

Université de Montréal

Les ligands du récepteur au CNTF dans le système immunitaire

par

Isabelle Cagnet

Département de Pharmacologie, École de médecine

Université de Montréal

PhD Pharmacologie

© Cagnet Isabelle, 2006



W
4
U58
2006
v. 132

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal

Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Les ligands du récepteur au CNTF dans le système immunitaire

présentée par :

Isabelle Cognet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gaucher Jean-François, Directeur de thèse

Beaulieu Pierre, Président de jury

Pichette Vincent, Membre du jury

Steimle Viktor, Membre externe

Thèse acceptée le



Résumé Français

Le ciliary neurotrophic factor (CNTF) et la cardiotrophin-like cytokine (CLC) sont deux cytokines de la famille de l'interleukine (IL) 6 qui se lient au même récepteur, le récepteur au CNTF (CNTFR), composé du CNTFR α , du leukaemia inhibitory factor receptor β (LIFR β) et de la glycoprotéine 130 (gp130). Le CNTF ne possède pas de peptide signal et n'est probablement relâché que par des cellules endommagées. Par contre, le CLC humain, qui possède un peptide signal, n'est pas sécrété seul mais doit interagir avec le cytokine like factor 1 (CLF) ou le CNTFR α soluble (sCNTFR α) afin d'être activement sécrété. Le CNTF possède surtout des effets neuroprotecteurs et a été testé en essais pré-cliniques et cliniques pour le traitement de différentes maladies neurodégénératives. Le CNTF présente cependant des variations dans la spécificité de liaison à son récepteur selon les espèces. En effet, en plus du CNTFR, le CNTF de rat peut activer le LIFR (un hétérodimère de LIFR β et gp130) alors que le CNTF humain peut se lier à la chaîne α du récepteur de l'IL6 (IL6R α) couplé au LIFR. Ces caractéristiques pourraient expliquer en partie les effets secondaires observés dans les essais cliniques. Afin d'évaluer les effets thérapeutiques du CNTF de souris, nous avons caractérisé la spécificité d'interaction du CNTF de souris avec son récepteur. Le CNTF active strictement le CNTFR mais ne peut pas se lier au LIFR ou à l'IL6R α . Nous avons aussi produit une forme biotinylée du CNTF de souris permettant la détection de cellules exprimant le CNTFR et donc une meilleure appréciation des applications thérapeutiques du CNTF. Nous avons ensuite évalué le rôle thérapeutique du CNTF de souris dans un modèle murin de sclérose en plaques et montré qu'il avait un effet protecteur principalement via l'inhibition de l'inflammation au niveau de la moelle épinière. Le CLC, comme le CNTF, est neuroprotecteur mais possède aussi un rôle au niveau du système immunitaire particulièrement au niveau de la prolifération des lymphocytes B. Il est possible que CLC se lie au niveau des lymphocytes B à un

récepteur spécifique à CLC car le CNTFR α n'a pas été détecté sur ces cellules. Nous avons validé l'utilisation d'une forme biotinylée du complexe CLC/CLF de souris pour la détection de cellules exprimant le CNTFR. Cette cytokine a permis la détection du nouveau récepteur spécifique à CLC sur les lymphocytes B activés. L'ARNm de CLC a été retrouvé au niveau de cellules n'exprimant ni le CLF ni le CNTFR α laissant supposer un nouveau mécanisme de sécrétion de CLC dans ces cellules. En effet, nous avons démontré que le CLC de souris peut s'associer avec l'Epstein-Barr virus induced gene 3 (EBI3), un récepteur soluble de la famille de l'IL12, et que la formation de ce complexe induit la sécrétion active de CLC. Cette nouvelle cytokine composite est un candidat potentiel pour la liaison au nouveau récepteur de CLC au niveau des lymphocytes B. Ces résultats permettront une meilleure évaluation des effets thérapeutiques et secondaires de CLC pour son essai en clinique.

Mots clés : Cardiotrophin-like cytokine; ciliary neurotrophic factor; CNTF receptor α ; cytokine like factor 1; Epstein-Barr virus induced gene 3; encéphalomyélite auto-immune expérimentale ; cytokine biotinylée; cytokine de la famille IL6/12 ; maladie neurodégénérative ; système immunitaire.

Résumé anglais

The ciliary neurotrophic factor (CNTF) and the cardiotrophin-like cytokine (CLC) are two members of the interleukin (IL) 6 family which signal via the same receptor, the CNTF receptor (CNTFR), composed of CNTFR α , the leukaemia inhibitory factor receptor β (LIFR β) and the glycoprotein 130 (gp130). CNTF has no peptide signal and is believed to be released by damaged cells. Whereas human CLC possesses a peptide signal, it is not secreted alone. CLC must associate with cytokine like factor 1 (CLF) or soluble CNTFR α (sCNTFR α) to be actively secreted. CNTF is mainly known for its neuroprotective effect and has been tested in pre-clinical and clinical trials for the treatment of neurodegenerative diseases. However, CNTF differs slightly in the specificities versus its receptor depending on the species : in addition to CNTFR, rat CNTF has been shown to activate the LIFR (a heterodimer of LIFR β and gp130) whereas human CNTF can bind and activate a receptor comprising the IL6 receptor α chain (IL6R α) and the LIFR. These observations could explain some of the secondary side effects observed in clinical studies. To correctly evaluate the beneficial effects of CNTF in a mouse model of Multiple Sclerosis (MS), we characterised the specificity of mouse (m) CNTF and found that it strictly signals via the CNTFR without any action on the LIFR or IL6R α . We also produce a biotinylated mCNTF allowing the detection of CNTFR expressing cells by flow cytometry. This should help evaluation of the roles of CNTF and its therapeutic applications. This mCNTF was then evaluated in a mouse model of MS and has been shown to have protective effects mainly by inhibiting spinal cord inflammation.

CLC, as CNTF, induces neuroprotection but has also physiological roles on the immune system mainly on B cells proliferation. The molecular mechanisms of action of CLC on B cells are not known and are thought to be mediated by a new CLC receptor since CNTFR α has not been detected on these cells. We validated a biotinylated mCLC/CLF complex as a sensitive tool for CNTFR detection. It was

also shown to allow the detection of a receptor specific for mCLC and not CNTF on activated B cells. Moreover, mCLC was shown to be expressed at the mRNA level in cells which do not express neither CLF nor CNTFR α . We demonstrated that mCLC can associate with another soluble receptor of the IL12 family, the Epstein-Barr virus induced gene 3 (EBI3), to be efficiently secreted. This novel composite cytokine could be the ligand for the new CLC receptor found on B cells. These results should help for the evaluation of beneficial versus side effects of CLC in clinical trials.

Keywords: Cardiotrophin-like cytokine; ciliary neurotrophic factor; CNTF receptor α ; cytokine like factor 1; experimental autoimmune encephalomyelitis; Epstein-Barr virus induced gene 3; biotinylated cytokine; IL6/IL12 cytokine family; neurodegeneratives disease; immune system.

Table des matières

RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	I
RÉSUMÉ ANGLAIS	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS	XV
INTRODUCTION	1
I. LES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'INTERLEUKINE (IL) 6.....	1
<i>I. 1. Caractéristiques générales des cytokines.....</i>	<i>1</i>
<i>I. 2. Caractéristiques générales des cytokines de la famille de l'IL6.....</i>	<i>3</i>
I.2.1. Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL6	3
I.2.2. Structure des cytokines de la famille de l'IL6.....	4
I.2.3. Les récepteurs de la famille de l'IL6	5
I.2.4. La liaison récepteur/cytokine.....	9
I.2.5. Les voies de signalisation.....	12
I.2.5.1. La voie JAK/STAT.....	12
I.2.5.2. La voie des MAPKs.....	15
I.2.5.3. La voie de la PI3K.....	16
I.2.6. Les activités biologiques des cytokines de la famille de l'IL6.....	17
<i>I. 3. Le ciliary neurotrophic factor (CNTF).....</i>	<i>17</i>
I.3.1. Identification du CNTF et du CNTFR α	17

I.3.2. Caractéristiques structurales du CNTF et du CNTFR α	18
I.3.2.1. Le CNTF	18
I.3.2.2. Le CNTFR α	19
I.3.3. Expression du CNTF et du CNTFR α	20
I.3.3.1. Le CNTF	20
I.3.3.2. Le CNTFR α	20
I.3.4. Voie de signalisation du CNTF	21
I.3.5. Les mutations du CNTF et du CNTFR α	22
I.3.6. Activités biologiques du CNTF	24
I.3.6.1. Activités au niveau du système nerveux	24
I.3.6.2. Le CNTF et la sclérose en plaques	25
I.3.6.3. Rôle du CNTF au niveau des muscles squelettiques.....	28
I.3.7. Les essais cliniques avec le CNTF	29
I. 4. La cardiotrophin-like cytokine (CLC)	31
I.4.1. Identification de CLC	31
I.4.2. Caractéristiques structurales de CLC	31
I.4.3. Expression de CLC.....	32
I.4.4. Voie de sécrétion de CLC.....	33
I.4.4.1. Interaction avec CLF	33
I.4.4.2. Interaction avec sCNTFR α	35
I.4.4.3. Autres modes de sécrétion possibles	36
I.4.5. Voie de signalisation de CLC.....	37
I.4.5.1. La voie de signalisation de CLC à travers le récepteur au CNTF .	37
I.4.5.2. CLC induit la voie des JAKs/STATs	38
I.4.5.3. Les autres voies de signalisation de CLC.....	40
I.4.6. Activités biologiques de CLC	40
I.4.6.1. Activités neurotrophiques.....	40
I.4.6.2. Activités immunomodulatrices.....	41
I.4.6.3. Activités neuroimmunoendocrines.....	42

I.4.6.4. Autres activités de CLC.....	43
I.4.7. Le « Cold Induced Sweating Syndrome » ou CISS.....	44
I.4.7.1. CISS1	44
I.4.7.2. CISS2.....	45
I.4.7.3. Rôles potentiels de CLC et CLF	46
II. LES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL12.....	47
II.1. Généralités	47
II.2. L'IL12	48
II.2.1. Caractéristiques de l'IL12	48
II.2.2. Caractéristiques du récepteur à l'IL12	49
II.2.3. Expression de l'IL12 et de l'IL12R	50
II.2.3.1. L'IL12	50
II.2.3.2. L'IL12R.....	51
II.2.4. Voies de signalisation	51
II.2.5. Activités biologiques.....	53
II.2.5.1. Activités biologiques de l'IL12.....	53
II.2.5.2. Analyse des mutants de l'IL12 et de l'IL12R	53
II.2.5.3. Activités biologiques de p80	54
II.3. L'IL23	55
II.3.1. Caractéristiques de l'IL23	55
II.3.2. Caractéristiques du récepteur à l'IL23	55
II.3.3. Expression de l'IL23 et de l'IL23R	55
II.3.4. Voies de signalisation	56
II.3.5. Activités biologiques de l'IL23	56
II.4. Les complexes formés avec EBI3	57
II.4.1. EBI3	57
II.4.1.1. Caractéristiques structurale de EBI3	57
II.4.1.2. Expression de EBI3	58
II.4.1.3. Rôle de EBI3 à travers l'analyse des souris EBI3 ^{-/-}	58

II.4.2. Le complexe p35/EBI3	59
II.4.3. L'IL27	59
II.4.3.1. Caractéristiques de l'IL27	59
II.4.3.2. Caractéristiques du récepteur à l'IL27	60
II.4.3.3. Expression de l'IL27 et de son récepteur	61
II.4.3.3.1. L'IL27	61
II.4.3.3.2. L'IL27R.....	61
II.4.3.4. Voies de signalisation	62
II.4.3.5. Activités biologiques.....	62
II.4.3.5.1. Activités pro et anti-inflammatoires.....	62
II.4.3.5.1.1. Activités pro-inflammatoires au niveau de la réponse Th1	
.....	62
II.4.3.5.1.1.1. Rôles spécifiques à l'IL27.....	62
II.4.3.5.1.1.2. Récapitulatifs des actions des cytokines de la famille	
de l'IL12 au niveau de la réponse Th1	63
II.4.3.5.1.2. Activités inhibitrices de l'IL27	64
II.4.3.5.1.3. Conclusion.....	65
II.4.3.5.2. Autres activités biologiques de l'IL27	68
II.4.3.5.3. Rôle au niveau des maladies inflammatoires du CNS	68
II.4.4. Autres complexes de EBI3	69
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	70
ARTICLES.....	72
ARTICLE 1 : EXPRESSION OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOUSE CILIARY NEUROTROPHIC	
FACTOR (CNTF) AND SOLUBLE CNTFR α IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> AND	
CHARACTERIZATION OF THEIR FUNCTIONAL SPECIFICITIES.	72
<i>Publication : European Cytokine Network, September 2004, Vol.15, No 3, pages</i>	
<i>255-62.</i>	72

ARTICLE 2 : CARDIOTROPHIN-LIKE CYTOKINE LABELLING USING BIR A BIOTIN LIGASE: A SENSITIVE TOOL TO STUDY RECEPTOR EXPRESSION BY IMMUNE AND NON- IMMUNE CELLS.....	96
<i>Publication : Journal of Immunological Methods. 2005, Vol.301, No 1-2, pages 53-65.</i>	96
ARTICLE 3 : CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR BIOTINYLATED USING BIRA BIOTIN LIGASE: A FLOW CYTOMETRY REAGENT FOR RECEPTOR DETECTION.	127
<i>Publication envisagée : The journal of Neuroscience Methods.</i>	127
ARTICLE 4 : EPSTEIN-BARR VIRUS INDUCED GENE 3 (EBI3) AND CARDIOTROPHIN- LIKE CYTOKINE FORM A COMPOSITE CYTOKINE*	151
<i>Publication envisagée : The Journal of Biological Chemistry.</i>	151
DISCUSSION	190
I. LES LIGANDS DU RÉCEPTEUR AU CNTF COMME AGENT THÉRAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DE LA SCLÉROSE EN PLAQUES.....	190
II. UTILISATION DE CYTOKINES BIOTINYLÉES	199
III. CLC/EBI3, UNE CYTOKINE CHARNIÈRE ENTRE LES FAMILLES DE L'IL6 ET DE L'IL12	206
CONCLUSION	215
BIBLIOGRAPHIE	217
ANNEXE	232
ARTICLE 5 : CONTINUED ADMINISTRATION OF CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR PROTECTS MICE FROM INFLAMMATORY PATHOLOGY IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS.	232
<i>Publication : The American Journal of Pathology, August 2006, Vol. 169, No 2, pages 584-98.</i>	232

Liste des tableaux

<u>TABLE I</u> : EXEMPLE DE TRAITEMENT À BASE DE CYTOKINES UTILISÉES EN CLINIQUE	2
<u>TABLE II</u> : CLASSIFICATION DES CYTOKINES SELON LA STRUCTURE DE LEUR RÉCEPTEUR.....	3
<u>TABLE III</u> : LES SITES DE LIAISON DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL6 À LEURS RÉCEPTEURS.....	10

Liste des figures

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL6.....	5
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES RÉCEPTEURS DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL6.....	7
FIGURE 3 : LA COMPOSITION DES RÉCEPTEURS DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL6 ET LEURS LIGANDS	8
FIGURE 4 : CARACTÉRISATION DES SITES DE LIAISON CYTOKINES/RÉCEPTEURS...	11
FIGURE 5 : ORGANISATION STRUCTURALE DES JAKS ET DES STATs.....	13
FIGURE 6 : LA VOIE DE SIGNALISATION JAK/STAT PAR LES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL6	13
FIGURE 7 : LES MÉCANISMES DE RÉGULATION NÉGATIVE DE LA VOIE JAK/STAT	15
FIGURE 8 : VOIE D'ACTIVATION DES MAPKS ET DE LA PI3K PAR LES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL6.....	16
FIGURE 9 : LES DIFFÉRENTS RÉCEPTEURS DU CNTF DE RAT (A) ET DU CNTF HUMAIN (B).....	22
FIGURE 10 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DES COMPLEXE CYTOKINE/RÉCEPTEUR DE LA FAMILLE DE L'IL12 (A AVEC POUR EXEMPLE L'IL12, L'IL23 ET L'IL27) ET DE CELUI POTENTIEL POUR CLF (B).....	34
FIGURE 11: LES VOIES DE SÉCRÉTION ET DE SIGNALISATION POSSIBLES DE CLC .	36
FIGURE 12 : LES DIFFÉRENTS SITES DE LIAISON DE CLC AVEC SES RÉCEPTEURS. 	38
FIGURE 13 : VOIE DE SÉCRÉTION ET DE SIGNALISATION DE CLC PAR CLF.	39
FIGURE 14 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES RÉCEPTEURS DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL12.....	50
FIGURE 15 : VOIE DE SIGNALISATION DES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL12	52
FIGURE 16 : SCHÉMA DE LA RÉGULATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE TH1 PAR LES CYTOKINES DE LA FAMILLE DE L'IL12	64

FIGURE 17 : RÔLE DE L'IL27 DANS LE DÉVELOPPEMENT DES RÉPONSES IMMUNITAIRES DE TYPE TH1 ET TH2	67
FIGURE 18 : STRATÉGIE D'IDENTIFICATION DU RÉCEPTEUR À CLC PAR L'UTILISATION DES CYTOKINES CLC/CLF ET CNTF BIOTINYLÉES.....	205
FIGURE 19 : CARACTÉRISTIQUES DE LIAISON ET D'ACTIVATION DU COMPLEXE LIBRE CLC/EBI3 (A) ET DE LA PROTÉINE DE FUSION MEBI3-CLC (B) SUR LES CELLULES BA/F3 EXPRIMANT LE CNTFR.	211
FIGURE 20 : INTERRELATION DES CYTOKINES HÉTÉRODIMÉRIQUES DE LA FAMILLE IL6/IL12.....	212

Abréviations

ACTH : hormone adrénocorticotropique; **SLA** : sclérose latérale amyotrophique; **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique; **AMPK** : AMP-activated protein kinase; **CPA** : cellule présentatrice d'antigène; **ATP** : adénosine triphosphate; **BCCP** : biotin carboxyl carrier protein; **BMP** : bone-morphogenetic protein; **CBM** : cytokine-binding module; **CISS** : Cold Induced Sweating Syndrome; **CLC** : cardiotrophin-like cytokine; **CLCR** : CLC receptor; **CLF** : cytokine like factor 1; **CNTF** : ciliary neurotrophic factor; **CNTFR α** : CNTF receptor α ; **CT-1** : cardiotrophin-1; **DC** : cellules dendritiques; **EAE** : encéphalomyélite auto-immune expérimentale; **EBI3** : Epstein-Barr virus induced gene 3; **EBV** : Epstein-Barr virus; **ERK** : extracellular signal regulated kinases; **EST** : expressed sequence tag; **FERM** : four-point-one, ezrin, radixin and moesin; **G-CSF** : granulocytes colony-stimulating factor; **GFAP** : glial fibrillary acidic protein; **GM-CSF** : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; **Gp** : glycoprotéine; **GPI** : glycosylphosphatidylinositol; **Grb2** : growth-factor-receptor-bound protein; **Hsp90** : heat shock protein; **IL** : Interleukine; **ILR** : IL Receptor; **INF γ** : Interféron γ ; **iNKT** : invariant natural killer T; **IPTG** : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; **IRF-1** : interferon regulatory factor; **JAK** : Janus Kinase; **JNK** : c-Jun N terminal kinase; **LIF** : leukaemia inhibitory factor; **LIFR β** : LIF Receptor β ; **LPS** : Lipopolysaccharide; **m** : mouse; **MAPK** : mitogen-activated-protein kinase; **MOG** : myelin oligodendrocyte glycoprotein; **MS** : multiple sclerosis; **NK** : natural killer; **NMDA** : N-méthyl-D-aspartate; **NNT-1/BSF-3** : novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3; **NO** : oxyde nitrique; **NP** : neuropoietin; **OSM** : oncostatin M; **OSMR β** : OSM Receptor β ; **PACAP** : pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; **PAMP** : pathogen-associated molecular pattern; **PI3K** : Phosphatidylinositol 3-kinase; **PIAS** : protein inhibitor of activated STAT; **PKA** : protéine kinase A; **PKC** : protéine kinase C; **PKD1** : phosphoinositide-dependant kinase 1; **POMC** : proopiomelanocortin; **ProtC** : Protéine C; **SCN** : suprachiasmatic

nucleus; **Shc** : SH2 and collagen homology domain containing protein; **SHP2** : SH2-domain-containing tyrosine phosphatase; **STAT** : Signal Transducer and Activator of Transcription; **SOCS** : suppressor of cytokine signalling; **Sos** : son of sevenless; **T-bet** : T-box expressed in T cells; **TCCR** : T cell cytokine receptor; **Tc-PTP** : T cell protein tyrosine phosphatase; **TCR** : récepteur des cellules T; **TGF- β** : transforming growth factor β ; **Th** : T helper ; **TLR** : Toll-like receptor; **TNF α** : Tumor necrosis factor α ; **VIP** : vasoactive intestinal peptide.

Remerciements

C'est le temps des remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près au de loin à la réalisation de ce projet de thèse mais aussi à celles qui m'ont permis durant ces quatre années passées au Département de Pharmacologie de l'Université de Montréal d'apprécier mes conditions de travail et de découvrir avec grand plaisir les joies et richesses du Québec.

Un grand Merci :

☺ À mon directeur de thèse, le Dr Jean François Gauchat, qui m'a proposé de réaliser mon doctorat dans son laboratoire de recherche, qui m'a accueillie avec sourire, qui m'a conseillée et guidée tout au long du projet et qui répondait toujours avec gentillesse à la moindre de mes questions.

☺ À tous les collaborateurs, notamment aux groupes du Dr Hugues Gascan, du Dr Trevor Owens et du Dr Rafik Sekali, qui ont permis par leur travaux et réflexions à l'avancer du projet de thèse et à la publication de plusieurs articles.

