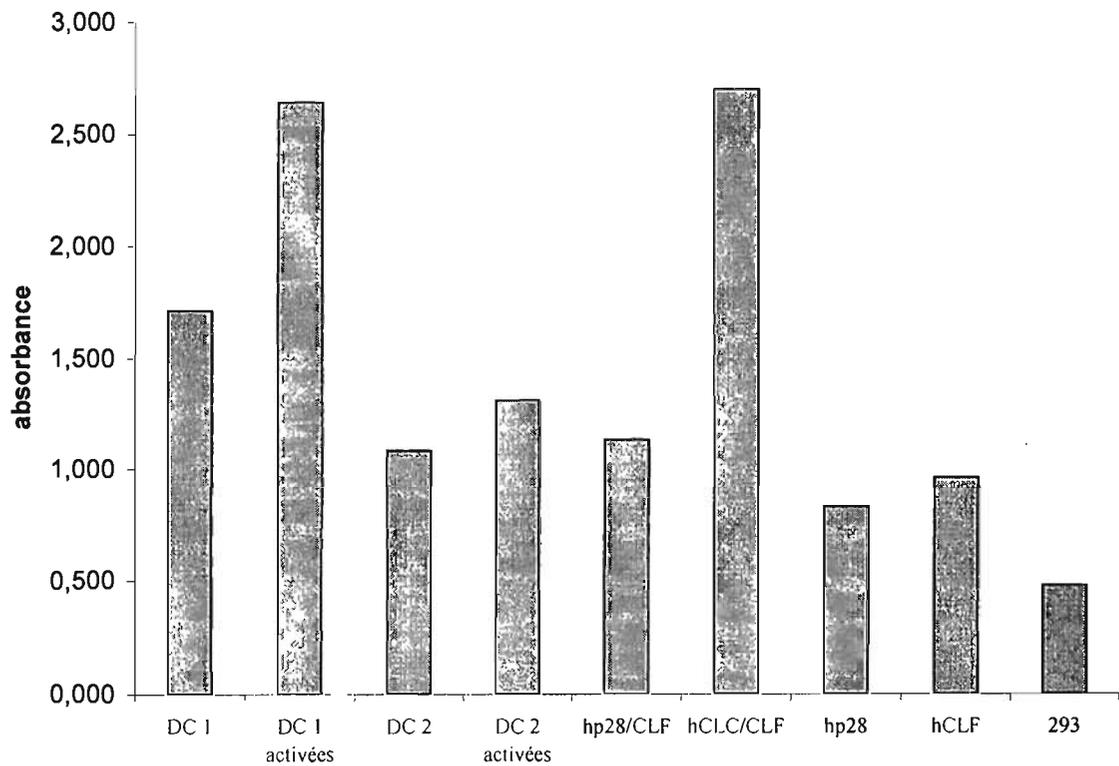
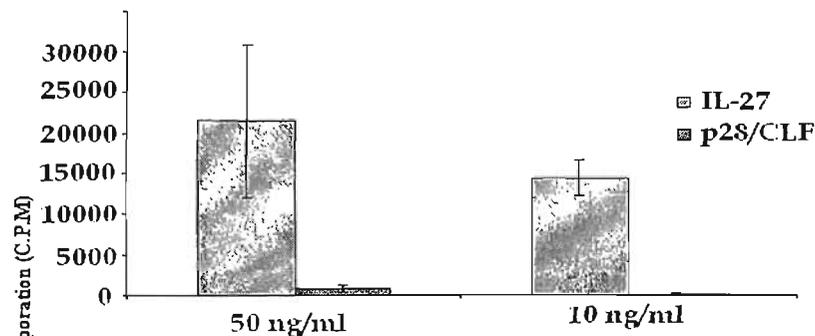


Figure 4 : Prolifération des cellules T CD4+ naïves (A) et mémoires (B). Des cellules périphérique mononuclée humaines provenant de donneurs sains ont été isolées par un gradient de densité standard par centrifugation sur du Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech). Les CD4+ naïves et mémoires ont été séparées par cytométrie en flux (FACSAria cytofluorometer (BD Biosciences) selon les marqueurs CD45RA et CD45RO en utilisant un mAb anti-CD4 marqué à l'APC, mAb anti-CD45RA marqué au PE, et un mAb anti-CD45RO marqué au FITC (tous de BD Biosciences). La pureté obtenue est de 95.5%. Les CD4+ naïves et mémoire purifiées ont été incubé en triplicata (40 000 cellules/puits dans une plaque 96 puits) aux dilutions indiquées pendant 5 jours dans du RPMI 1640 (Biowhittaker Cambrex, Verviers, Belgique) en présence de 10% sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France) 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (tous de Biowhittaker Cambrex). La plaque de 96 puits à préalablement été incubée sur la nuit avec un anti-CD3 (10ug/ml) et un anti-CD28 (1/200). La prolifération est mesurée par l'incorporation de 0.25 µCi/puits thymidine [³H] (Amersham Pharmacia Biotech).

A



B

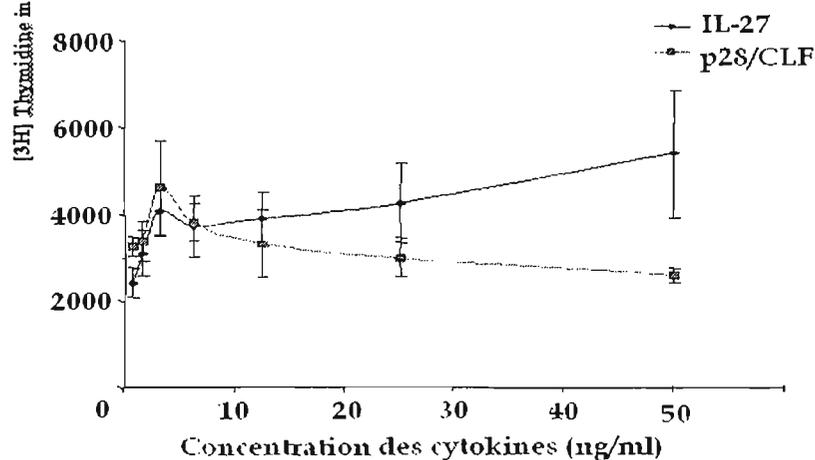
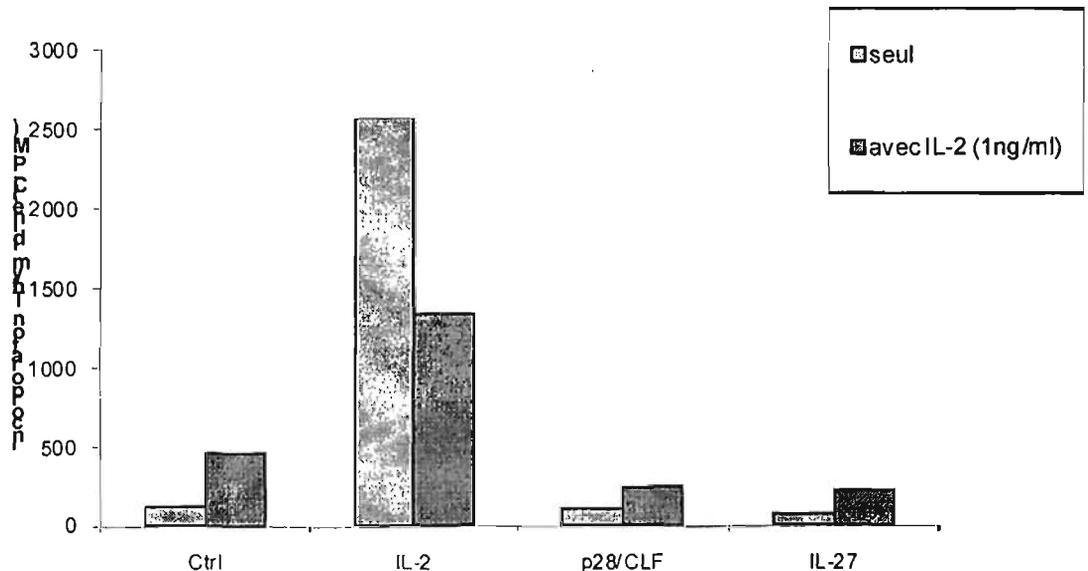


Figure 5 : Prolifération des cellules T régulatrices CD25⁺. Des cellules périphériques mononucléées humaines provenant de donneurs sains ont été isolées par un gradient de densité standard par centrifugation sur du Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Les cellules Treg ont été isolées par cytométrie en flux avec les anticorps CD4-APC, CD25-PE. Les Tregs purifiées ont ensuite été incubées en triplicata (40 000 cellules/puits dans une plaque 96 puits) pendant 5 jours dans du RPMI 1640 (Biowhittaker Cambrex, Verviers, Belgique) en présence de 10% sérum de veau fœtal (Biowest, Nuillé, France) 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (tous de Biowhittaker Cambrex). Les cellules sont incubées en présence d'une faible quantité de cytokine activatrice; l'IL-2 (1 ng/ml) et de p28/CLF, d'IL-27 ou d'IL-2 à 50ng/ml. La prolifération est mesurée par l'incorporation de la thymidine [³H] (MP Biomedicals, Aurora, OH)



Annexe 2-Contribution des auteurs

Toutes les constructions de vecteur, les expériences de co-immunoprécipitation, les purifications de protéines et les expériences de liaison ont été faites à Montréal principalement par la première auteure. Toutes les expériences utilisant des cellules primaires humaines ont été faites par nos collaborateurs d'Angers avec notre cytokine purifiée et la première auteure a assisté à plusieurs de ces expériences lors d'un stage de 6 semaines dans leur laboratoire.

Il est prévu que l'article sera soumis dans Journal of Immunology.