☺ À Alexandra et Marc avec qui nous avons monté ce projet fou d'aller vivre au Québec. À nos fous rires, nos joies, nos discussions, et votre soutien durant cette belle aventure vécue ensemble.

☺ À Angélique qui a su me faire partager un peu de sa culture québécoise à travers ses magnifiques toiles.

☺ À Marie-Eve qui malgré les nombreuses difficultés rencontrées a pu m'apprendre quelques pas de danse.

☺ À Sandrine et tous nos embourbements.

☺ À mes collègues des autres laboratoires du Département de Pharmacologie notamment ceux du Dr Audrey Claing (Mathieu, Tanguy) et du Dr André DeLéan qui ont toujours été là pour leurs conseils avisés et en cas d'un besoin urgent de LB, d'enzymes ou tout autres réactifs nous manquant.

☺ À toutes les autres personnes travaillant ou ayant travaillé dans le laboratoire du Dr Jean-François Gauchat et au Département de Pharmacologie et avec qui cela a été un plaisir de collaborer.

☺ À mon jumeau d'anniversaire et son patron pour leur bonne humeur, leur humour et leurs splendides lancers francs.

☺ À tous ceux que j'ai côtoyé, avec qui j'ai partagé des idées, des impressions, des moments et qui m'ont permis d'avancer pas à pas.

☺ À ma famille de l'autre côté de l'Atlantique.

☺ À tous ceux que j'ai oublié.

Introduction

I. Les cytokines de la famille de l'interleukine (IL) 6

I. 1. Caractéristiques générales des cytokines

Les cytokines sont des petits polypeptides solubles qui jouent un rôle important dans la communication cellulaire au niveau du système immunitaire mais aussi dans la liaison entre différents systèmes tels que les systèmes immunitaire, nerveux, musculaire et cardiaque. Les cytokines sont souvent exprimées par les cellules du système immunitaire mais peuvent être synthétisées aussi par des cellules d'autres systèmes. Les cytokines ont souvent des effets pléiotropiques, elles peuvent donc agir sur différents types cellulaires. Leurs effets peuvent être synergiques, agonistes, additifs ou antagonistes et sont souvent redondants. Leurs actions peuvent être exercées de manière auto-, para-, endo- ou juxtacrine à travers la signalisation via des récepteurs spécifiques. Elles agissent généralement à faible dose et possèdent une forte affinité pour leur récepteur. Les cytokines sont impliquées dans de multiples processus comme la réponse immunitaire, l'inflammation, l'hématopoïèse, la neurogénèse, la reproduction, la gestation, l'embryogenèse. Ce sont généralement des facteurs de croissance ou de différenciation et peuvent conduire à l'induction ou la répression de l'expression génique. Les cytokines peuvent aussi contribuer au développement de situations pathologiques telles que les maladies auto-immunes, les cancers, les maladies inflammatoires chroniques. Les cytokines ou les protéines impliquées dans leur voie de signalisation peuvent donc être des agents thérapeutiques ou des cibles pour le traitement de diverses maladies (Table I).

Traitement	Indications thérapeutiques
INF α	Maladies virales (hépatites), cancer
INF β	Sclérose en plaques
INF γ	Granulomatose chronique, Ostéoporose maligne sévère
G-CSF	Neutropénie, Transplantation de moelle osseuse, Reconstitution myéloïde post-chimiothérapie
GM-CSF	Reconstitution myéloïde post- chimiothérapie ou post- transplantation de moelle osseuse,
IL-11	Thrombocytopénie post- chimiothérapie
IL-2	Mélanome, cancer du rein métastatique
anti-TNF α ou récepteur soluble au TNF α -Fc	Maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde
anti-IL1	Polyarthrite rhumatoïde

Table I : Exemple de traitement à base de cytokines utilisées en clinique. INF : Interféron; G-CSF : « granulocytes colony-stimulating factor »; GM-CSF : « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »; TNF α : « Tumor necrosis factor α ».

Les cytokines peuvent être classées en différentes familles selon la structure de leurs récepteurs (Table II). Il existe six grandes classes de famille de récepteur aux cytokines. Les trois ligands du récepteur au CNTF [le CNTF (ciliary neurotrophic factor), CLC (« cardiotrophin-like cytokine »), NP (« neuropoietin »)] font partie des cytokines de la famille de l'IL6 qui elle-même est un sous-groupe de la famille des récepteurs hématopoïétique ou récepteur de classe I. Ces cytokines ont une structure en hélices α tandis que leurs récepteurs sont caractérisés par la présence d'un motifs WSXWS et de boites 1 et 2 cytosoliques (Table II).

Familles	Caractéristiques des récepteurs	Exemple	Structure des cytokines
Récepteur hématopoïétique ou de classe I	Motifs WSXWS, Boîtes 1/2 cytosoliques	gp130, IL6R, IL2R	4 Hélices α
Récepteur aux Interférons ou de classe II	Domaine de type fibronectine	INF γ R, IL10R	4 Hélices α
Récepteur au TNF ou de classe III	Domaine riche en cystéines, domaine de mort intracellulaire	TNFR, Fas, CD40	Feuillet β
Récepteur à l'IL1 ou de classe IV	Domaine similaire aux immunoglobulines	IL1R	Trèfles β
Récepteur aux chémokines	Famille des récepteurs couplés aux protéines G, 7 domaines transmembranaires	IL8R	Feuillet β , motifs avec cystéines
Récepteur au TGF ou à tyrosine kinase	Domaine tyrosine kinase	TGFR	Feuillet β

Table II : Classification des cytokines selon la structure de leur récepteur. Il existe six familles de récepteurs aux cytokines classées selon la structure de ces récepteurs. TGF : « Transforming growth factor ».

I. 2. Caractéristiques générales des cytokines de la famille de l'IL6

I.2.1. Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL6

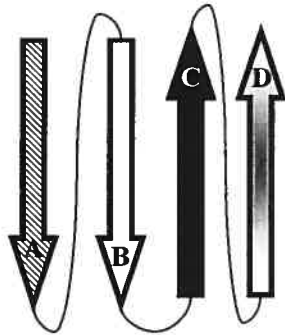
Les cytokines de la famille de l'IL6 ou cytokines de la famille de la glycoprotéine (gp) 130 sont caractérisées par l'utilisation commune de la chaîne transductrice du signal gp130. Cette famille regroupe neuf cytokines : l'IL6, l'IL11, le LIF (« leukaemia inhibitory factor »), l'OSM (« oncostatin M »), le CNTF, CT-1 (« cardiotrophin-1 »), CLC, NP et l'IL27. L'IL27 se liant aussi à gp130 fait partie de

cette famille mais est classée dans la famille des cytokines hétérodimériques de l'IL12. Cette cytokine sera donc décrite dans la partie II.

I.2.2. Structure des cytokines de la famille de l'IL6

Les cytokines de la famille de l'IL6 sont des petits polypeptides d'environ 20 kDa. Elles sont formées de quatre longues chaînes en hélices α (chaînes A, B, C, D) reliées entre elles par des boucles (Figure 1). Les boucles reliant les chaînes A à B et C à D sont longues ce qui permet une orientation parallèle respectivement des hélices A et B puis C et D. La boucle reliant les chaînes B à C est courte induisant une orientation antiparallèle des hélices A et B par rapport aux hélices B et C ^{1,2}. La forme de l'hélice A partage la famille en deux sous-groupes : ceux dont l'hélice A est droite (l'IL6 et probablement l'IL11) et ceux dont l'hélice A est courbée (LIF, OSM, CNTF et probablement CLC, CT-1 et NP) ^{3,4}. Cette divergence structurale peut être à l'origine de la différence de recrutement des chaînes du récepteur. Les cytokines dont les chaînes A sont droites activent des homodimères de gp130 alors que les cytokines à chaînes A courbées utilisent des hétérodimères gp130/LIFR β (LIF Receptor β) ou gp130/OSMR β (OSM Receptor β) ^{1,2}.

A) Structure théorique pour l'IL6 et l'IL11.



B) Structure théorique pour LIF, OSM, CNTF, CLC, NP, CT-1.

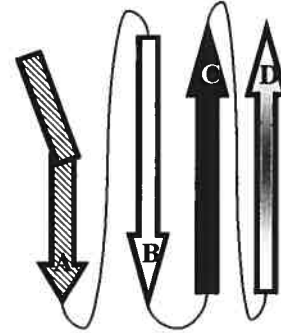


Figure 1 : Représentation schématique de la structure des cytokines de la famille de l'IL6.

Ces cytokines sont formées de quatre hélices α (représentées par des flèches notées A, B, C, et D). De subtiles différences dans la courbure des hélices notamment au niveau de l'hélice A permet de différencier deux catégories : une structure ayant des hélices droites (Schéma A) et une structure ayant une hélice courbée (Schéma B).

En général, les cytokines de la famille de l'IL6 sont des protéines sécrétées. Toutefois, le CNTF et CT-1 font exception. Ils ne possèdent pas de peptide signal et sont relâchés par des cellules endommagées. Quant à CLC, elle nécessite pour sa sécrétion l'interaction avec un récepteur soluble aux cytokines, le CLF⁵ (cytokine like factor 1) ou le CNTFR α ⁶ (CNTF receptor α).

I.2.3. Les récepteurs de la famille de l'IL6

Les récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire des cytokines de la famille de l'IL6 sont composés de chaînes α et β (Figure 2)¹.

Les chaînes α sont composées de trois éléments : le CNTFR α , l'IL6R α (IL6 Receptor α) et l'IL11R α (IL11 Receptor α). Leur domaine cytoplasmique étant absent (pour le CNTFR α) ou court (pour l'IL6R α ou l'IL11R α), elles ne possèdent

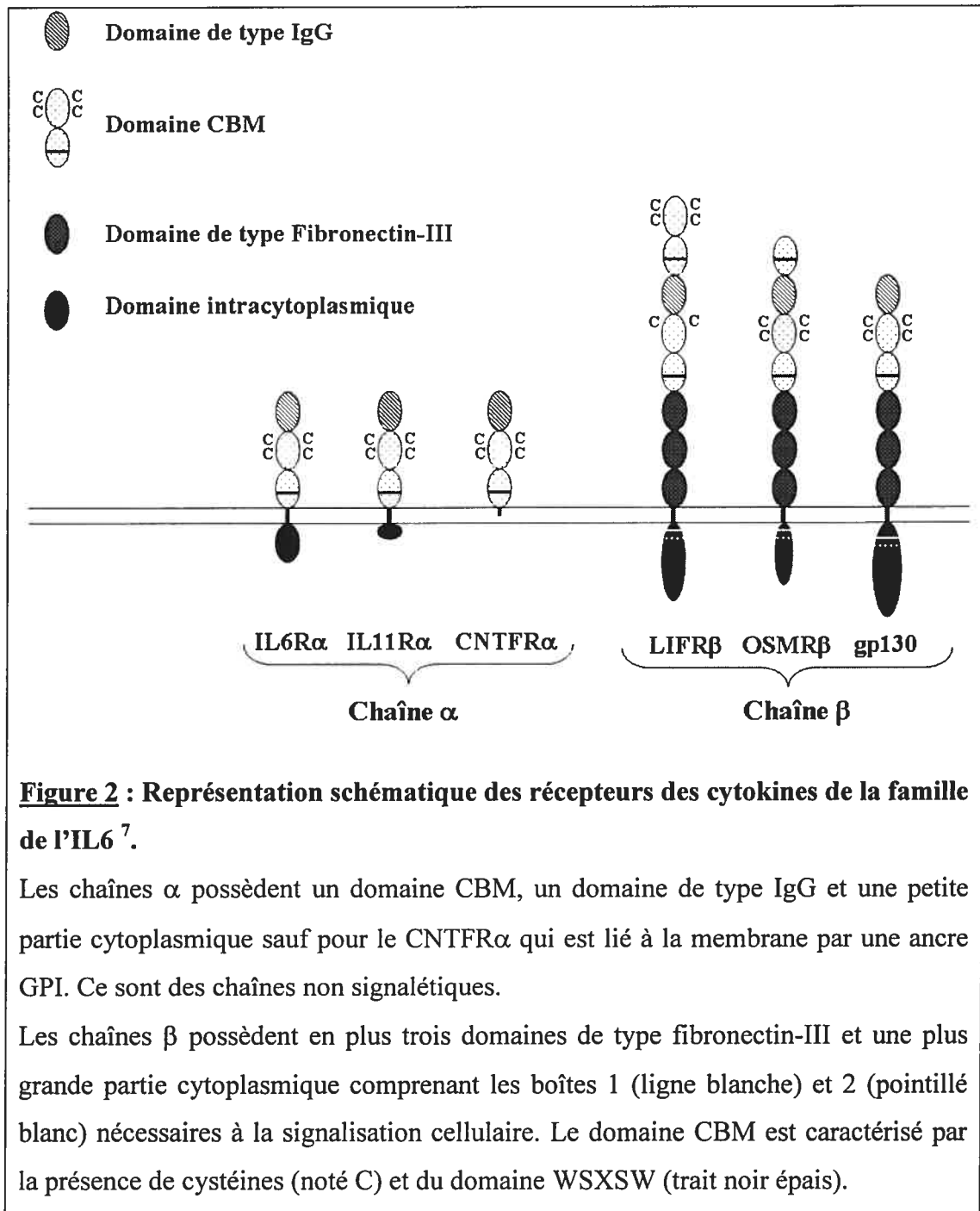
pas les caractéristiques essentielles à l'induction d'une voie de signalisation intracellulaire. Ce sont donc des récepteurs non signalétiques.

Les chaînes β sont les chaînes transductrices du signal et sont composées de gp130, OSMR β et LIFR β . Ces chaînes induisent l'activation de la voie de signalisation intracellulaire suite à la liaison des cytokines.

Toutes les chaînes α et β sont des protéines transmembranaires sauf le CNTFR α qui est lié à la membrane plasmique par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol).

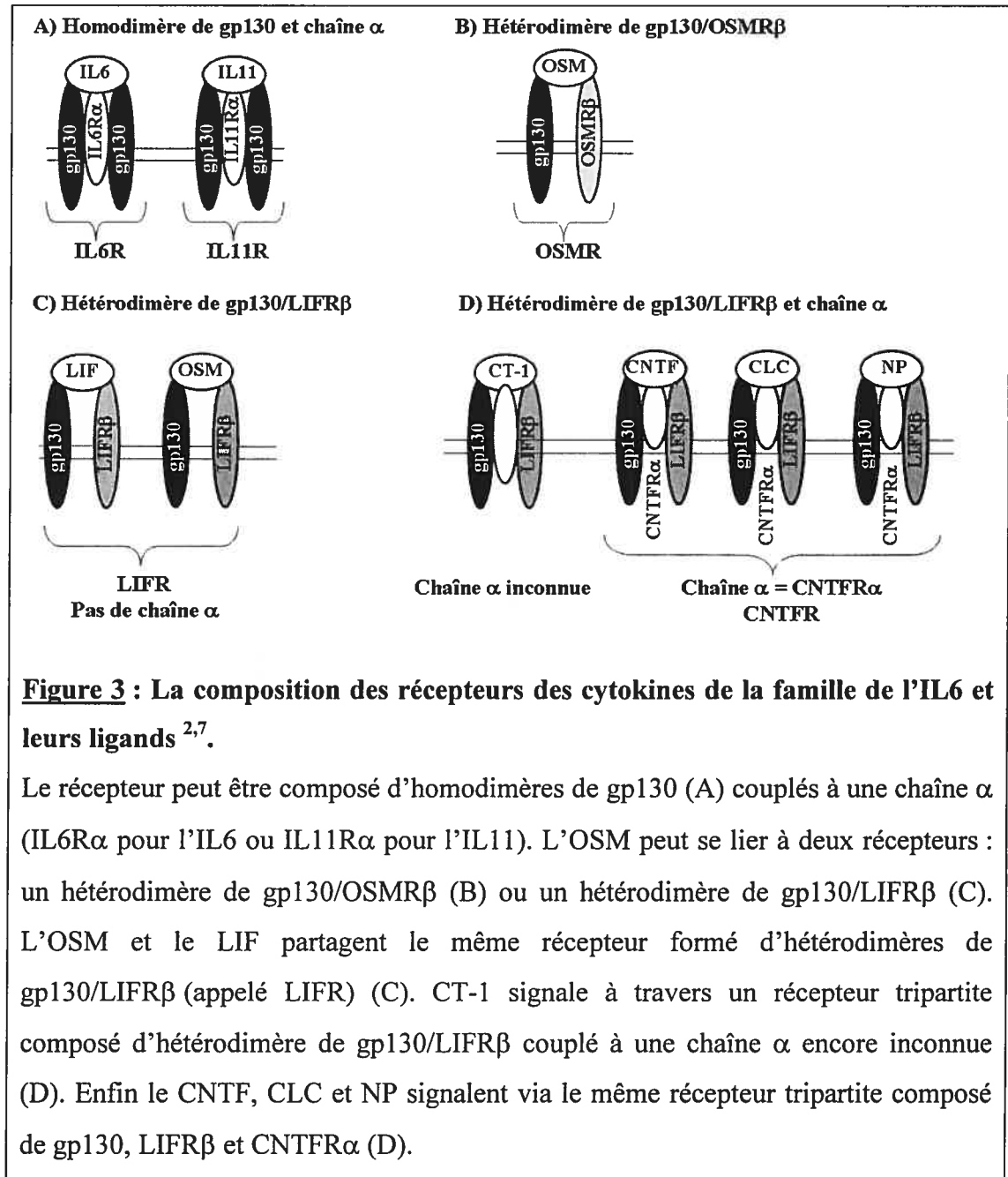
Ces récepteurs font partie de la famille de la classe I des récepteurs des cytokines (ou récepteurs hématopoïétique) caractérisée par la présence d'au moins un module de liaison aux cytokines (CBM : cytokine-binding module). Le CBM est composé de deux domaines de type fibronectin-III qui comportent à l'extrémité N terminale quatre résidus cystéines et en C terminal le motif WSXWS. Ces récepteurs contiennent aussi un domaine de type IgG en N terminal, sauf pour le LIFR β et l'OSMR β où il est situé entre les deux CBM (Figure 2).

Les chaînes transductrices du signal possèdent trois domaines additionnels de type fibronectin-III ainsi qu'une plus grande partie cytoplasmique nécessaire à la transduction du signal comprenant deux éléments essentiels à la signalisation intracellulaire : les boîtes 1 et 2 (Figure 2) ¹.



Les récepteurs complets sont soit dipartite c'est-à-dire composé de deux sous-unités (dimères de LIFR β /gp130, gp130/gp130, LIFR β /OSMR β) soit tripartite

(homodimère de gp130 couplé à une chaîne α IL6R α ou IL11R α , ou hétérodimère de LIFR β /gp130 couplé au CNTFR α ; Figure 3).



Le récepteur gp130 est exprimé de manière ubiquitaire mais les autres composants des récepteurs notamment les chaînes α ont un profil d'expression plus restreint conférant une spécificité d'action aux cytokines.

Cependant, il existe des formes solubles de certaines chaînes α et β . Ces formes solubles proviennent soit d'une protéolyse des formes transmembranaires (CNTFR α , IL6R α) soit de la présence d'un épissage alternatif de l'ARNm (gp130, IL6R α). Elles peuvent se lier aux cytokines et induire une réponse sur des cellules n'exprimant que les deux sous-unités transductrices du signal. La forme soluble de gp130 peut aussi amener à une séquestration des cytokines inhibant ainsi leur action⁷.

I.2.4. La liaison récepteur/cytokine

Les cytokines de la famille de l'IL6 se lient à deux ou à trois sous-unités du récepteur et possèdent donc au plus trois sites de liaison aux récepteurs (Table I et Figure 4).

Le site I (si existant) permet la liaison à la chaîne α (IL6R α , IL11R α et CNTFR α). Il est composé de résidus de la partie C terminal de l'hélice D et de la boucle A-B des cytokines et interagit avec le CBM de la chaîne α du récepteur.

Le site II est toujours le site de liaison de gp130. Ce sont des résidus situés au milieu des hélices A et C de la cytokine qui interagissent avec le CBM de gp130.

Le site III est le site de liaison avec la deuxième chaîne transductrice du signal (gp130, LIFR β ou OSMR β). Le site III serait localisé au niveau N terminal de l'hélice D. L'interaction au niveau du récepteur se ferait par le domaine de type IgG^{1,2}.

Comme il existe deux sites de liaison possible des cytokines sur gp130 (le CBM et le domaine de type IgG), l'IL6 (et probablement l'IL11) peut soit former des complexes tétramériques ou des complexes hexamériques comportant deux molécules de ligands, deux chaînes α et deux molécules de gp130^{1,7}. Ce modèle structural hexamérique a été récemment confirmé par des études de cristallographie et de

modélisation moléculaire ^{8,9}. De même, un complexe hexamérique a été décrit pour le CNTF. Ce complexe serait composé de deux molécules de CNTF et de CNTFR α liées à une molécule de gp130 et de LIFR β ^{1,7}.

Ligand	Site I	Site II	Site III
IL6	IL6R α	gp130	gp130
IL11	IL11R α	gp130	gp130
OSM		gp130	LIFR β ou OSMR β
LIF		gp130	LIFR β
CT-1	?	gp130	LIFR β
CNTF	CNTFR α	gp130	LIFR β
CLC	CNTFR α	gp130	LIFR β ou CLF
NP	CNTFR α	gp130	LIFR β

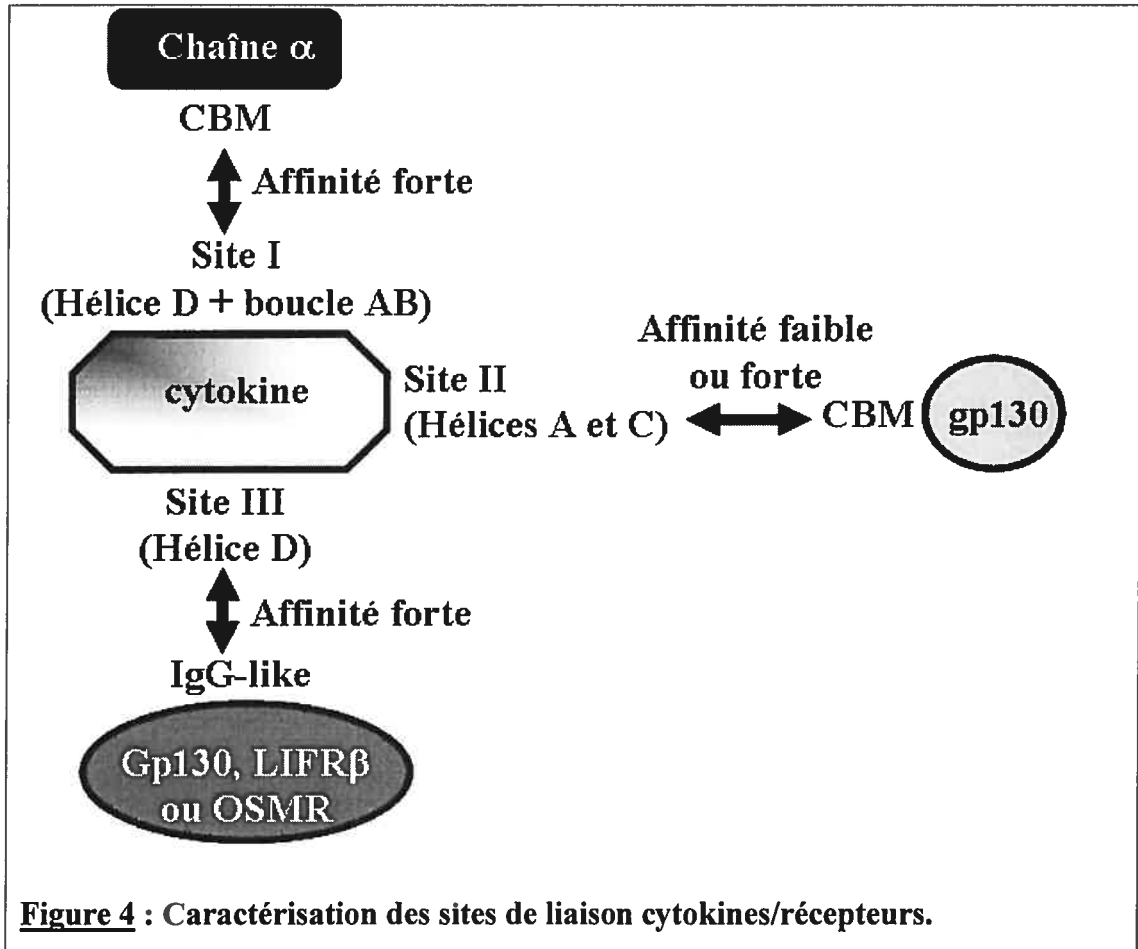
Table III : Les sites de liaison des cytokines de la famille de l'IL6 à leurs récepteurs ¹.

La liaison par les sites I et III est relativement de forte affinité. Le site II peut varier d'une faible à une forte affinité dépendamment de la présence d'une chaîne α (Figure 4). L'affinité pour le site II est faible lorsque le récepteur comporte une chaîne α , cette dernière compensant pour l'absence d'une forte affinité du site II.

La cytokine se lie en premier à la chaîne α du récepteur qui est une liaison de forte affinité. Ce complexe possède ensuite une forte affinité pour gp130. La formation d'un complexe de haute affinité passe donc en premier par la liaison à la chaîne α puis ensuite par le recrutement de la chaîne transductrice du signal gp130.

Dans le cas de OSM et de LIF qui ne possèdent pas de chaîne α , la liaison de haute affinité se fait respectivement avec gp130 et LIFR β . Il existe aussi des différences d'interaction entre les espèces. Par exemple l'OSM humaine peut se lier au LIFR et à l'OSMR humain mais l'OSM de souris ne se lie qu'à l'OSMR de souris. Le LIF de

souris se lie avec une haute affinité au LIFR de souris mais avec une faible affinité au LIFR humain ¹.



La liaison du ligand à son récepteur induit une internalisation rapide du ligand. Le phénomène d'internalisation semble être indépendant de la chaîne α mais dépendant d'un motif de type dileucine présent au niveau des chaînes gp130 et LIFRβ.

I.2.5. Les voies de signalisation

I.2.5.1. La voie JAK/STAT

La principale voie de signalisation des cytokines de la famille de l'IL6 est la voie JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription; Figure 5 et 6) ^{2,7}. La liaison de la cytokine au récepteur induit une dimérisation des chaînes β (Figure 6 Étape 1). Les kinases JAKs (JAK1, JAK2 ou Tyk2) sont liées par leur domaine FERM (four-point-one, ezrin, radixin and moesin) au niveau des boîtes 1 et 2 des chaînes β (Figure 2 et 5). La boîte 1 est un domaine riche en proline essentiel pour l'association de JAK alors que la boîte 2 est une région d'acides aminés hydrophobes et d'acides aminés chargés positivement qui n'est nécessaire que pour augmenter l'affinité de liaison des JAKs à certains récepteurs. La région entre les deux boîtes serait aussi importante pour la liaison chaîne β /JAK. Suite à la dimérisation des chaînes β , les JAKs vont s'auto-activer par une phosphorylation (Figure 6 Étape 1). Les JAKs activées vont induire la phosphorylation des chaînes β du récepteur (Figure 6 Étape 2). Les STATs (STAT3 majoritairement, STAT1 et dans de rare cas STAT5), qui sont exprimées de manière ubiquitaire, vont ensuite se lier par leur domaine SH2 au domaine phosphorylé du récepteur (Figure 5; Figure 6 Étape 4). Les STATs sont ensuite phosphorylées par les JAKs au niveau de leur tyrosine et vont former des dimères (homo ou hétérodimères de STATs 1 et 3) suite à la liaison par leur domaine SH2 (Figure 6 Étape 4 et 5). Les dimères de STATs vont ensuite migrer dans le noyau où elles vont se lier à des séquences promoteurs de l'ADN pour induire soit une activation soit une répression des gènes cibles (Figure 6 Étape 5) comme JunB, c-Fos, IRF-1 (interferon regulatory factor), Hsp90 (heat shock protein).

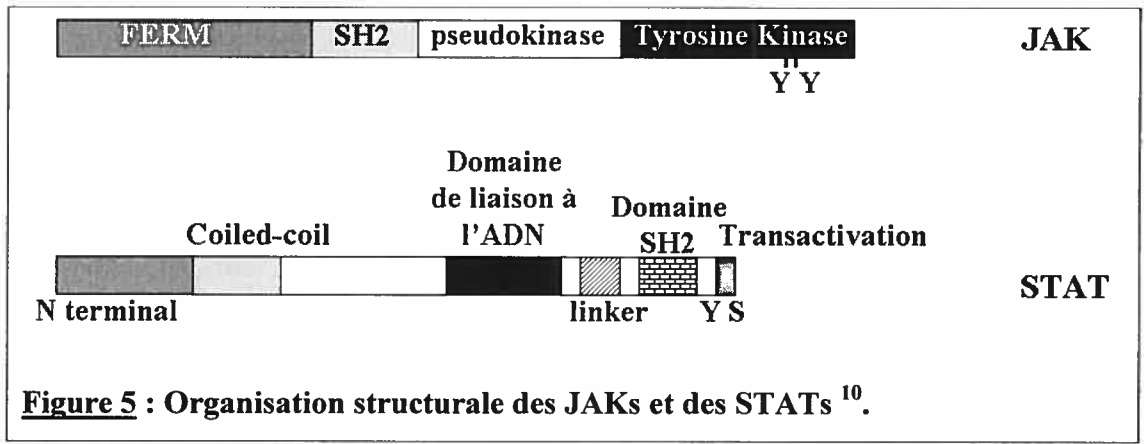


Figure 5 : Organisation structurale des JAKs et des STATs ¹⁰.

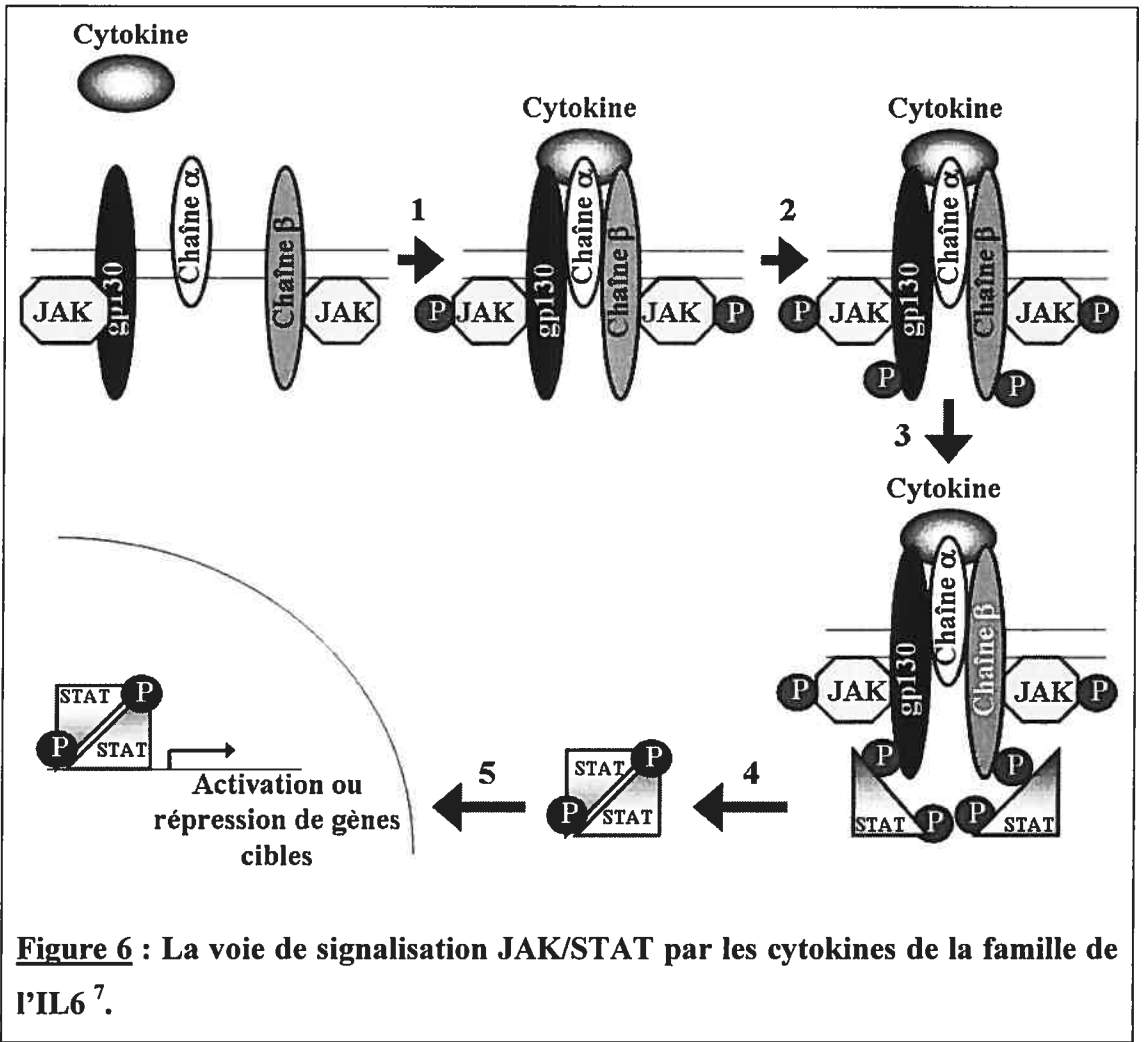
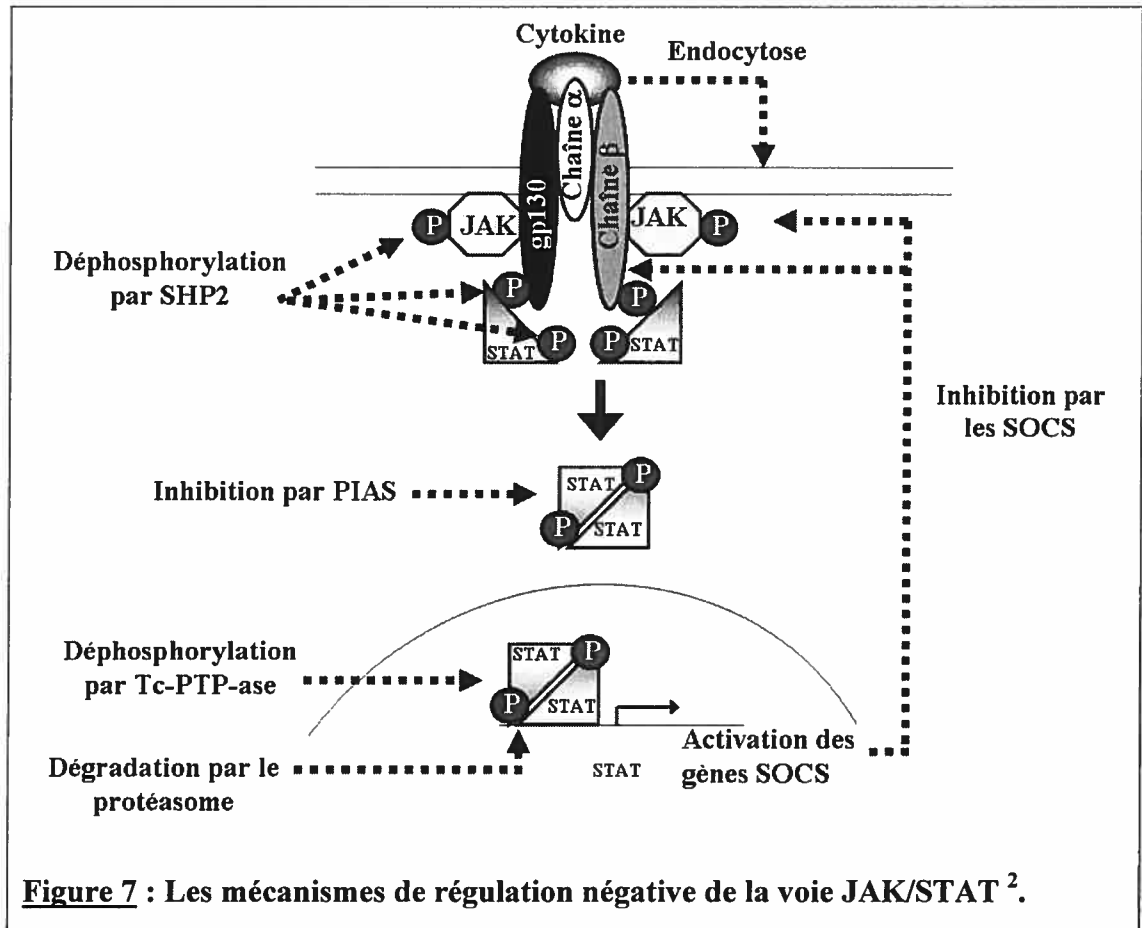


Figure 6 : La voie de signalisation JAK/STAT par les cytokines de la famille de l'IL6 ⁷.

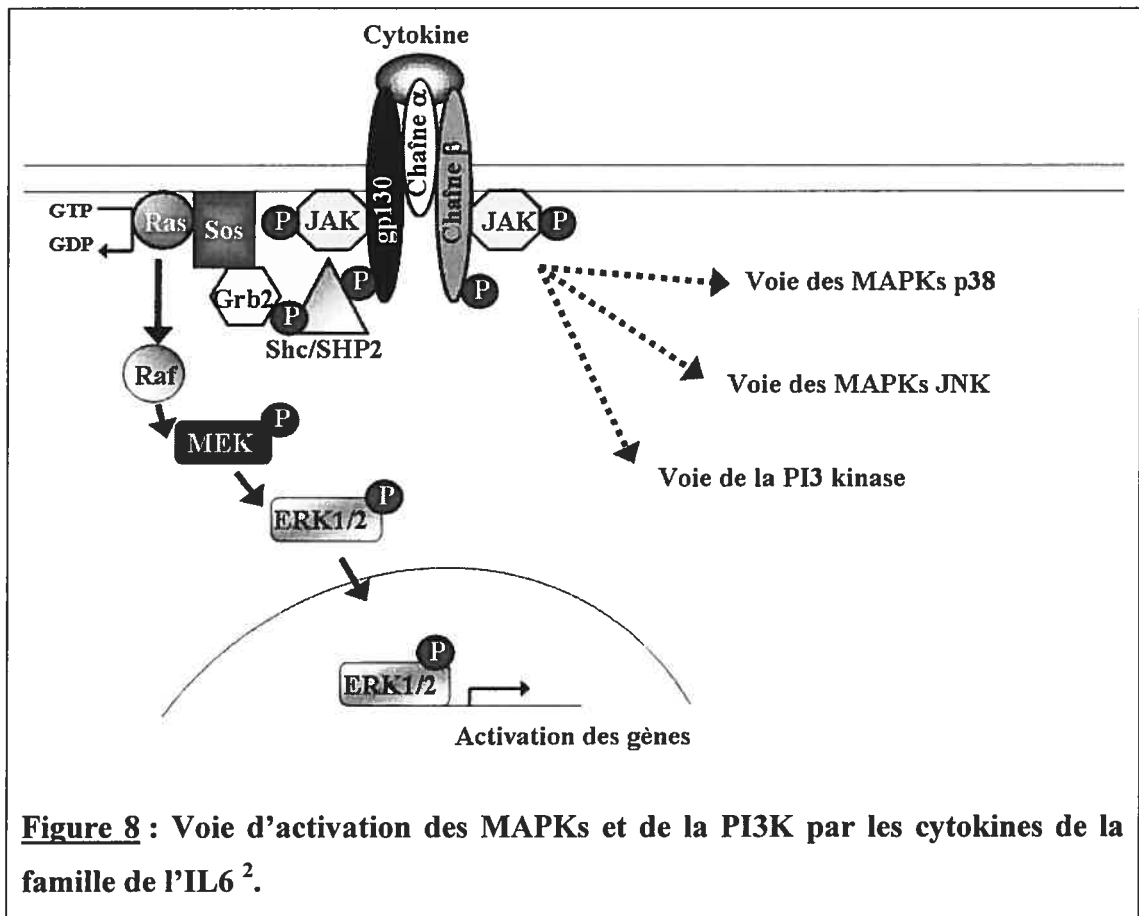
L'activation de la voie JAK/STAT est transitoire. Il existe donc des mécanismes de régulation négative (Figure 7). Des phosphatases comme SHP2 (SH2-domain-containing tyrosine phosphatase) et Tc-PTP (T cell protein tyrosine phosphatase) seraient des phosphatases régulatrices de la voie JAK/STAT. Les PIAS (protein inhibitor of activated STAT) sont une famille de protéines qui se lient aux STATs activés et inhibent leur action. La liaison peut se faire soit dans le cytoplasme soit dans le noyau. La voie des JAKs/STATs induit un rétro-contrôle négatif en activant la production de molécules SOCS (suppressor of cytokine signaling). Il existe différentes SOCS agissant au niveau de plusieurs cibles. Certaines inhibent l'activation des JAKs². D'autres se lient aux récepteurs des cytokines et bloquent le recrutement des STATs. Elles peuvent aussi se lier à Ras et augmenter cette voie de signalisation. Enfin, les SOCS induiraient la dégradation des protéines induisant une diminution de la signalisation¹⁰. En plus de ces inhibitions spécifiques, il existe d'autres mécanismes de modulations de la réponse comme l'endocytose des récepteurs, la demi-vie courte des cytokines ou la dégradation des protéines par le protéasome.



1.2.5.2. La voie des MAPKs

Les cytokines de la famille de l'IL6 peuvent aussi induire la voie des MAPKs (mitogen activated protein kinase; Figure 8). La voie d'activation des MAPKs passe par le recrutement de SHP2 par gp130 et LIFR β ou de Shc (SH2 and collagen homology domain containing protein) pour OSMR β qui se lie au niveau des tyrosines phosphorylées des récepteurs. Ces protéines sont phosphorylées par les JAKs et recrutent le complexe Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein)/Sos (son of sevenless). Ce complexe induit l'activation de Ras (caractérisée par le remplacement du GDP en GTP) qui mène à la cascades de phosphorylation de la voie des MAPKs en passant par Raf, MEK et ERK1/2 (extracellular signal regulated

kinases). L'activation d'ERK induit sa dimérisation, sa translocation dans le noyau et conduit à une multitude de réponses cellulaires par la régulation de la transcription de gènes spécifiques. En plus de l'activation de la voie des ERK1/2, ces cytokines induisent aussi la voie de deux autres MAPKs : p38 et JNK (c-Jun N terminal kinase). La voie des MAPK joue un rôle fondamental dans le contrôle de la croissance cellulaire, la différenciation et la survie cellulaire.



1.2.5.3. La voie de la PI3K

Les cytokines de la famille de l'IL6 peuvent induire une dernière voie d'action : celle de la PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase, Figure 8). Les mécanismes d'activation de la PI3K par les chaînes β du récepteur sont encore peu connus. La PI3K agit sur les

phosphoinositides de la membrane induisant le recrutement à la membrane de l'Akt qui est elle-même activée par PKD1 (phosphoinositide-dépendant kinase 1). Cette voie d'action induirait une survie cellulaire, une prolifération et un contrôle de l'apoptose ².

I.2.6. Les activités biologiques des cytokines de la famille de l'IL6

Les activités biologiques des cytokines de la famille de l'IL6 sont nombreuses et diverses et comprennent entre autres la régulation de multiples processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'activation de gènes ⁷. L'identification du rôle potentiel de chaque cytokine provient soit de tests *in vitro* soit d'analyses d'animaux transgéniques ou déficients pour leurs gènes. La délétion chez la souris des gènes codant pour gp130, LIFR β , STAT3 et JAK1 est létale. Ce sont donc des éléments essentiels de la voie de signalisation des cytokines de la famille de l'IL6.

Les cytokines jouent des rôles variés à l'interface de multiples systèmes : le système immunitaire (hématopoïèse, réponse de la phase aiguë, prolifération et différenciation cellulaire), le système osseux (développement des ostéoclastes), le système cardiaque (induction de l'hypertrophie des myocytes, inhibition de leur apoptose), le système nerveux (neurogénèse, neuroprotection), le système musculaire (atrophie musculaire, effet myotrophique), le système reproducteur (implantation des blastocytes, survie des cellules de Sertoli et des gonocytes).

I. 3. Le ciliary neurotrophic factor (CNTF)

I.3.1. Identification du CNTF et du CNTFR α

Le CNTF a été identifié en premier en 1979 par sa capacité à induire la survie des neurones parasymphatiques du ganglion ciliaire dans des embryons de poulet ¹¹. Par la suite deux groupes ont cloné indépendamment le gène du CNTF.

Lin *et al.* ont purifié du CNTF à partir de nerfs sciatiques de lapin ce qui a permis l'obtention d'une petite séquence peptidique ¹². À partir de cette séquence, ce même groupe a cloné pour la première fois le gène codant pour le CNTF de lapin ¹³. Simultanément, le groupe de Stockli a cloné et caractérisé le CNTF de rat ¹⁴.

Par la suite, le CNTF de beaucoup d'autres espèces a été cloné, exprimé et caractérisé ¹⁵⁻¹⁷.

Le CNTFR α a été cloné en 1991 par criblage à l'aide du CNTF marqué d'une banque d'ADNc de la lignée cellulaire humaine de neuroblastes SH-SY5Y transfecté dans des cellules COS ¹⁸.

I.3.2. Caractéristiques structurales du CNTF et du CNTFR α

I.3.2.1. Le CNTF

Le gène du CNTF humain possède deux exons séparés par un intron et est présent en une copie unique au niveau du chromosome 11. Le premier exon est composé de 114 paires de bases codant pour 38 acides aminés alors que le deuxième comporte 486 paires de bases pour une protéine de 162 acides aminés. L'intron séparant les deux exons contient 1000 paires de bases. Le CNTF humain, de rat et de cochon est une protéine de 200 acides aminés alors que ceux de lapin, de souris et de poulet sont plus petits et codent respectivement pour des protéines de 199, 198 et 195 acides aminés ^{14,15,19}.

Le CNTF est une protéine acide de masse moléculaire d'environ 23 kDa. C'est une cytokine de la famille de l'IL6 ayant une structure en hélices α . Le CNTF ne possède qu'un seul résidu cystéine à la position 17 donc aucun pont disulfure ne vient stabiliser la structure de la protéine. Il ne contient pas de site potentiel de N-glycosylation ni de peptide signal ¹³. C'est donc une protéine cytosolique non sécrétée. Il exerce probablement son action après avoir été relâché par des cellules endommagées ou à travers un mécanisme de sécrétion encore peu connu. Sa sécrétion dans la rétine suite à un stress oxydatif pourrait impliquer sa liaison avec

une protéine, probablement le CNTFR α ²⁰. À l'opposé du CNTF de mammifère, le CNTF de poulet est sécrété par une voie de sécrétion non classique²¹. Ce signal de sécrétion est probablement contenu dans une région hydrophobe spécifique au CNTF de poulet. Le CNTF est très conservé sur le plan de l'évolution avec au niveau protéique 83% d'homologie entre le rat et l'homme, 87% entre le lapin et l'homme¹⁵. Le CNTF de rat présente une activité spécifique sur la survie des neurones et une affinité de liaison à son récepteur plus forte que celle du CNTF humain. Ces différences sont dues au changement d'un acide aminé entre les deux protéines. Le CNTF de rat comme celui de souris possède une arginine à la position 63 alors que chez l'homme il s'agit d'une glutamine. La mutation de la glutamine 63 en arginine dans le CNTF humain lui confère les mêmes caractéristiques d'activité et d'affinité que le CNTF de rat. Cette caractéristique de l'arginine 63 est indépendante du récepteur et des différences entre les espèces²². L'Axokine qui est un variant de CNTF humain, comportant entre autre la substitution Q63R, est utilisé dans les essais pré-cliniques et cliniques en raison de sa meilleure activité et stabilité.

1.3.2.2. Le CNTFR α

Le gène codant pour le CNTFR α est présent au niveau du chromosome 9 chez l'Homme (9p13²³ et du chromosome 4 chez la souris²⁴). Le gène du CNTFR α humain comprend 10 exons séparés par 9 introns²⁴. Le CNTFR α est une protéine de 372 acides aminés d'environ 41 kDa possédant deux régions hydrophobes : l'une caractéristique d'un peptide signal et l'autre d'une ancre GPI. Le CNTFR α est donc une protéine sécrétée qui est liée à la membrane plasmique par une ancre GPI. Il peut aussi exister sous forme soluble suite à la coupure de l'ancre GPI par la phospholipase C. Le CNTFR α possède plusieurs cystéines pouvant être impliquées dans des ponts disulfures. Des modifications post-traductionnelles comme des N-glycosylations (quatre sites potentiels de N-glycosylation), lui donnent un poids moléculaire apparent de 72 kDa¹⁸. Le CNTFR α est une molécule très conservée au

niveau de l'évolution (environ 94% d'homologie entre les différentes espèces de mammifère, et 70% entre les mammifères et la poulet^{25,26}. Le CNTFR α possède des similarités avec l'IL6R α (30% d'homologie²⁷). Une description structurale du CNTFR α est donnée au paragraphe I.1.3. et à la figure 2.

I.3.3. Expression du CNTF et du CNTFR α

I.3.3.1. Le CNTF

Le CNTF est exprimé principalement au niveau du système nerveux périphérique. Il se retrouve en grande quantité au niveau du nerf sciatique¹⁴ mais aussi au niveau des astrocytes²⁸, des cellules de Schwann du système nerveux périphérique, des cellules gliales, de la moelle épinière, du tissu oculaire, du bulbe olfactif^{27,29,30}. Le CNTF est présent dans le système nerveux périphérique au cours du développement mais est fortement augmenté quelques jours après la naissance. Son expression est stimulée lors d'un dommage au niveau d'une terminaison nerveuse laissant supposer un rôle important au niveau de la réparation neuronale.

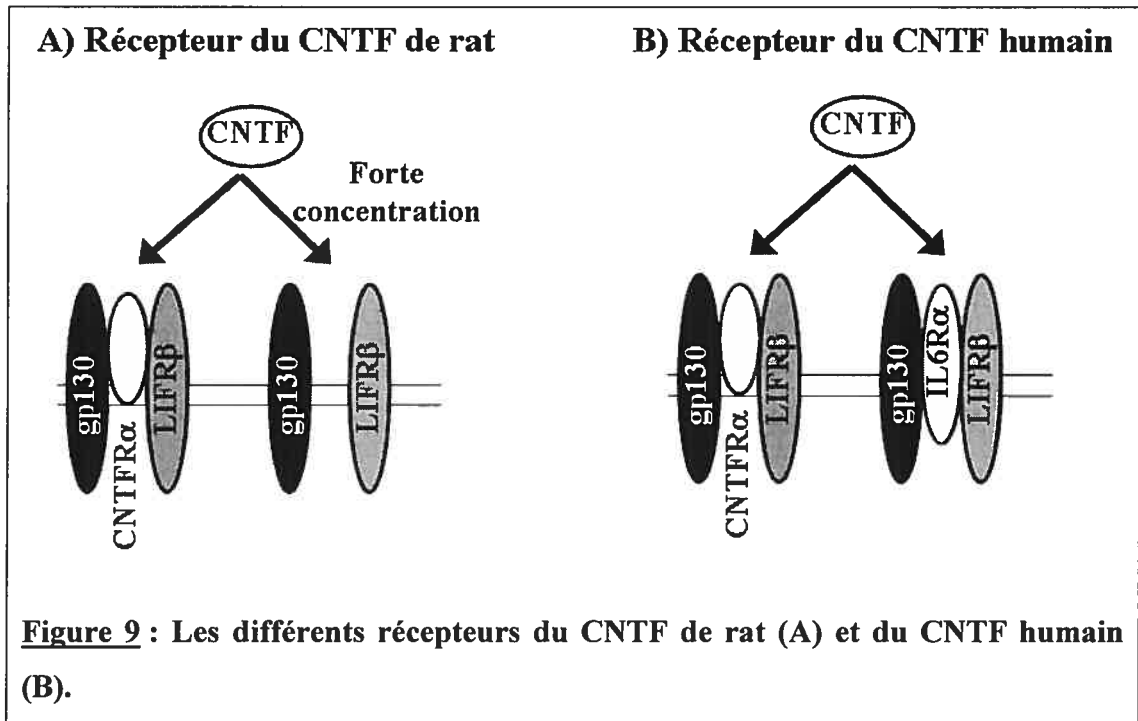
I.3.3.2. Le CNTFR α

Le CNTFR α est exprimé principalement au niveau du système nerveux (central et périphérique) et des muscles squelettiques. Comme pour le CNTF, son expression est aussi stimulée lors d'un dommage au niveau d'une terminaison nerveuse. Le CNTFR α est fortement exprimé durant le développement embryonnaire du système nerveux central et périphérique²⁶. Il est aussi exprimé par les astrocytes²⁸, ainsi qu'en faibles quantités au niveau de la glande surrénale, du nerf sciatique, de la peau, du foie, des reins, des testicules et de la rétine^{18,26,27,31}.

I.3.4. Voie de signalisation du CNTF

Le CNTF se lie au récepteur au CNTF (CNTFR) qui est composé de la chaîne α (CNTFR α) et des deux chaînes β (gp130 et LIFR β)^{18,32}. Le CNTFR α existe sous forme soluble et le complexe CNTF/sCNTFR α peut agir sur des cellules exprimant seulement LIFR β et gp130³². De même, *in vitro*, le mélange des protéines CNTF et sCNTFR α peut agir sur des cellules exprimant uniquement les deux chaînes transductrices du signal³³. Le CNTF, comme les autres membres de la famille de l'IL6, se lie par son site I à sa chaîne α (ici le CNTFR α), par son site II à gp130 et par son site III à LIFR β ^{29,33}.

Le CNTF peut aussi activer une voie de signalisation atypique. Le CNTF de rat à forte dose peut agir sur des cellules exprimant seulement gp130 et LIFR β en absence de la chaîne CNTFR α ³⁴. À la différence des autres espèces, le CNTF humain peut se lier au récepteur tripartite comprenant l'IL6R α , LIFR β et gp130 (Figure 9³⁵). Cette particularité du CNTF humain est probablement due à une substitution en position 63 : glutamine chez l'humain contre une arginine chez les autres espèces²²; voir paragraphe I.2.2.1.). Le CNTF humain peut donc agir sur un plus grand nombre de cibles. Cette caractéristique doit être prise en compte pour l'évaluation des effets secondaires du CNTF humain dans les tests cliniques.



Comme détaillé au paragraphe I.1.5, le CNTF induit les voies des JAKs (JAK 1, 2 et Tyk2)/ STATs (STAT 3 et 1), des MAP kinases et de la PI3 kinase.

I.3.5. Les mutations du CNTF et du CNTFR α

Afin de déterminer le rôle physiologique du CNTF, son gène a été inactivé dans des souris ³⁶. La délétion du gène du CNTF n'affecte pas le nombre de neurones moteurs au cours du développement embryonnaire. De même, durant les premières semaines après la naissance, aucun changement morphologique ou fonctionnel n'a été observés dans le système nerveux des souris CNTF^{-/-}. Le CNTF jouerait donc un rôle redondant lors du développement du système nerveux que ce soit au niveau embryonnaire ou lors des premières semaines après la naissance. Par contre, avec l'âge, progressivement s'installent une atrophie et une dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière ainsi qu'une légère diminution de la force musculaire. Le CNTF jouerait donc plus un rôle au niveau du maintien de la fonction des neurones moteurs au niveau de la période post-natale chez la souris adulte ³⁶.

Chez l'Homme, une mutation du gène du CNTF a été répertoriée dans différentes populations. La mutation (une transition G → A) se situe au niveau d'un intron et crée un nouveau site accepteur d'épissage. Cela permet la transcription d'un nouvel ARNm avec une insertion de 4 paires de bases. Cette insertion cause un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. Il en résulte une protéine tronquée de 7 kDa. Cette protéine n'est ni exprimée ni fonctionnelle. Dans une première étude au niveau de la population japonaise, cette mutation, présente dans 2,3% de cette population, n'a pas été corrélée à l'apparition de maladies neurodégénératives³⁷. La fréquence de cette mutation est la même chez les personnes atteintes de maladies neurologiques (la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson). Il est possible que le CNTF induise certains dysfonctionnements précis au niveau de ces maladies mais n'est pas responsable de leur apparition³⁷.

De même, une étude au niveau de la population allemande a montré que la fréquence de distribution de la mutation du CNTF est la même au niveau d'une population témoin et d'une population souffrant de maladies neurologiques diverses (notamment la SLA et l'atrophie musculaire progressive). Cependant, la mutation homozygote au niveau du gène du CNTF a été corrélée avec une apparition précoce de ces maladies neurologiques³⁸. Enfin, deux autres études ont évalué la corrélation entre de la mutation du CNTF et la sclérose en plaques^{39,40}. Ces deux études montrent qu'il n'y a pas d'augmentation de la fréquence de cette mutation entre les patients atteints de sclérose en plaques (2% environ) et les patients témoins. Cependant alors qu'une étude observe un lien entre la mutation du CNTF et l'âge d'apparition de la maladie ainsi que des symptômes plus sévères³⁹, l'autre étude n'a trouvé aucune corrélation⁴⁰.

À l'opposé du phénotype des souris CNTF^{-/-}, les souris CNTFR α ^{-/-} meurent dans les 24 h suivant la naissance car elles sont incapables de téter⁴¹. De plus, elles présentent une forte perte de motoneurones au niveau du cerveau et de la moelle épinière.

Alors que la présence du CNTFR α au niveau fœtal est importante pour le développement embryonnaire, le CNTF ne semble pas jouer un rôle crucial chez l'embryon. Ces différences de phénotype et d'expression ont conduit à l'hypothèse de l'existence d'un ou plusieurs autres ligands au CNTFR α ^{36,41}.

I.3.6. Activités biologiques du CNTF

I.3.6.1. Activités au niveau du système nerveux

Le CNTF est un facteur neurotrophique qui induit la survie de multiples types de neurones à différents stades de développement. Il induit entre autre la survie des neurones parasymphatiques, sympathiques, moteurs, cholinergiques, sensitifs, rétinaux, striataux et hippocampaux ^{29,30}. Le CNTF induit aussi la survie et la différenciation cholinergique des neurones de la rétine de l'embryon, arrête la prolifération des neuroblastes sympathiques et induit leur différenciation cholinergique ¹². Le CNTF inhibe la mort induite par une lésion des neurones moteurs des nerfs faciaux du rat ⁴². Il améliore le déficit moteur des souris atteintes de dysfonctionnement neuromusculaire ^{42,43}. Il induit la survie des neurones moteurs lors de la mort cellulaire au cours du développement de l'embryon ⁴⁴. Le CNTF protège les neurones du système nerveux central de la mort induite par une axotomie ^{29,45,46}. Il protège aussi les neurones hippocampaux embryonnaires de la toxicité au glutamate ²⁷. L'activité neurotrophique du CNTF pourrait donc être utilisée dans le traitement de maladie neurodégénérative.

Le CNTF induit aussi la survie des photorécepteurs et possède donc des propriétés neuroprotectrices au niveau de la dégénérescence rétinale. Le CNTF serait donc un traitement thérapeutique potentiel chez des patients atteints de la rétinopathie pigmentaire.

Le CNTF induit aussi la protection des neurones striataux dans les modèles murin et primate de la maladie de Huntington ⁴⁷⁻⁵¹.

Enfin, le CNTF régule le développement des astrocytes de type 2 dans le nerf optique¹² ainsi que leur différenciation à partir de progéniteurs gliaux³⁰.

1.3.6.2. Le CNTF et la sclérose en plaques

Le rôle du CNTF dans les maladies inflammatoires démyélinisantes a été étudié en comparant le déroulement de la maladie au niveau d'un modèle murin de la sclérose en plaques (EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale) entre les souris CNTF^{-/-} et sauvage^{30,52,53}.

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire démyélinisante du système nerveux central⁵⁴. Elle touche principalement les jeunes adultes. C'est une maladie auto-immune mais son origine reste inconnue. L'implication d'un virus, d'une bactérie, de facteurs environnementaux ou génétiques seraient cependant des causes possibles de cette maladie⁵⁴. La sclérose en plaques est caractérisée par une atteinte des gaines de myéline entourant les neurones conduisant à une dégénérescence axonale⁵⁴. De plus, il y a une déplétion en oligodendrocytes à cause de leur mort prématurée par apoptose. Comme les oligodendrocytes sont les cellules productrices de myéline dans le système nerveux central, leur mort empêche la remyélinisation des neurones et entraîne des déficiences dans la transmission de l'influx nerveux⁵⁴. Cependant, un dysfonctionnement de la capacité de myélinisation des oligodendrocytes pourrait aussi être à l'origine du problème de remyélinisation des neurones⁵⁵. La sclérose en plaques est aussi caractérisée par une forte inflammation avec une infiltration de cellules T et de macrophages principalement au niveau des zones démyélinisées du système nerveux^{54,55}. Enfin, chez les patients atteints de la sclérose en plaques, la barrière hémato-encéphalique peut présenter une certaine déstructuration au cours de la maladie^{54,55}. Il existe différentes formes de sclérose en plaques. La sclérose en plaques cyclique (85% des cas) est caractérisée par une succession d'attaque et de phase d'amélioration⁵⁴. Après plusieurs années, la maladie peut évoluer en une sclérose en plaques secondaire progressive caractérisée par une détérioration chronique. Une minorité des patients présentent une forme

progressive primaire déterminée par une progression de la maladie sans phase de rémission⁵⁴. À ce jour, les traitements existants ne permettent qu'une atténuation des symptômes et ont été évalués majoritairement pour la sclérose en plaques cyclique⁵⁴. La majorité des traitements ont un effet immunomodulateur. Les corticostéroïdes sont utilisés lors des phases d'attaques de la sclérose en plaques afin de diminuer l'inflammation. L'INF β , utilisé pour le traitement de la sclérose en plaques cyclique, permettrait notamment de réduire l'inflammation et les effets nocifs des lymphocytes T⁵⁴. L'acétate de Glatiramer est un polymère de quatre acides aminés présents dans la myéline ayant des effets immunomodulateurs et neuroprotecteurs^{54,56,57}. L'acétate de Glatiramer pourrait induire une tolérance de la réponse immunitaire contre la myéline notamment par inhibition de la réponse inflammatoire au niveau des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Enfin, le dernier médicament utilisé est un anticorps humanisé monoclonal contre l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ⁵⁸⁻⁶¹. Cet anticorps permettrait de bloquer la migration des lymphocytes au niveau du système nerveux et réduirait donc l'inflammation. Tous ces médicaments ne permettent que de ralentir le développement de la maladie mais n'en influencent pas l'issue. De plus, leur utilisation est majoritairement restreinte au cas de sclérose en plaques cyclique. Il n'existe donc à ce jour aucune thérapie permettant une guérison complète. L'évaluation de molécules à activités neuroprotectrices au niveau des neurones ou des oligodendrocytes est donc une voie d'étude prometteuse pour l'élaboration d'une thérapie curative de cette maladie.

Il existe plusieurs modèles murins mimant les caractéristiques d'une maladie démyélinisante inflammatoire comme la sclérose en plaques. L'induction de la maladie chez les animaux peut être causée par l'administration soit d'un virus soit d'une protéine ou d'un épitope de la myéline. Dans ce dernier cas, le modèle est appelé encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Il existe différents peptides capables d'induire l'EAE dans les souris comme le PLP (« proteolipid protein »), le MBP (« myelin basic protein »), le MOG (« myelin oligodendrocyte glycoprotein »). Les symptômes de l'EAE varient selon le peptide administré et la

souche de souris utilisée. La maladie peut être monophasique avec une seule phase d'attaque suivie d'une rémission complète ; cyclique c'est-à-dire qu'elle est caractérisée par une succession d'attaque et de phase d'amélioration ; ou bien chronique ce qui implique qu'après la première attaque, la maladie se stabilise ou s'aggrave sans phase de rémission. L'EAE est caractérisée par une inflammation du système nerveux central et est associée à une rupture de la barrière céphalo-rachidienne, une invasion de cellules mononucléaires et une démyélination entraînant à terme la paralysie. Ces symptômes sont assez proches de ceux observés chez l'homme ⁵⁵. L'évaluation des symptômes de l'EAE peut se réaliser selon une échelle de 0 (souris saine) à 6 (souris moribonde ou morte) selon la gravité de paralysie des animaux. L'EAE peut aussi être induite par un transfert de lymphocytes T spécifique de la myéline ce qui confirme l'implication des cellules du système immunitaire dans le déclenchement de cette maladie.

Chez les souris $CNTF^{-/-}$, la maladie apparaît plus tôt et est plus sévère que chez les souris sauvages ^{30,52,53}. De plus, leur taux de guérison est faible avec une diminution de 60% du nombre de précurseurs des oligodendrocytes en prolifération et une augmentation de 50% du taux d'apoptose des oligodendrocytes. La dégénérescence vacuolaire de la myéline et les dommages axonaux sont aussi plus importants chez les souris $CNTF^{-/-}$. Toutefois, l'incidence de la maladie et la mortalité ne sont pas influencées par la délétion du CNTF. Le CNTF aurait donc un rôle protecteur au niveau des maladies inflammatoires du système nerveux principalement en agissant sur la survie des oligodendrocytes et sur l'intégrité fonctionnelle de la couche de myéline ^{30,52,53}.

In vitro, le CNTF induit la survie des oligodendrocytes. En effet, il protège les oligodendrocytes contre l'apoptose induite par le $TNF\alpha$ (« Tumor necrosis factor α ») ou par une privation de sérum mais non d'une lyse induite par le complément ^{62,63}. De même, le CNTF protège les lignées cellulaires d'oligodendrocytes (O-2A et CG-4) contre l'apoptose induite par une privation en sérum. Le CNTF induit aussi la différenciation et la maturation des précurseurs des

oligodendrocytes en cellules produisant de la myéline, de même que la formation de myéline par les oligodendrocytes ⁶⁴.

Enfin, le CNTF se retrouve dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de maladies inflammatoires du système nerveux central (la sclérose en plaques, le syndrome de Guillain-Barré, la polyneuropathie démyélinisante inflammatoire chronique) alors qu'il ne se retrouve pas dans celui de patients témoins ou ayant d'autres maladies (tumeurs, méningites). Cela peut laisser présager un rôle du CNTF dans la neuroprotection lors de maladies inflammatoires du système nerveux central ⁶⁵.

1.3.6.3. Rôle du CNTF au niveau des muscles squelettiques

Lors des essais cliniques, le CNTF a montré plusieurs effets secondaires dont une perte de poids ⁶⁶. Son activité dans le contrôle de la prise de poids a donc été étudiée. Le CNTF induit une perte de poids, diminue la prise de nourriture, augmente la sensibilité à l'insuline et améliore la tolérance au glucose dans des modèles murins d'obésité et de diabète résistant à la leptine ^{67,68}. Les mécanismes sous-jacents à ces effets sont encore peu connus mais le CNTF est considéré comme une molécule proche de la leptine agissant notamment au niveau de l'hypothalamus afin de réguler la satiété et la dépense d'énergie ⁶⁷. Le CNTF permet aussi d'améliorer les paramètres diabétiques comme le taux de glucose, de cholestérol, d'insuline, de triglycérides et régule au niveau du foie l'expression de certains gènes hépatiques ^{68,69}. Le CNTF joue donc un rôle au niveau de l'homéostasie du glucose et des lipides. Récemment le rôle du CNTF au niveau de l'obésité a été ciblé plus précisément au niveau des muscles squelettiques ⁷⁰. Les muscles squelettiques sont un lieu important d'absorption et d'oxydation du glucose et des acides gras. Dans l'obésité, ce mécanisme est altéré induisant une accumulation de lipides dans les muscles et conduisant à une résistance à l'insuline pouvant induire un diabète de type 2. Au niveau des muscles squelettiques, le CNTF induit une augmentation de la voie de signalisation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase)⁷⁰. Or cette voie de

signalisation permet l'oxydation des acides gras et une augmentation de la sensibilité à l'insuline. Cette voie de signalisation est aussi induite par la leptine. Cependant, il existe un phénomène de résistance à la leptine causé par une inhibition de sa voie de signalisation par SOCS3 (protéine fortement stimulée par la leptine)⁷¹⁻⁷³. Ici, l'action du CNTF n'est pas inhibée par SOCS3 ce qui permet d'éviter ce phénomène de résistance⁷⁰. L'effet du CNTF fonctionne dans des modèles murins d'obésité dans lesquels une résistance à la leptine a été observée. Le CNTF permet dans ces modèles de réduire la masse corporelle, d'augmenter l'oxydation des acides gras, de restaurer la sensibilité et d'améliorer l'action de l'insuline⁷⁰. De plus, l'injection du CNTF n'a induit aucun effet secondaire de type inflammatoire. Bien qu'aucune corrélation n'ait été faite entre la mutation inactivant le gène humain du CNTF et l'obésité, le CNTF pourrait être utilisé dans le traitement de cette maladie⁷⁴.

À l'opposé de ses effets de cachexie et d'atrophie musculaire, le CNTF aurait aussi un effet myotrophique au niveau des muscles squelettiques (suite notamment à une dénervation du muscle), serait associé à une force musculaire plus importante, et préviendrait l'atrophie musculaire⁷⁵.

I.3.7. Les essais cliniques avec le CNTF

Le CNTF a été testé en essais cliniques comme traitement de la sclérose latérale amyotrophique. La SLA est une maladie neuromusculaire à évolution très rapide dont l'issue est toujours fatale. Elle est caractérisée par la dégénérescence des cellules nerveuses qui contrôlent les muscles moteurs ce qui entraîne une paralysie progressive de tous les muscles volontaires alors que les facultés intellectuelles du malade restent intactes. La maladie peut être déclarée à tout âge mais l'incidence est plus grande entre 50 et 75 ans. Les causes de la SLA sont inconnues et il n'existe aucun traitement curatif de cette maladie. En essai clinique pour le traitement de la SLA, l'injection du CNTF n'a eu aucun effet bénéfique sur la progression de la maladie alors que plusieurs effets secondaires comme de la fièvre, des malaises, une perte de poids, de la fatigue et une douleur musculaire ont été notés^{66,76-78}. Ces

problèmes peuvent être dus au mode d'administration systémique du CNTF (injection sous-cutanée) conduisant à une demi-vie courte de la protéine (dégradation par le foie)⁷⁹ et une incapacité à passer la barrière hémato-encéphalique. Pour pallier ces problèmes, il est aussi possible d'injecter directement du CNTF par voie intrathécale ou encore d'insérer des cellules encapsulées exprimant le CNTF au niveau de l'espace intrarachidien. Cette dernière méthode permettant la diffusion continue du CNTF pendant quelques semaines a été testée en phase I pour sa sécurité chez des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique⁸⁰. Des résultats encourageants montrent que les capsules ont été bien tolérées et que la plupart des effets secondaires observés lors de l'administration systémique ont été éliminés⁸⁰. Cette technique a été utilisée comme traitement de la maladie de Huntington dans un modèle primate⁵⁰. La maladie de Huntington est une maladie génétique héréditaire autosomale dominante. Elle est causée par une répétition anormale d'un codon CAG dans le gène codant pour la huntingtine. Elle se déclare généralement chez les personnes de plus de 40 ans et est caractérisée par une dégénérescence neuronale affectant les fonctions motrices, cognitives et émotionnelles aboutissant à une démence. C'est une maladie à issue fatale pour laquelle il n'existe pas encore de traitement curatif. Dans un modèle primate de la maladie de Huntington, l'administration du CNTF a permis non seulement de bloquer la dégénération neuronale mais aussi d'induire une récupération de certaines fonctions motrices et cognitives⁵⁰. De plus, peu d'effets secondaires ont été observés. Le CNTF pourrait donc être utilisé non seulement à des fins préventives mais aussi curatives. Suite à ces résultats prometteurs, des essais cliniques ont montré la faisabilité, la sécurité et la tolérance de cette technique chez l'humain⁸¹.

Le CNTF a aussi été testé en essai clinique chez des patients obèses résistant à la leptine⁸². Les premières analyses montrent une légère perte de poids des patients ayant reçu l'injection de CNTF par rapport aux patients ayant reçu le placebo mais ces résultats préliminaires doivent être complétés par des études à plus grande échelle⁸².

Enfin, le CNTF a été testé en phase I d'essai clinique chez des patients atteints de dégénérescence maculaire ⁸³. Cette étude a montré à faible échelle que l'implantation de cellules encapsulées produisant du CNTF au niveau de l'œil était faisable et sécuritaire, et bien que cet essai ne soit pas voué à l'analyse thérapeutique, une légère tendance à l'amélioration de l'acuité visuelle a été observée ⁸³.

I. 4. La cardiotrophin-like cytokine (CLC)

I.4.1. Identification de CLC

Le gène codant pour CLC a été découvert en 1999 par deux groupes indépendants. Shi *et al.* ont identifié CLC par méthode bioinformatique en utilisant un algorithme permettant l'identification de peptides signaux ⁸⁴. En appliquant cet algorithme à une banque d'EST (« expressed sequence tag »), ils ont identifié un clone comprenant une séquence codante entière et l'on nommé cardiotrophin-like cytokine (CLC) à cause de son fort taux d'homologie avec la cardiotrophine (CT-1).

Simultanément, le groupe de Senaldi a identifié la même molécule qu'ils ont nommé novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3) à cause de son action neurotrophique et son effet sur les lymphocytes B ⁸⁵. Cette cytokine a été identifiée en utilisant une banque soustractive d'ADNc construite à partir de cellules de lymphomes humain Jurkat. Cette technique permet l'identification de protéines spécifiquement exprimées par les lymphocytes T activés et donc la découverte de molécules ayant une activité immunomodulatrice.

I.4.2. Caractéristiques structurales de CLC

Le gène codant pour CLC humain est situé sur le chromosome 11q13 à proximité du gène du CNTF situé sur le chromosome 11q12. Cela peut indiquer une proche relation de ces deux gènes au même titre que LIF et OSM, eux aussi co-localisés sur le même chromosome. Le gène murin de CLC est localisé sur le chromosome 19. Les

gènes humain ou murin de CLC comportent trois exons et deux introns. Les deux premiers exons codent respectivement pour 5 et 56 acides aminés et sont donc petits par rapport à l'exon 3 qui code pour la majorité de la protéine ⁸⁴⁻⁸⁶.

CLC est une protéine de 225 acides aminés. L'analyse de la structure primaire de CLC révèle la présence d'un peptide signal au niveau des 27 premiers acides aminés (séries de résidus hydrophobes conservés dans l'IL6, l'IL11, LIF, NP et OSM). La forme mature de la cytokine serait un peptide de 198 acides aminés ayant un poids moléculaire de 22 kDa. Il existe un deuxième domaine de résidus hydrophobes (acides aminés 135 à 160), retrouvé aussi chez CT-1 et avec une plus faible hydrophobicité chez LIF, mais pas chez les autres membres de la famille. La forme mature de CLC contient deux cystéines. La protéine peut donc être éventuellement stabilisée par un pont disulfure. CLC contient aussi un site potentiel de N-glycosylation (acide aminé 29). Le modèle structural de CLC est composé de quatre hélices α comme les autres membres de la famille IL6 ⁸⁴⁻⁸⁶.

Les CLC humain et murin sont homologues à 96% au niveau de la séquence des acides aminés. Cette forte homologie indique une grande conservation au niveau de l'évolution. CLC humain est homologue en acides aminés à 27% avec CT-1, 24% avec IL11, 23% avec CNTF, 21% avec LIF, et 19% avec IL6 et OSM. Les domaines d'homologie ne sont pas restreints à des zones particulières mais sont répartis uniformément le long des protéines ⁸⁴⁻⁸⁶.

I.4.3. Expression de CLC

L'ARNm de CLC humain a été retrouvé principalement au niveau des ganglions lymphatiques et de la rate mais aussi au niveau des lymphocytes du sang périphérique, de la moelle osseuse, du foie fœtal, des ovaires, du placenta, du cœur, du pancréas et du rein ^{84,86}. L'ARNm de CLC murin a été détecté principalement dans les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, les poumons, l'utérus, les ovaires, le thymus, les testicules, la glande surrénale et la peau ^{85,86}. L'ARNm de CLC est aussi retrouvé dans plusieurs tissus et organes au niveau du développement comme au

niveau des cellules neuroépithéliales fœtales, les tissus musculaires embryonnaires, les poumons, le rein, les dents, le cerveau, les muscles squelettiques⁸⁷⁻⁸⁹.

CLC est majoritairement exprimée au niveau des organes lymphoïdes secondaires laissant présager un rôle dans le système immunitaire. De plus sa présence au niveau embryonnaire peut laisser supposer une implication dans le développement.

I.4.4. Voie de sécrétion de CLC

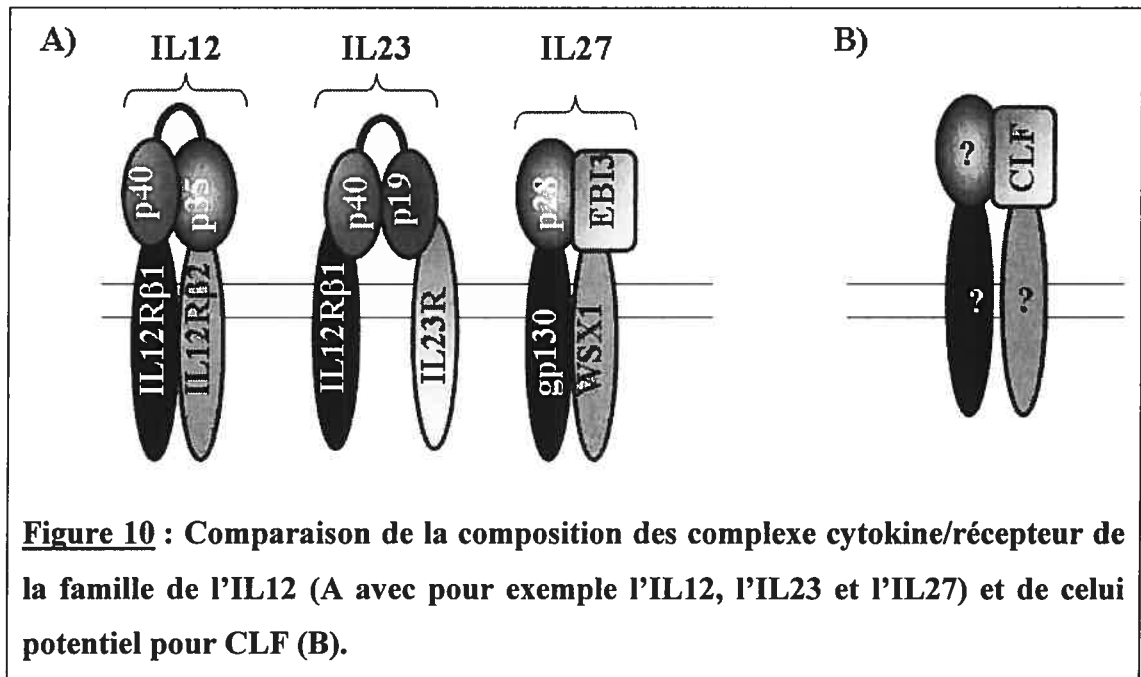
Bien que possédant un peptide signal, le CLC humain n'est pas sécrété lorsqu'il est exprimé dans des lignées cellulaires (comme les cellules COS). Il semble être retenu à l'intérieur de la cellule par un mécanisme encore inconnu. CLC interagit donc avec différents partenaires afin d'être sécrétée.

I.4.4.1. Interaction avec CLF

CLF (ou NR6) a été identifié par deux groupes différents par criblage pour le motif des récepteurs aux cytokines de type I contenant notamment la séquence WSXSW^{90,91}. CLF est co-localisé sur le chromosome 19p12 avec deux autres récepteurs de type I : le récepteur de l'érythropoïétine et EB13 (« Epstein-Barr virus induced gene 3 »). La protéine de CLF humain fait 422 acides aminés dont les 37 premiers codent pour un peptide signal. CLF humain et murin sont conservés à 85% au niveau des acides nucléiques et à 96% au niveau des acides aminés. CLF est donc un gène fortement conservé au cours de l'évolution ce qui pourrait dénoter l'importance de ce gène. L'ARNm de CLF est exprimé au niveau des ganglions lymphatiques, de la rate, du thymus, du placenta, de l'estomac, de la moelle osseuse, du cœur, de la thyroïde, des ovaires et du poumon fœtal⁹¹. Les souris CLF^{-/-} meurent dans les 24 h suivant la naissance à cause d'une impossibilité de téter⁹⁰. Ce phénotype est similaire à celui observé chez les souris CNTFR α ^{-/-}. De plus, elles présentent un nombre réduit de progéniteurs hématopoïétiques. CLF pourrait donc jouer un rôle au niveau du système immunitaire (hématopoïèse), dans la voie de signalisation des phéromones

(peut-être impliqué dans les mécanismes d'allaitement) et éventuellement au niveau de développement.

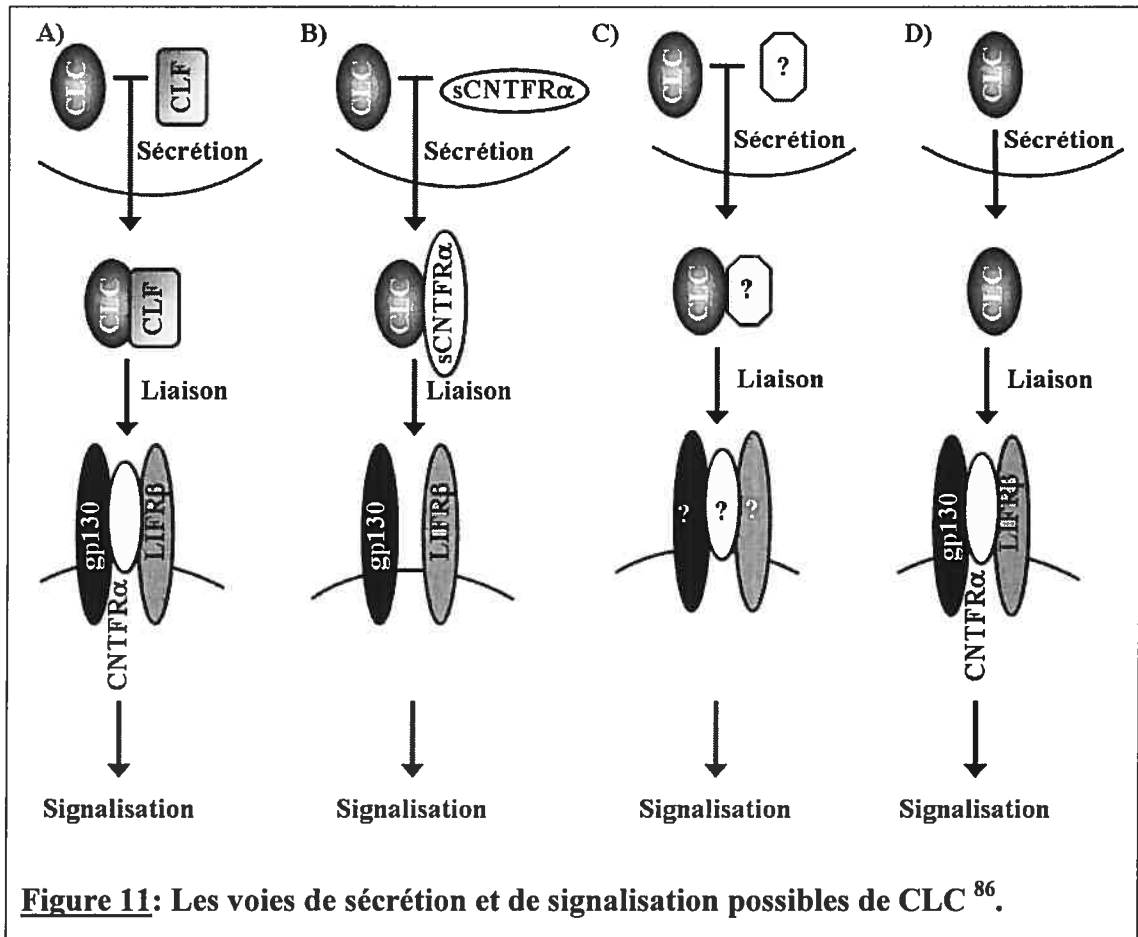
CLF possède les caractéristiques d'une chaîne α des récepteurs de la famille de l'IL6 mais pas de domaine transmembranaire ni de région hydrophobe caractéristique d'une ancre GPI. CLF ne semble donc exister que sous une forme de récepteur soluble. De plus, CLF est analogue en structure à deux membres solubles de la famille des récepteurs hématopoïétiques : EBI3 et la sous-unité p40 de l'IL12⁹⁰. EBI3, qui est un récepteur soluble aux cytokines, se lie à la sous-unité cytokine p28 pour former l'IL27 (Figure 10)⁹². De même, p40 (sous-unité récepteur ayant une homologie avec L'IL6R α et le CNTFR α) est lié soit à p35 soit à p19 (sous-unités cytokines) de manière covalente par un pont disulfure pour former respectivement l'IL12 et l'IL23 (Figure 10). Ces cytokines composites agissent ensuite au niveau d'un récepteur transmembranaire dimérique. CLF peut donc être considéré soit comme une chaîne α soluble de la famille de l'IL6 (sIL6R α , sIL11R α , sCNTFR α , Figure 2) soit comme une sous-unité d'une cytokine multimérique comme p40 de l'IL12 et l'IL23 ou EBI3 de l'IL27 (Figure 10)⁹¹.



Elson et al. ont montré que CLF est la sous-unité récepteur d'une nouvelle cytokine hétérodimérique ⁵. En effet, CLF s'associe avec la cytokine CLC pour former un complexe stable permettant la sécrétion de CLC dans des cellules COS transfectées avec ces deux molécules (Figure 11) ⁵. Ce complexe stable n'est cependant pas lié de manière covalente par des pont disulfures (comme dans le cas de l'IL12). La coexpression de ces deux molécules est donc nécessaire à une sécrétion efficace de CLC. La liaison de CLC et de CLF se fait par l'intermédiaire du site III (Figure 12) ⁹³. Alors que CLF est considéré comme une chaîne α soluble, il se lie à CLC par le site III, site impliqué dans la liaison à la chaîne β LIFR β .

1.4.4.2. Interaction avec sCNTFR α

La co-expression de CLC et du sCNTFR α dans des lignées cellulaires permet aussi la sécrétion de CLC (Figure 11). C'est une liaison relativement stable car ce complexe peut être retrouvé dans le surnageant de ces cellules. CLC est aussi sécrétée avec la forme entière du CNTFR α possédant l'ancre GPI nécessaire à sa liaison à la membrane plasmique. La liaison entre CLC et le CNTFR α se fait par le site I de la cytokine (Figure 12) ⁶.



1.4.4.3. Autres modes de sécrétion possibles

Pour être sécrétée, CLC requiert donc la liaison à l'un des deux récepteurs des cytokines : CLF ou sCNTFR α . Cependant, les souris transgéniques exprimant CLC au niveau du foie présentent un phénotype identique à des souris auxquelles CLC recombinant a été injecté par voie intra-péritonéale. De même, CLC est sécrétée au niveau du rein ⁸⁷. Or CLF et CNTFR α ne sont pas exprimés dans le foie et le rein laissant supposer dans ces organes l'existence d'une sécrétion active de CLC indépendante de CLF et CNTFR α . Les mécanismes de rétention peuvent éventuellement être masqués par la sur-expression de CLC. Cependant, la sécrétion active de CLC via des partenaires tels CLF et CNTFR α peut aussi être spécifiques à

certaines cellules. Dans ces organes où CLF et CNTFR α sont absents, CLC pourrait donc être sécrétée par l'interaction avec d'autres partenaires ou être sécrétée seule (Figure 11) ⁸⁶. L'existence d'autres voies de sécrétion reste donc encore à être élucidée (Figure 11).

I.4.5. Voie de signalisation de CLC

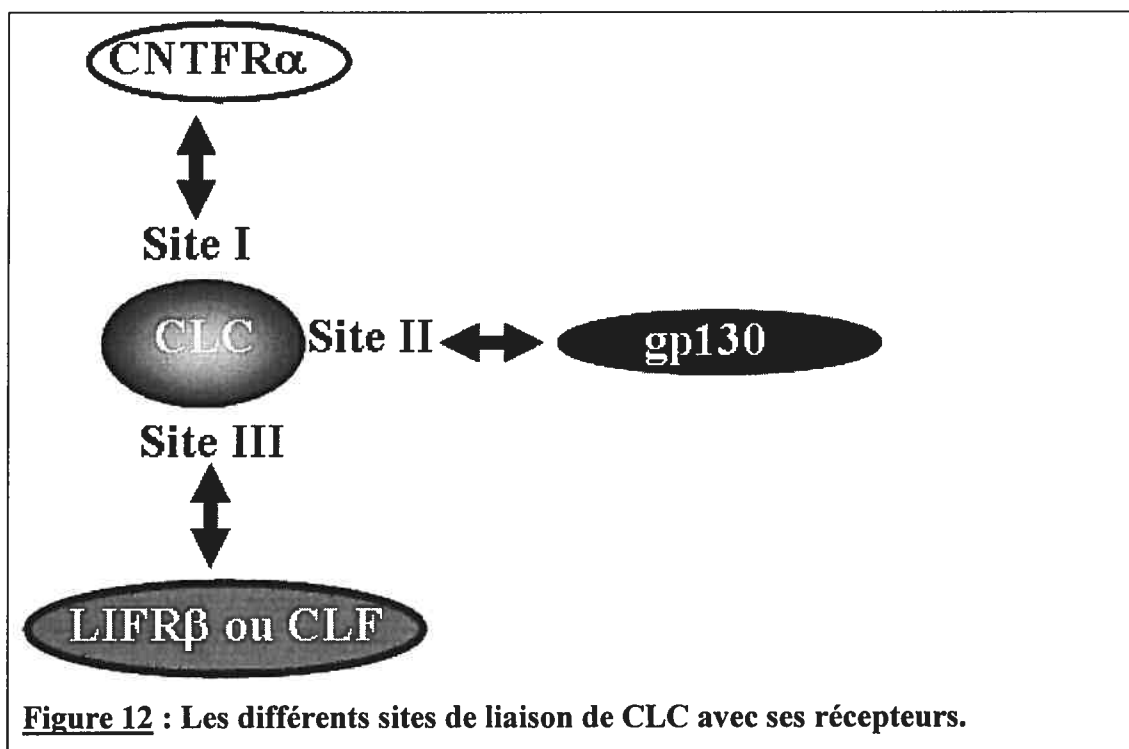
I.4.5.1. La voie de signalisation de CLC à travers le récepteur au CNTF

CLC seul ou en liaison avec CLF utilise comme voie de signalisation le récepteur au CNTF comprenant la chaîne α CNTFR α et les deux chaînes transductrices du signal, LIFR β et gp130 (Figure 3 et 11) ^{5,94}. CLC se lie par son site I au CNTFR α , par son site II à gp130 et par son site III à LIFR β ou CLF ⁹³ (Figure 12). Il est possible que CLF soit nécessaire à la sécrétion de CLC mais qu'au niveau de la liaison au CNTFR, il y ait un échange entre le CLF et LIFR β . Cependant, l'existence d'un complexe impliquant CLC, CLF et CNTFR α au niveau de la surface membranaire a été démontré ^{5,94}. De plus, la liaison de CLC/CLF au récepteur est renforcée lorsque les trois chaînes du récepteur (CNTFR α , LIFR β et gp130) sont exprimées par rapport à la seule présence de la chaîne α ⁹⁴. Le mécanisme exact de liaison aux différentes sous-unités du récepteur et de signalisation reste encore à être déterminé.

Le CNTFR est partagé par trois cytokines : CLC ⁵, CNTF ^{18,32} et NP ⁹⁵ (le CNTF peut entrer en compétition avec CLC/CLF pour la liaison au CNTF ⁵). NP est une protéine non fonctionnelle chez l'humain ⁹⁵ et le CNTF est relâchée uniquement par des cellules endommagées. Il est donc fort probable que CLC soit le ligand biologiquement le plus important au niveau de la signalisation à travers le CNTFR chez l'humain.

Le complexe CLC/sCNTFR α peut aussi agir sur des cellules possédant le récepteur au LIF. Lorsque co-exprimés dans une même cellule, CLC/sCNTFR α peut se lier sur des cellules exprimant les deux chaînes transductrices du signal gp130 et LIFR β ⁶.

Par contre, à l'inverse de la liaison CNTF/sCNTFR α , *in vitro* CLC et sCNTFR α ne se lient pas ensemble. Le mélange des deux protéines recombinantes ne peut donc pas induire de signalisation sur des cellules n'exprimant que les deux chaînes transductrices du signal gp130 et LIFR β ⁹⁴. La fusion de CLC avec le sCNTFR α par un lien de glycine et de sérine permet aussi la sécrétion de ce complexe dans des cellules de mammifères transfectées avec l'ADNc codant pour cette protéine de fusion ⁹⁶. Cette protéine de fusion agit sur des cellules exprimant simplement les deux chaînes β LIFR β et gp130 et garde les mêmes activités fonctionnelles que le complexe CLC/CNTFR α . Ces molécules de fusion plus stables induisent cependant de plus fortes réponses biologiques ⁹⁶.

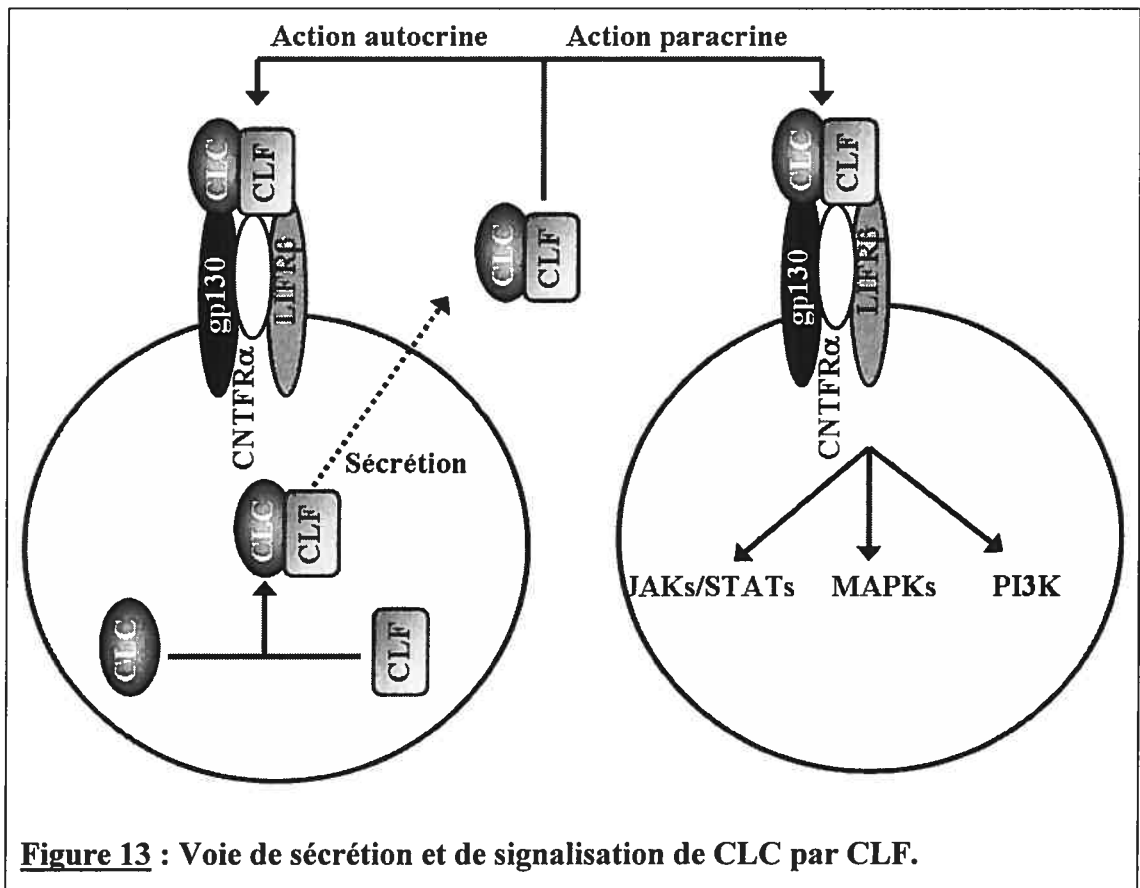


I.4.5.2. CLC induit la voie des JAKs/STATs

Après sa liaison au récepteur, CLC induit la voie des JAKs/STATs, notamment la phosphorylation de JAK1 mais aussi de JAK2 et de Tyk2. Suite à la phosphorylation

de LIFR β et de gp130, STAT3 mais aussi dans certains cas STAT1 sont recrutées et activées (Figures 6 et 13).

Ces voies d'activation ont été montrées au niveau de différentes lignées cellulaires comme des lignées cellulaires de neuroblastomes (SK-N-MC, SK-N-GP, IMR-32)^{5,6,84,85,94}, d'hépatocytes (HepG2)⁵, de cellules d'origine corticotrope (AtT-20)⁹⁷ et des cellules neuroépithéliales de souris⁸⁹. Au niveau de la lignée AtT-20, CLC induit par activation du CNTFR la phosphorylation de STAT3 et STAT1. Ces dernières induisent l'expression de SOCS3 qui joue un rôle de régulateur négatif de la voie d'activation de CLC (Figure 7)⁹⁷.



I.4.5.3. Les autres voies de signalisation de CLC

La phosphorylation de gp130 et LIFR β par CLC induit aussi le recrutement et l'activation de SHP2. Cette activation induit la voie de signalisation via les MAPKs (en particulier ERK1/2) ainsi que celle de la PI3-kinase⁹⁴ (Figures 8 et 13). Ces activations ont été démontrées dans les lignées cellulaires précédemment citées (paragraphe I.3.5.2.).

CLC, cytokine de la famille de l'IL6, recrute donc les mêmes voies de signalisation que les autres membres de cette famille.

I.4.6. Activités biologiques de CLC

I.4.6.1. Activités neurotrophiques

In vitro, CLC induit la survie des neurones sympathiques et moteurs d'embryon de poulet^{85,88}. De même CLC/CLF et CLC/sCNTFR α induisent la survie de neurones moteurs de rats et de lignées cellulaires neuronales^{5,6}.

L'injection de CLC à des embryons de poulet permet d'augmenter le nombre de motoneurones lombaires survivant à la période de mort cellulaire qui a lieu au cours du développement du système nerveux chez l'embryon⁸⁸. De plus, dans les souris CLF^{-/-}, le nombre de motoneurones lombaires et faciaux est réduit à la naissance⁸⁸. CLC/CLF apparaît donc comme un facteur neurotrophique induisant la survie des motoneurones lombaires et faciaux durant la période de mort cellulaire dans le développement de l'embryon⁸⁸.

CLC en synergie avec BMP-2 (« bone-morphogenetic protein ») induit la différenciation des cellules neuroépithéliales fœtales en astrocytes. Cette différenciation est dépendante de l'activation de STAT3. CLC induit dans ces cellules l'activation du promoteur du gène GFAP (« glial fibrillary acidic protein ») qui est un marqueur des astrocytes⁸⁹.

CLC possède aussi des activités neuroprotectrices au niveau des RGCs (« retinal ganglion cells ») *in vivo*⁹⁸. En effet, l'injection de CLC protège les RGCs de la mort induite par un dommage causé au nerf optique ou par l'application d'une substance toxique comme le NMDA (N-méthyl-D-aspartate)⁹⁸. CLC pourrait donc jouer un rôle neuroprotecteur au niveau de la rétine et du nerf optique et être utilisé en thérapie pour les glaucomes ou les maladies neurodégénératives de la rétine.

En conclusion, CLC possède des activités neurotrophiques et induit la survie de différentes catégories de neurones. CLC est donc un candidat dans le traitement de maladies neurodégénératives au même titre que le CNTF.

1.4.6.2. Activités immunomodulatrices

En injection dans la souris, CLC induit la production de protéine amyloïde A sérique, augmente la production d'IL6 et de cortisone par l'IL1, cause une perte de poids, induit une hyperplasie des lymphocytes B avec une augmentation de la production d'IgG et d'IgM dans le sérum⁸⁵ ainsi qu'une augmentation de la production d'IgE spécifiques d'un antigène⁹⁹. CLC induit des altérations importantes au niveau des organes lymphoïdes secondaires notamment au niveau des ganglions lymphatiques et de la rate qui montrent une hyperplasie folliculaire avec de larges follicules secondaires et centres germinatifs⁸⁵. Cela est majoritairement dû à une expansion du pool de lymphocytes B. CLC a été décrite à l'origine comme un facteur de stimulation des cellules B⁸⁵.

Les activités immunomodulatrices de CLC ont aussi été étudiées à travers la génération de souris transgéniques exprimant CLC sous le promoteur de l'apolipoprotéine induisant son expression dans le foie et normalement sa libération dans le sang⁹⁹. Le phénotype de ces souris ressemble beaucoup au phénotype observé lors de l'injection de CLC recombinant par voie intra-péritonéale. Les souris transgéniques surexprimant CLC montrent une hyperplasie des cellules B. Ces souris présentent une augmentation dans le sérum des concentrations d'IgM, d'IgE, d'IgG2b, d'IgG3, d'anticorps anti-ADN double brin et de protéine amyloïde A

sérique ⁹⁹. 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. CLC régule donc la stimulation des lymphocytes B et la production d'anticorps en induisant préférentiellement une réponse de type Th2 par rapport à Th1 ⁹⁹. Des dépôts au niveau du rein de plaques non amyloïdes contenant des IgM, des IgG et C3 caractéristiques d'ultrastructures similaires à celles dans la glomérulopathie immunotactôïde ont aussi été observées ⁹⁹.

CLC induit la prolifération de la lignée cellulaire Raji (lymphome de cellules B humaine) et de cellules B primaire de souris en co-stimulation avec un anti-IgM ⁹⁹.

CLC est donc une nouvelle cytokine avec de fortes activités immuno-régulatrices.

1.4.6.3. Activités neuroimmunoendocrines

CLC est exprimée au niveau de l'hypophyse de souris et de la lignée tumorale hypophysaire de cellules folliculostellaires de souris TtT/GF^{86,100}. Au niveau de cette lignée, l'expression de CLC est stimulée par deux neuropeptides : PACAP (« pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ») et VIP (« vasoactive intestinal peptide »). La voie de signalisation de ces deux peptides implique la liaison à des récepteurs couplés aux protéines G menant à l'activation de l'adénylate cyclase et à la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). La stimulation de l'expression de CLC par le PCAP et le VIP est dépendante de la voie de signalisation de la PKA (protéine kinase A), de la PKC (protéine kinase C) et d'ERK1/2 ^{86,100}.

Le PACAP et le VIP sont exprimés à travers l'organisme et exercent de nombreuses activités biologiques au niveau des systèmes cardiaque, digestif, reproducteur, immunitaire, nerveux et endocrinien. Ils sont exprimés au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse et contrôlent la sécrétion de différentes hormones. Par exemple, le PACAP et le VIP modulent l'expression de la proopiomélanocortine (POMC) et la sécrétion de l'ACTH (hormone adrénocorticotropique) au niveau des cellules corticotrope AtT-20 ^{86,100}. Il est possible que cette régulation soit dépendante de CLC. En effet, dans cette lignée corticotrope AtT-20, CLC induit par

phosphorylation de STAT1 et 3, l'activation des promoteurs de SOCS3 et de POMC et stimule la sécrétion d'ACTH ⁹⁷.

Enfin, l'injection de CLC dans la souris induit une augmentation de la production de cortisone par l'IL1 ⁸⁵. CLC joue donc un rôle modulateur de la fonction corticotrope et possiblement au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien. C'est donc un nouveau modulateur paracrine de la fonction hypophysaire.

1.4.6.4. Autres activités de CLC

CLC, comme l'IL6 et d'autres cytokines de cette famille, est un facteur de croissance (induit la prolifération) et de survie (protège contre l'apoptose causée par la dexaméthasone) pour les myélomes humains (au niveau des lignées cellulaires INA-6.Tu11 et des cellules primaires) ¹⁰¹. CLC pourrait donc jouer un rôle au niveau de la pathophysiologie des myélomes multiples. En effet, la production de CLC au niveau de la moelle osseuse pourrait engendrer la croissance des cellules du myélome. De plus, CLC pourrait avoir un effet dans le remodelage des os induisant une résorption osseuse au niveau du myélome ¹⁰¹. L'inhibition de la voie d'action de CLC pourrait donc être un traitement thérapeutique envisageable des myélomes.

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 ¹⁰².

Enfin, CLC aurait un effet dans le contrôle circadien de l'activité locomotrice ¹⁰³. CLC est exprimé au niveau d'une sous-population de neurones du noyau suprachiasmatique (SCN). Cependant, il s'agit d'un variant d'épissage de CLC. En effet, l'exon 1 de CLC est remplacé par deux nouveaux exons et l'expression de ce nouveau variant de CLC est sous le contrôle d'un autre promoteur ¹⁰³. L'expression de ce variant de CLC suit un rythme circadien avec un pic durant la période journalière de quiescence locomotrice. Son expression est inversement corrélée avec l'activité locomotrice. CLC serait un inhibiteur réversible de l'activité locomotrice et

pourrait donc être un facteur régulateur du passage du repos à l'activité durant une période journalière ¹⁰³.

I.4.7. Le « Cold Induced Sweating Syndrome » ou CISS

Le CISS est une maladie autosomale récessive caractérisée par des mutations dans le gène codant soit pour CLF (CISS1) soit pour CLC (CISS2) ^{104,105 106}. C'est une maladie extrêmement rare. À ce jour, six cas seulement ont été répertoriés.

I.4.7.1. CISS1

Ce syndrome a été décrit en premier en 1978 chez deux sœurs Israéliennes ¹⁰⁵. Les symptômes se sont déclarés vers l'âge de 16 ans. Ces deux femmes se mettaient à transpirer à profusion au niveau du dos et de la poitrine à des températures de 7 à 18°C. De plus, elles présentaient d'autres anomalies notamment au niveau de la morphologie du visage, du palais, une voix nasale, une incapacité de bouger correctement les coudes et une cyphoscoliose ¹⁰⁵. Ce n'est qu'en 2003 que la cause génétique de cette maladie a été identifiée. Il s'agit de 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 ¹⁰⁴.

En 2003, deux autres patients manifestants des symptômes semblables ont été répertoriés ¹⁰⁴. Il s'agit de deux frères Norvégiens. À la naissance, ces frères ne étaient pas spontanément et ont du être hospitalisés afin d'être alimentés correctement. Ces problèmes d'alimentation dus à un manque d'appétit de leur part ont persisté durant leur enfance. Ces patients ont une sensibilité accrue au froid (brûlure extrême avec de la neige), mais une insensibilité au chaud (ils étaient capables de laisser leurs doigts dans une flamme ou de l'eau bouillante). Leurs problèmes de transpiration ont commencé à l'âge de 7 ans. Ils ne transpirent pas lorsqu'ils sont exposés à des températures chaudes, lors d'épisodes fiévreux ou suite

à un exercice. Par contre, ils transpirent à profusion lorsqu'ils sont placés à des températures froides ou tempérées. Ils présentent aussi d'autres symptômes comme une cyphoscoliose, une atrophie musculaire, une diminution de sensibilité à la douleur, des mains et des orteils courts, les pieds plats, une incapacité de mouvement totale de leurs coudes, une expression faciale réduite et une anomalie au niveau du palais. Chez ces patients a été identifiée une délétion homozygote de deux paires de bases au niveau de l'exon 5 du gène de CLF. Cette délétion induit un décalage du cadre de lecture et mène à la génération d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Les symptômes des frères Norvégiens sont plus marqués que ceux des sœurs Israéliennes. Le degré d'importance de la mutation (délétion conduisant à un décalage du cadre de lecture par rapport à une substitution) est sans doute à l'origine de ces différences.

En 2006, un dernier cas a été répertorié ¹⁰⁶. Il s'agit d'une Canadienne de 24 ans qui souffre de transpiration excessive causée par l'exposition à des températures basses, le goût sucré, l'appréhension et la peur. Par contre, elle ne transpire pas à la chaleur. Comme les autres, elle présente des anomalies au niveau du faciès (voix nasale, incapacité de flexion des coudes, anomalies au niveau des oreilles, des mains, des pieds et du palais). Cette femme possède deux mutations au niveau du gène CLF conduisant théoriquement à une protéine non fonctionnelle.

I.4.7.2. CISS2

Il n'existe à ce jour qu'un seul cas de CISS2 ¹⁰⁶. Il s'agit d'un Australien de 72 ans. Il souffre d'un excès de transpiration au froid mais ne transpire pas à des températures chaudes. De plus, à des températures élevées, il ressent une chaleur intense et doit se refroidir avec de l'eau afin d'éviter l'évanouissement. De même que les autres, il présente des anomalies au niveau du palais, des coudes, du faciès, des doigts, des pieds et souffre d'une scoliose. Sa mobilité est aussi réduite à cause d'une maladie dégénérative au niveau de la moelle épinière. Ce patient est hétérozygote pour deux mutations dans le gène codant pour CLC : une mutation non sens 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). L'analyse plus poussée des 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 ¹⁰⁶. 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 ¹⁰⁶. En plus de ces deux mutations, ce patient est hétérozygote pour un mutant de CLF (délétion d'un codon CTG entre les bases 73-75). Ce variant représente un polymorphisme commun retrouvé aussi dans la population saine.

I.4.7.3. Rôles potentiels de CLC et CLF

La ressemblance des phénotypes des patients affectés par des mutations de CLC et de CLF suggère que le complexe CLC/CLF existe chez l'homme et possède des fonctions uniques.

Les phénotypes des patients ayant des mutations dans les gènes de CLF et CLC peuvent donc nous renseigner sur les rôles biologiques potentiels de ces protéines. Il existe des caractéristiques communes entre les différents patients. C'est une maladie autosomale récessive caractérisée par des problèmes de morphologie soit au niveau de la colonne vertébrale soit au niveau du squelette du faciès, des coudes, des mains et des pieds. CLC et CLF jouent donc probablement un rôle au niveau du développement embryonnaire du squelette et des muscles.

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

De plus, seul CLF semble jouer un rôle au niveau de la sensation de douleur et du contrôle de l'appétit par comparaison des phénotypes des patients Norvégiens et du patient Australien.

Enfin, le patient le plus âgé (CISS2) montre des signes cliniques de neurodégénérescence. Cela peut laisser envisager un rôle de CLC dans la

neuroprotection. Ces problèmes peuvent cependant être causés par l'âge avancé du patient CISS2 par rapport aux autres patients.

En général, les mutations au niveau des cytokines n'induisent pas de phénotype particulier et ne sont pas responsables de maladies car les effets biologiques des cytokines sont redondants. Il est plus courant que les maladies soient occasionnées par des mutations dans le récepteur (comme CLF ici). La description d'une mutation dans CLC conduisant à une maladie indique l'existence d'une fonction spécifique et non redondante de cette cytokine par rapport aux autres membres de sa famille.

II. Les cytokines de la famille de l'IL12

II.1. Généralités

Les cytokines de la famille de l'IL12 sont très proches des cytokines de la famille de l'IL6 et regroupent principalement trois membres : l'IL12, l'IL23 et l'IL27. Ce sont des cytokines hétérodimériques composés de deux sous-unités différentes : une sous-unité récepteur et une sous-unité cytokine. L'IL12 est composé de p35 et de p40, l'IL23 de p19 et de p40 et l'IL27 de p28 et de EBI3. Ces cytokines sont formées sur le même modèle que le complexe CLC/CLF décrit plus en détails ci-dessus (Figure 10). Ces cytokines se lient à des récepteurs de classe I et induisent la voie de signalisation des JAKs/STATs. Elles jouent un rôle prépondérant au niveau du système immunitaire et notamment au niveau de la régulation des réponses immunitaires Th1/Th2 (Th : « T helper »).

Les réponses immunitaires peuvent être divisées en au moins deux catégories selon le profil d'expression des cytokines des lymphocytes T. En effet, au cours d'une réponse immunitaire, les lymphocytes T CD4+ naïfs peuvent se différencier en lymphocytes Th1 et Th2 selon leur rôle. Les cellules effectrices Th1 permettent d'induire des réponses immunitaires cellulaires de type Th1 contre les pathogènes intracellulaires et sont caractérisées principalement par la production de cytokines comme l'interféron γ (INF γ). Les cellules effectrices Th2 induisent l'immunité

humorale (ou réponse immunitaire de type Th2), protègent contre les pathogènes extracellulaires, permettent la stimulation des lymphocytes B, génèrent les réactions allergiques et sont caractérisées par la production d'IL4. La différenciation de ces cellules T en lymphocytes Th1 et Th2 est régulée par de multiples facteurs comme la dose et l'affinité de l'antigène, les molécules de co-stimulations mais aussi les cytokines. En effet, lors d'une infection, la production de cytokines particulières va induire soit une réponse Th1 (rôle important des cytokines de la famille de l'IL12) soit Th2 (rôle important de l'IL4). Un dérèglement des ces voies de différenciation peut amener à une pathologie du système immunitaire (mauvaise élimination des pathogènes, maladie auto-immune) ¹⁰⁷.

II.2. L'IL12

II.2.1. Caractéristiques de l'IL12

L'IL12 a été la première cytokine hétérodimérique à être découverte. Elle a été identifiée à partir de lignée cellulaire B de lymphomes transformée par le virus Epstein-Barr (EBV) ^{108,109}. Elle est composée de deux sous-unités reliées par deux ponts disulfures. Ces deux sous-unités sont nommées p35 et p40 en fonction de leur poids moléculaire et sont situées sur des gènes indépendants. En effet, p35 est située sur le chromosome 3p12-3q13.2 chez l'Homme et 3 chez la souris alors que p40 se trouve sur le chromosome 5q31.33 chez l'Homme et 11 chez la souris.

Il n'existe aucune homologie de séquence entre p35 et p40. Par contre, p35 présente des homologies avec les cytokines de la famille de l'IL6 (dont principalement l'IL6) et possède donc une structure comprenant quatre chaînes α . La sous-unité p40 n'est pas homologue à des cytokines mais fait partie des récepteurs de la famille hématopoïétique de type I. La sous-unité p40 est homologue principalement aux domaines extracellulaires de l'IL6R α et du CNTFR α . Cependant, p40 n'existe pas sous forme membranaire. La sous-unité p40 peut aussi exister sous forme d'homodimère (appelé p80) dans lequel les deux sous-unités de p40 sont liées par

des ponts disulfures. La sous-unité p40 est produite en plus grande quantité que p35. De plus, p40 est une protéine qui peut être sécrétée seule alors que p35, bien que possédant un peptide signal, est faiblement sécrétée seule et nécessite pour une sécrétion active sa liaison à p40 ^{107,110,111}.

II.2.2. Caractéristiques du récepteur à l'IL12

Le récepteur à l'IL12 (IL12R) est composé de deux sous-unités l'IL12R β 1 et l'IL12R β 2. Ces sont des récepteurs transmembranaires de type I ayant des homologies avec gp130 (Figures 14 et 15). L'IL12R β 1 est une protéine de 100 kDa alors que l'IL12R β 2 fait 130 kDa ¹¹². Ces deux protéines possèdent un peptide signal. L'IL12R β 2 humain et murin présentent 68% d'homologie alors que pour l'IL12R β 1, il n'y a que 54% d'homologie. L'IL12R humain et murin présentent des différences au niveau de l'affinité relative des sous-unités du récepteur à la cytokine. L'IL12R β 1 murin peut se lier avec une faible ou une forte affinité avec l'IL12 murine. L'IL12R β 2 se lie avec une faible affinité avec l'IL12 humaine alors que cette association chez la souris est trop faible pour être mesurée ¹⁰⁷. Cependant, un mécanisme général de liaison comprendrait l'interaction de p40 avec l'IL12R β 1 et de p35 avec l'IL12R β 2. L'IL12R β 2 est la sous-unité transductrice du signal de l'IL12, elle peut se lier à JAK2 et possède les tyrosines d'ancrage à STAT 4. L'IL12R β 1 peut se lier à Tyk2 mais ne possède pas de tyrosine permettant la liaison des STATs ^{107,110,111,113}.

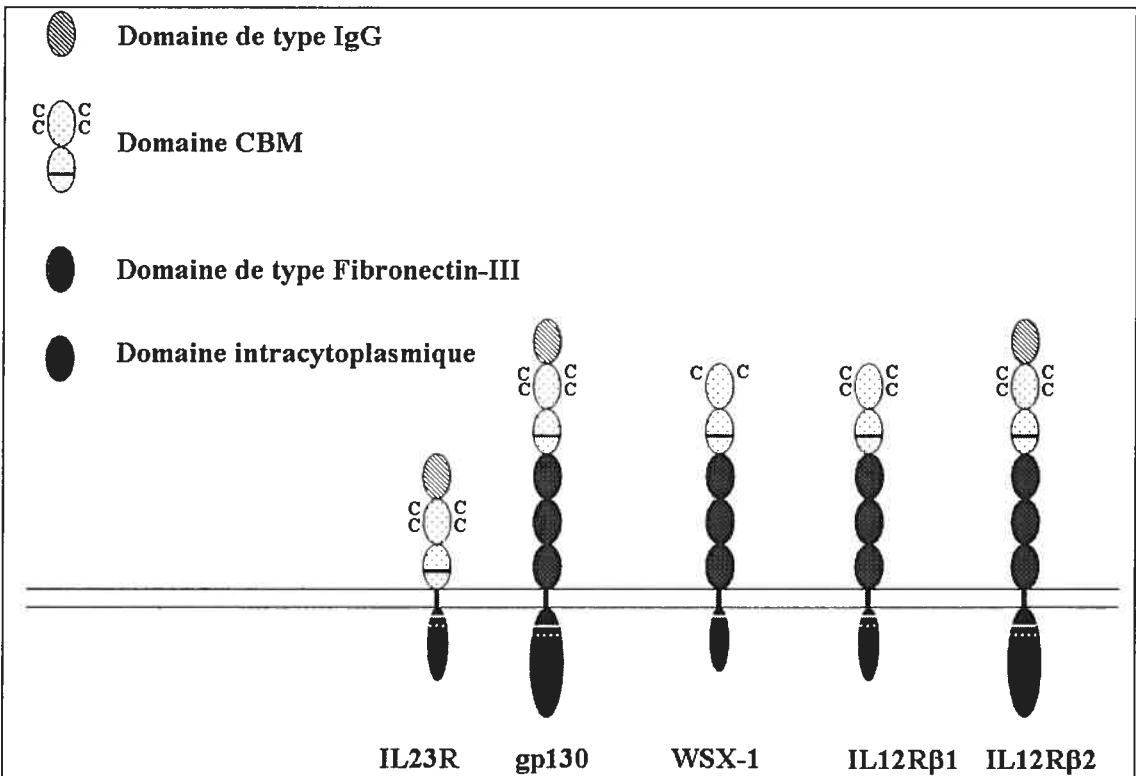


Figure 14 : Représentation schématique des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL12 ¹¹⁴.

Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs de type I comme ceux de l'IL6 (voir Figure 2). Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine CBM comprenant des cystéines (noté C) et le motif WSXSW (trait noir épais). De plus, ils sont composés de domaines de type fibronectine-III et IgG. Au niveau de leur partie cytoplasmique, ils possèdent éventuellement les motifs boîtes 1 (ligne blanche) et 2 (pointillé blanc) nécessaires à la signalisation cellulaire.

II.2.3. Expression de l'IL12 et de l'IL12R

II.2.3.1. L'IL12

L'IL12 est exprimée principalement par les CPA, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les microglies et les cellules dendritiques (DC). L'ARNm de p35 est

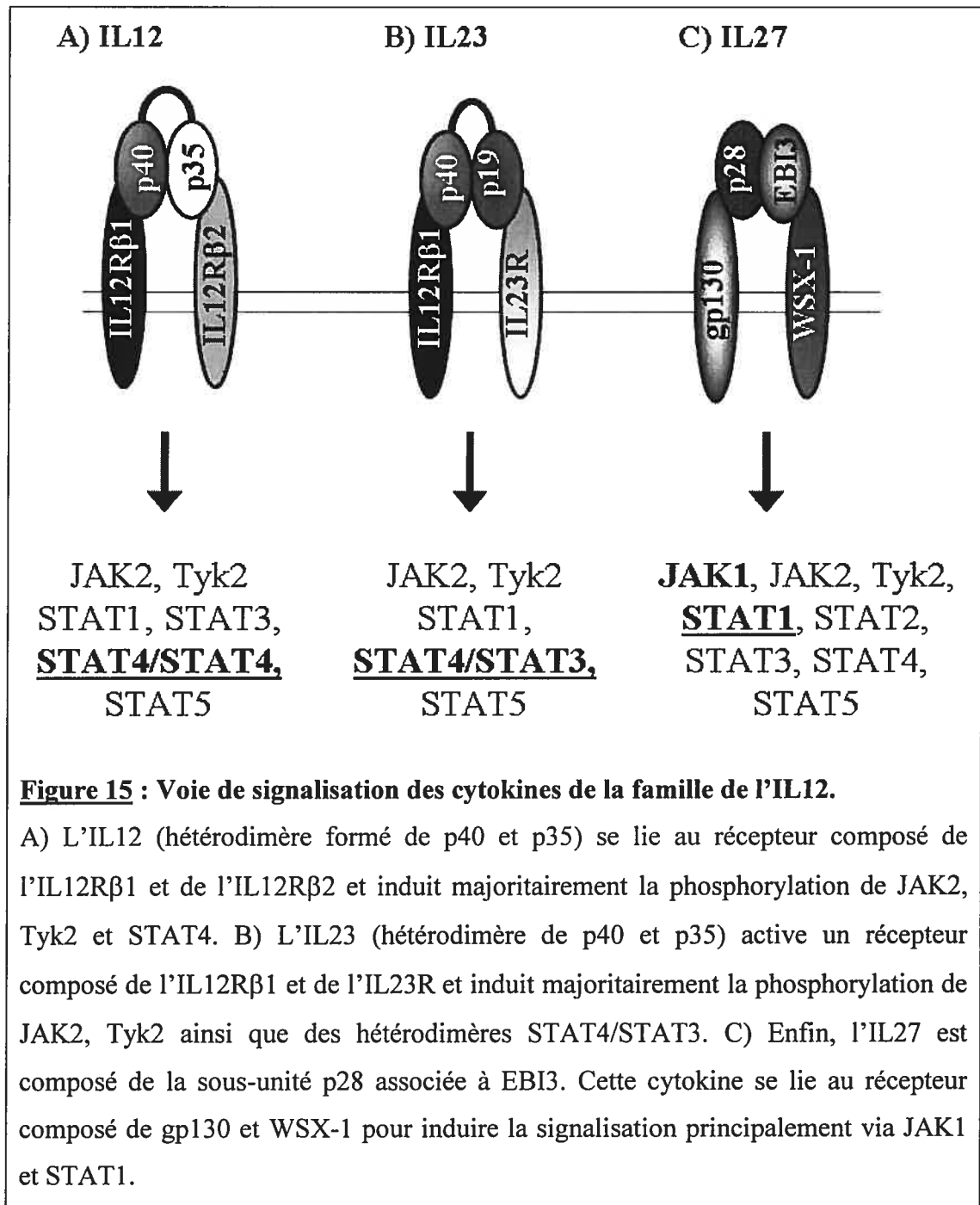
présent dans de nombreux tissus et types cellulaires (expression ubiquitaire) alors que celui de p40 est plus restreint aux cellules produisant les hétérodimères actifs d'IL12 et d'IL23. C'est donc p40 qui confère la spécificité d'expression des cytokines. De plus, les deux sous-unités peuvent être localisées au niveau de tissus et de types cellulaires différents. L'expression de p40 est fortement augmentée suite à une activation des cellules [par des PAMPs (« pathogen-associated molecular pattern »), des facteurs de co-stimulation, d'autres cytokines comme l'INF γ] alors que celle de p35 ne l'est que légèrement (cela peut même être un facteur limitant de la production d'IL12). La production d'IL12 est majoritairement inhibée par les cytokines de type Th2 (IL10, IL4, TGF, INF β) et par certains récepteurs couplés à des protéines G^{107,110,111}.

II.2.3.2. L'IL12R

L'IL12R est principalement exprimé par les cellules tueuses naturelles (NK, « natural killer »), les cellules T activées et les DC. L'expression de L'IL12R β 2 est restreinte aux cellules Th1 et est régulée par les cytokines telles l'IL10 et TGF- β et d'oxyde nitrique (NO). C'est majoritairement l'expression de l'IL12R β 2 qui confère aux cellules la possibilité de réponse à l'IL12. L'IL12R β 1 est exprimé sur d'autres types cellulaires comme les cellules Th2 sur lesquelles l'IL12R β 2 n'est pas présent laissant supposer l'implication de l'IL12R β 1 dans un autre récepteur^{107,111}.

II.2.4. Voies de signalisation

L'IL12 induit par liaison à son récepteur la phosphorylation des JAKs notamment JAK2 et Tyk2, puis le recrutement des STATs (STATs 1, 3, 4 et 5) notamment STAT 4 qui induit la majorité des effets biologiques de l'IL12 (Figure 15)^{107,110,111,115}.



II.2.5. Activités biologiques

II.2.5.1. Activités biologiques de l'IL12

L'IL12 joue un rôle immuno-régulateur au niveau des lymphocytes T et des cellules NK. Son effet est primordial dans la génération d'une réponse immunitaire Th1 et dans la défense de l'organisme contre des pathogènes intracellulaires (Figure 16). L'activation de l'immunité innée par la liaison de PAMPs au TLR (« Toll-like receptor ») induit la production d'IL12 par les CPA¹⁰⁷. L'IL12 induit une production d'INF γ par les macrophages et les DC dépendante de l'activation de STAT4¹⁰⁷. L'IL12 induit la production d'INF γ par les NK et les cellules T ce qui favorise l'activation des macrophages et l'inflammation. L'IL12 et l'INF γ favorisent la différenciation des lymphocytes T en cellule Th1 produisant de grande quantité d'INF γ ¹⁰⁷. De plus, l'IL12 contribue à la prolifération des lymphocytes Th1 spécifiques d'un antigène suite à leur stimulation par les CPA, augmente l'activité cytotoxique des NK et favorise la génération des lymphocytes T cytotoxiques CD8+¹⁰⁷. L'IL12 induit la prolifération des cellules T naïves (humaines et souris) et mémoires (humaines). Enfin, l'IL12 joue un rôle au niveau de la réponse immunitaire mémoire¹⁰⁷. L'IL12 est donc une cytokine pro-inflammatoire servant de lien entre le système immunitaire inné et adaptatif.

L'IL12 a aussi un effet anti-tumoral en inhibant la croissance des tumeurs. Cependant, en essais pré-cliniques comme agent anti-tumoral, l'IL12 s'est révélée avoir des effets toxiques et être peu efficace¹¹¹.

II.2.5.2. Analyse des mutants de l'IL12 et de l'IL12R

Des mutations au niveau de l'IL12 ou de l'IL12R chez l'humain ou la souris causent de sévères défauts au niveau de l'immunité cellulaire et augmentent la susceptibilité aux infections intracellulaires¹¹³.

Cependant, chez les souris déficientes pour les différentes sous-unités de l'IL12 ou de son récepteur, il existe une réponse Th1 résiduelle avec une production d'INF γ et une résistance aux infections indiquant l'implication d'autres facteurs dans la génération de la réponse Th1. La diminution de la réponses Th1 ainsi que celle de la production d'INF γ est plus accentuée chez les souris p40^{-/-} que p35^{-/-}. De plus, les souris p40^{-/-} sont résistantes à l'EAE alors que les souris p35^{-/-} sont plus susceptibles. Ces différences de phénotype observées entre les souris p35^{-/-} et p40^{-/-} indiquent l'existence d'autres complexes impliquant la sous unité p40. Ces autres complexes ayant probablement un rôle dans la différenciation Th1 peuvent être soit p80, l'IL23 ou un complexe nouveau encore non identifié^{107,111,115}.

II.2.5.3. Activités biologiques de p80

p80, un homodimère de p40, peut jouer un rôle d'antagoniste de la voie de l'IL12 et de l'IL23 par compétition de liaison à leur récepteur. En effet, p80 peut inhiber la réponse immunitaire induite par l'IL12 et ainsi agir comme régulateur physiologique de l'IL12.

Cependant, récemment des activités agonistes au niveau des réponses immunitaires ont été démontrées. Par exemple, p80 semble stimuler la différenciation des lymphocytes Tc1 CD8+ *in vitro*. Ces effets peuvent être éventuellement transmis par l'interaction de p80 avec l'IL12R β 1. Ce dernier peut se lier à Tyk2 mais il n'est pas prouvé que cela induise une signalisation intracellulaire. Une deuxième hypothèse serait que p80 agisse à travers un récepteur comprenant l'IL12R β 1 associé à une autre sous unité encore inconnue^{107,111,115}.

II.3. L'IL23

II.3.1. Caractéristiques de l'IL23

p40 peut se lier par des liaisons disulfures à une autre sous-unité cytokinique, p19, pour former une nouvelle cytokine biologiquement active : l'IL23. p19 a été à l'origine identifiée par criblage des banques de données pour des protéines homologues à l'IL6¹¹⁶. Les protéines p19 humaine et murine possèdent 70% d'homologie. p19 est très proche de p35 au niveau de la séquence et forme comme elle, un complexe relié par des ponts disulfures avec p40. p40 est donc une sous-unité partagée entre l'IL12 et l'IL23. De même que pour p35, pour être sécrétée p19 doit être associée à p40^{107,115}.

II.3.2. Caractéristiques du récepteur à l'IL23

L'IL23 se lie à un récepteur composé de deux chaînes : L'IL12Rβ1 (chaîne du récepteur partagée avec l'IL12) et l'IL23R¹¹⁶ (Figure 14). L'IL23R humain est une protéine transmembranaire de 629 acides aminés alors que l'IL23R de souris comporte 644 acides aminés. Les deux ont une homologie de séquence de 84%. L'IL23R est très homologue à l'IL12Rβ2 et à gp130. L'IL23R humain est situé sur le chromosome 1p31.2-32.1, très proche du gène de l'IL12Rβ2 laissant supposer une duplication du gène au cours de l'évolution. L'IL23R est composé d'un peptide signal, d'un domaine de type IgG et de deux domaines CBM (Figure 14). Il possède aussi des sites de liaison possibles pour les STATs (notamment STATs 4) et trois domaines potentiels SH2^{107,115}.

II.3.3. Expression de l'IL23 et de l'IL23R

L'IL23, comme l'IL12, est exprimée principalement par les CPA activées notamment les DC, les macrophages et les monocytes¹¹⁶. Leur expression est aussi augmentée

suite à une activation des cellules par différents PAMPs et diminuée par les cytokines de type Th2 ¹⁰⁷.

La sous-unité p19 est exprimée de manière assez ubiquitaire alors que l'expression de p40 est plus réduite. Par exemple, p19 est aussi exprimée au niveau des cellules T polarisés et des cellules endothéliales ¹¹⁶.

L'IL23R est exprimé au niveau des lymphocytes T mémoires ou activés, des NK, des monocytes et des DC ^{107,117}.

II.3.4. Voies de signalisation

L'IL23 en se liant à son récepteur composé de l'IL12R β 1 et de l'IL23R induit la voie de signalisation des JAKs/STATs (Figure 15). C'est la sous-unité IL23R qui est majoritairement responsable de la transcription du signal en recrutant JAK2 et Tyk2 qui vont à leur tour phosphoryler le récepteur pour créer des sites d'ancrage aux différentes STATs (majoritairement STAT 4 mais aussi STAT 3, 1 et 5). L'IL23 induit une plus faible phosphorylation de STAT4 que l'IL12. De plus, alors que la stimulation par l'IL12 induit la formation de dimères de STAs 4, l'IL23 conduit à la formation d'hétérodimère de STAT 3 et 4 laissant donc supposer des voies d'action différentes pour ces deux cytokines ^{107,110,111,115}.

II.3.5. Activités biologiques de l'IL23

L'IL23 comme l'IL12 joue un rôle important dans la réponse immunitaire de type Th1 (Figure 16). L'IL23 induit la production d'INF γ par les DC. Il joue un rôle important au niveau de la réponse des lymphocytes T CD4+ mémoire et effecteur (prolifération et production d'INF γ) mais n'a aucun effet sur les lymphocytes T naïfs ^{107,110,111,116}. L'IL23 peut aussi induire la différenciation des cellules T naïves CD4+ en cellules produisant de l'IL17, appelées Th17 ¹¹⁸⁻¹²¹. Ces cellules Th17 représentent une nouvelle lignée de cellules T distinctes des lignées Th1 et Th2 ¹¹⁹⁻¹²¹. L'IL17 est une cytokine pro-inflammatoire contribuant soit à l'apparition de

maladies auto-immunes inflammatoires soit à une réponse protectrice contre des pathogènes ¹²².

Les souris p19^{-/-} et p40^{-/-} sont résistantes à l'induction de l'EAE, maladie inflammatoire auto-immune ^{110,111,117,120} et l'administration d'anticorps anti-p40 et anti-p19 abolit les symptômes de l'EAE ¹¹³. Les différences de phénotypes observées entre les souris p35^{-/-} et p40^{-/-} dans le modèle EAE sont probablement dues aux effets de l'IL23. La progression de l'EAE dans les souris IL17^{-/-} ou suite au traitement avec des anticorps anti-IL17 est partiellement atténuée ¹²⁰. Une partie des effets délétères de l'IL23 dans la progression de maladies auto-immunes passe probablement par la génération de cette nouvelle lignée Th17. À l'opposé, les souris surexprimant p19 ou p40 développent des réponses inflammatoires systémiques ¹²².

II.4. Les complexes formés avec EBI3

II.4.1. EBI3

II.4.1.1. Caractéristiques structurale de EBI3

EBI3 ¹²³ a été initialement découvert comme un gène activé au niveau des lymphocytes B infectés par l'EBV (d'où son nom d' « Epstein-Barr virus-induced gene 3 »). Ce gène est présent sur le chromosome humain 19p13.2/3. EBI3 est une protéine de 34 kDa (masse moléculaire calculée de 26 kDa) faisant partie de la famille des récepteurs hématopoïétiques de type I. Elle possède donc le motif conservé de cette famille WSXWS ainsi que les quatre cystéines présentes dans le CBM. EBI3 est proche du récepteur soluble p40 de l'IL12 et de l'IL23 (27% d'identité) ainsi que du CNTFR α (30% d'identité) et de CLF. EBI3 n'a pas de motifs d'ancrage à la membrane, présente deux sites potentiels de N-glycosylation et possède une région hydrophobe caractéristique d'un peptide signal. EBI3 est donc une protéine sécrétée. Cependant, cette protéine est majoritairement retenue au niveau du réticulum endoplasmique, même si une faible partie est sécrétée. Une

petite quantité de EB13 a aussi été détectée au niveau de la membrane plasmique. EB13 se lie indépendamment à deux sous-unité cytokine p35 ou p28 pour former deux cytokines différentes^{92,124} ou se retrouver sous forme d'homodimère.

II.4.1.2. Expression de EB13

EB13 est exprimé principalement au niveau du placenta, de la rate, des amygdales, des DC du tissu lymphoïde, des macrophages, des lymphocytes B et T, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales de l'intestin^{123,125}. Son expression est stimulée par l'activation des TLR [activation par des PAMPs comme le Lipopolysaccharide (LPS)] au niveau des DC et macrophages¹²⁶.

II.4.1.3. Rôle de EB13 à travers l'analyse des souris EB13^{-/-}

Dans une première étude, les souris EB13^{-/-} présentent une réponse Th2 diminuée (dans un modèle expérimental de colite) avec une diminution du nombre de cellules NK T invariante (iNKT) mais un nombre de cellules B et T normale¹²⁷. De plus, suite à une stimulation, les cellules T de la rate et les iNKT produisent moins d'IL4 et présentent de légères variations de production d'INF γ ¹²⁷. EB13 jouerait donc un rôle au niveau de la réponse Th2 et serait un facteur de croissance de iNKT. Les cellules iNKT possèdent les marqueurs de surfaces des cellules NK et T, et sont caractérisées par une chaîne α invariante du récepteur des cellules T (TCR) qui se lie préférentiellement à certaines chaînes β du TCR. Ce sont des cellules productrices d'IL4, cytokine importante dans la différenciation des cellules Th2¹⁰⁷. Les iNKT contribuent aussi à la réponse immunitaire contre certaines tumeurs, infections et auto-antigène ainsi qu'à la tolérance périphérique et aux réponses d'hypersensibilité. Un deuxième groupe a cependant montré que les souris EB13^{-/-} présentaient une réponse Th1 diminuée suite à une infection à *Leishmania major* avec une augmentation de la production d'IL4, d'IL10 et d'IL13, et une diminution de la production d'INF γ dans les ganglions lymphatiques¹²⁸. Par contre, la guérison et la

réponse mémoire au pathogène ne sont pas diminuées. EBI3 jouerait donc un rôle au niveau des premières étapes de la réponse immunitaire de type Th1.

Son action au niveau de la réponse immunitaire soit Th1 soit Th2 peut éventuellement provenir du type d'infections, de la présence d'autres cytokines ou d'autres facteurs environnementaux.

II.4.2. Le complexe p35/EBI3

EBI3 peut former un complexe avec la sous-unité cytokine p35 de l'IL12¹²⁴. La formation de ce complexe facilite la sécrétion des deux partenaires d'interaction. À l'inverse de l'IL12 et de l'IL23, cette liaison n'implique pas de pont disulfure. Depuis la découverte de ce complexe, aucune activité biologique propre à cette cytokine n'a été identifiée^{107,124}.

II.4.3. L'IL27

II.4.3.1. Caractéristiques de l'IL27

EBI3 peut également se lier à une autre sous unité récemment identifiée p28 pour former une cytokine sécrétée : l'IL27^{92,129}. La sous-unité p28 a été identifiée par homologie aux cytokines de la famille de l'IL6 à partir d'un criblage de banque de données⁹². p28 est donc fortement homologue aux cytokines à quatre hélices α de la famille de l'IL6 et de l'IL12 notamment l'IL11, CLC et CNTF. Le gène de p28 est situé au niveau du chromosome 16p11 chez l'homme et code pour une protéine de 243 acides aminés (234 chez la souris) de poids moléculaire de 24 kDa. Il existe des sites potentiels de N-glycosylations pour p28 de souris et de O-glycosylations pour p28 humaine. Les p28 humain et murin ont 78% d'homologie entre elles. p28 possède 14 résidus chargés négativement entre les hélices C et D, structure observée dans aucune autre des cytokines de la famille IL6/IL12¹⁰⁷. La présence d'un peptide signal laisse suggérer que p28 est une protéine sécrétée. Cependant, la protéine

humaine n'est pas retrouvée dans le surnageant de cellules transfectées avec p28, alors que la murine est présente en faible quantité. La co-expression de EBI3 et de p28 permet une sécrétion plus importante de la cytokine ⁹². À l'inverse de l'IL12 et l'IL23, ce complexe n'est pas stabilisé par des ponts disulfures.

II.4.3.2. Caractéristiques du récepteur à l'IL27

L'IL27 se lie et active le récepteur comprenant deux chaînes : WSX-1 ou TCCR (« T cell cytokine receptor ») et gp130 (Figure 15) ^{92,130}. Le fait que l'IL27 utilise la chaîne β gp130, positionne cette cytokine à l'interface des deux familles de cytokine de l'IL12 et de l'IL6.

WSX-1 a été identifié par un premier groupe par recherche dans les banques de données (au niveau du cerveau fœtal humain) de molécules analogues à gp130 ¹¹⁴ et par un deuxième groupe à partir de leucocytes de sang périphérique et de rate par analogie aux récepteurs de type I ¹³¹. WSX-1 fait donc partie de la famille des récepteurs aux cytokines de type I (Figure 14). C'est une protéine transmembranaire de 636 acides aminés avec une partie extracellulaire de 482 acides aminés et une partie cytoplasmique de 96 acides aminés. Sa séquence comprend un peptide signal permettant sa sécrétion. WSX-1 possède un domaine CBM avec deux cystéines conservées et

le motif WSXSW (d'où son nom) ainsi que le domaine boîte 1 au niveau intracellulaire. Il est très proche en structure de gp130 (19% d'identité) et est fortement homologue à l'IL12R β 2 (26% d'identité). Le gène de WSX-1 est situé sur le même chromosome que celui de l'IL12R β 1 (chromosome 19) ¹¹⁴. Il existe 62% d'homologie entre WSX-1 humain et murin ¹⁰⁷.

II.4.3.3. Expression de l'IL27 et de son récepteur

II.4.3.3.1. L'IL27

L'IL27 est exprimée principalement par les CPA notamment les cellules myéloïdes et les DC. Son expression est rapidement stimulée par l'activation des cellules (notamment par les DC et monocytes activés au LPS). À l'inverse de p28, EBI3 est fortement exprimé par le placenta ⁹². L'expression de EBI3 a été rapportée dans plusieurs autres types cellulaires dans lesquels p28 ou p35 n'étaient pas présentes laissant supposer un rôle de EBI3 par lui-même ou à travers un nouveau complexe non identifié.

II.4.3.3.2. L'IL27R

WSX-1 est présent dans les tissus lymphoïdes adultes comme les leucocytes du sang périphérique, le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques, le poumon ^{114,131}. Au niveau de ces organes, WSX-1 est exprimé par de nombreux types cellulaires comme les macrophages, les monocytes, les NK, les cellules B, les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les DC, les cellules endothéliales, les cellules T régulatrices et les cellules T mémoires ^{122,130,131}.

Certains groupes ont montré que WSX-1 est fortement exprimé au niveau des lymphocytes CD4+ naïf et que son expression est diminuée au cours du développement des lymphocytes en Th1 et Th2 laissant supposer un rôle de l'IL27 au niveau du développement précoce des lymphocytes T ¹³¹. Cependant, à l'inverse, d'autres ont démontré que son expression est faible au niveau des lymphocytes T naïfs CD4+ et CD8+, mais qu'elle est fortement augmentée lors d'une stimulation au niveau des cellules T effectrices et mémoires ^{107,132}. Au niveau des cellules NK et NKT, son expression est diminuée suite à une activation ¹³². Le profil d'expression de WSX-1 lors d'une réponse immunitaire semble donc être complexe et régulé différemment selon les cellules et le stimuli.

II.4.3.4. Voies de signalisation

L'IL27 induit par liaison à son récepteur la voie de signalisation des JAKs/STATs. WSX-1 se lie à JAK1 et suite à leurs phosphorylations, il y a recrutement de STAT1 au niveau de la tyrosine phosphorylée de WSX-1 (Figure 15). L'activation de STAT1 va induire la transcription du facteur de transcription T-bet (« T-box expressed in T cells ») qui amène entre autre à l'expression du récepteur IL12R β 2 au niveau des cellules T CD4+ naïve^{107,133}. L'IL27 régule donc l'expression de T-bet qui est un facteur de transcription important dans la réponse Th1 (notamment au niveau de l'activation de la transcription du gène de l'INF γ). Cette activation de T-bet peut aussi être indépendante de STAT1¹³⁴. La signalisation de l'IL27 par son récepteur conduirait en plus de la phosphorylation de STAT1 à celle de STAT2, 3, 4 et 5 induisant entre autres l'expression de multiples cytokines pro-inflammatoires (comme l'INF γ)^{130,134,135}.

II.4.3.5. Activités biologiques

II.4.3.5.1. Activités pro et anti-inflammatoires

II.4.3.5.1.1. Activités pro-inflammatoires au niveau de la réponse Th1

II.4.3.5.1.1.1. Rôles spécifiques à l'IL27

L'IL27, comme l'IL12, induit la prolifération des cellules T CD4+ naïves et T CD8+ naïves activées au niveau de leur TCR (notamment avec un anti-CD3 et anti-CD28) et augmente la génération de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques^{92,136}. De plus, au niveau des premières étapes du développement Th1, l'IL27 induit en synergie avec l'IL12 une forte production d'INF γ par les cellules T naïves (Figure 16)^{92,136}. En effet, comme indiqué au paragraphe précédent, l'IL27 permet l'expression du récepteur IL12R β 2 au niveau des cellules T CD4+ et CD8+ naïves, sensibilisant ces

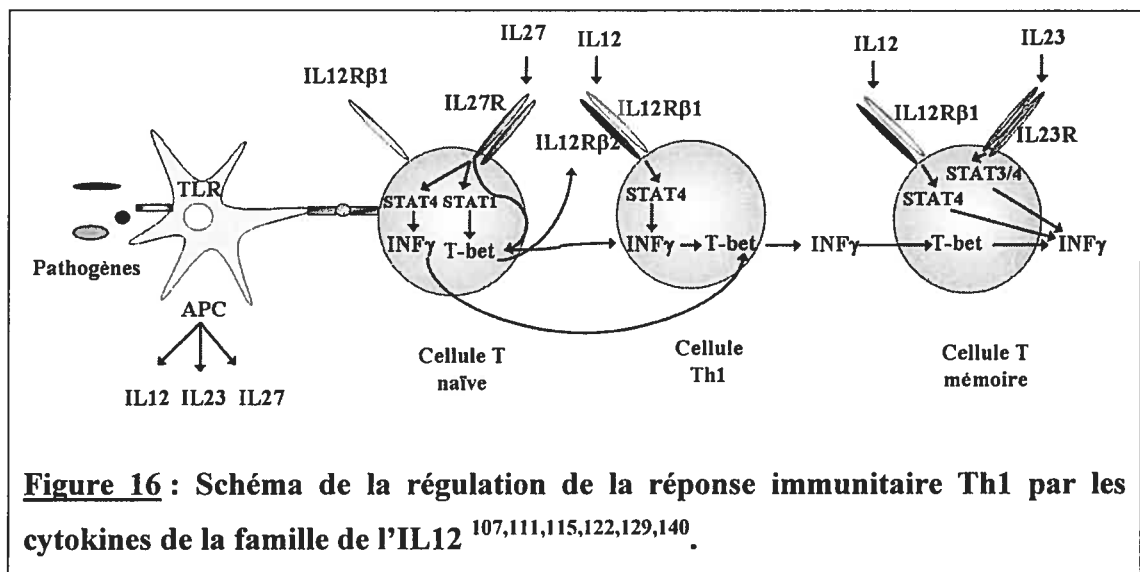
cellules à l'IL12 et induisant la production d'INF γ dans les premières étapes de la réponse Th1^{133,136}. Par contre, l'IL27 n'a aucun effet sur les lymphocytes T CD4+ mémoires^{92,129}. L'IL27 permet aussi en synergie avec l'IL12 d'augmenter la production d'INF γ par les NK. L'IL27 induit aussi l'expression de cytokines pro-inflammatoires aux niveaux des mastocytes et des monocytes^{122,130}.

L'analyse des souris WSX-1^{-/-} a aussi permis de mieux caractériser l'effet de l'IL27. Ces souris sont fertiles, viables et ne présentent pas d'anomalies importantes. Par contre, leur réponse Th1 est déficiente avec une diminution de la production d'INF γ et une plus forte susceptibilité aux infections par des pathogènes intracellulaires comme *Listeria monocytogenes* et *Leishmania major*^{131,137}. Les souris WSX-1^{-/-} présentent dans les étapes plus tardives de l'infection une production d'INF γ normale et une élimination du pathogène. De plus, il y a une légère augmentation de la réponse Th2 avec une augmentation entre autre de la production de l'IL4. L'IL27 joue donc un rôle au niveau de l'initiation de la production d'INF γ dans la réponse Th1 mais non dans sa maintenance¹⁰⁷. De même, l'infection par la nématode *Trichuris muris* n'induit pas chez les souris WSX-1^{-/-} d'infection chronique caractéristique d'une réponse Th1 laissant donc supposer un rôle de l'IL27 dans la régulation de la réponse Th1^{138,139}.

II.4.3.5.1.1.2. Récapitulatifs des actions des cytokines de la famille de l'IL12 au niveau de la réponse Th1

Une réponse Th1 optimale nécessite l'implication de multiples cytokines aux différentes phases d'activation et de différenciation des lymphocytes T. Lors d'une infection, les CPA stimulées vont produire de l'IL12 et de l'IL27 (Figure 16). L'IL27 va induire à travers la phosphorylation de STAT1, l'expression du facteur de transcription T-bet qui mènera à une augmentation de l'expression de l'IL12R β 2 au niveau des cellules T CD4+ (ou CD8+) naïves^{133,136}. C'est le début de la réponse Th1. T-bet, un facteur de transactivation de l'INF γ , va permettre d'augmenter l'expression de cette cytokine via l'activation de STAT1. L'IL12 va aussi pouvoir

induire la production d'INF γ suite à la phosphorylation de STAT4 par les cellules T naïves. Alors que l'IL27 et l'IL12 agissent dans les premières phases de la réponse Th1, l'IL23 joue un rôle au niveau des cellules T effectrices et mémoires. L'IL23 maintient donc la réponse Th1 en induisant une prolifération de ces cellules et une production d'INF γ . Il est possible que ce soit un schéma un peu simpliste de la réponse Th1 induite par des pathogènes intracellulaires. Il existe probablement d'autres cytokines permettant de réguler de manière positives ou négatives cette voie de signalisation ¹⁰⁷.



II.4.3.5.1.2. Activités inhibitrices de l'IL27

D'autres études montrent cependant un nouveau rôle de l'IL27 au niveau de l'inhibition de la réponse immunitaire Th1 et Th2. En effet, les souris WSX-1^{-/-} répondent correctement à une infection avec des pathogènes comme *Toxoplasma gondii*. L'infection des souris WSX^{-/-} avec *Toxoplasma gondii*, *Trypanozoma cruzi* ou *Mycobacterium tuberculosis* amène à une exagération de la réponse inflammatoire avec une production accrue de cytokines (comme l'IL2, le TNF, l'INF γ ou des cytokines de type Th2) et une prolifération de lymphocytes T conduisant à une

maladie inflammatoire létale ¹⁴⁰⁻¹⁴². De même, dans un modèle murin d'hépatite, les souris WSX-1^{-/-} sont plus sensibles à la maladie avec une hyperproduction d'IL4, d'INF γ et de cytokines pro-inflammatoires par les NKT ¹⁴³. La réponse de type Th2 dans les souris WSX-1^{-/-} 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 ¹⁴⁴. En effet, l'IL27 inhibe l'expression basale de GATA-3 (via la phosphorylation de STAT1 et la diminution d'expression de STAT6), un facteur de transcription essentiel dans la réponse Th2 ¹³⁴. GATA-3 inhibe aussi la réponse Th1 en bloquant l'expression de STAT4 et de l'IL12R β 2 et donc la voie de signalisation de l'IL12. L'IL27 serait donc aussi un répresseur de la réponse Th2 ¹⁴⁴. La signalisation à travers WSX-1 est essentielle pour la régulation de l'hyperactivité des cellules T. L'IL27 semble avoir un rôle dans la limitation de l'intensité et de la durée de la réponse immunitaire innée et adaptative ^{122,139,140}.

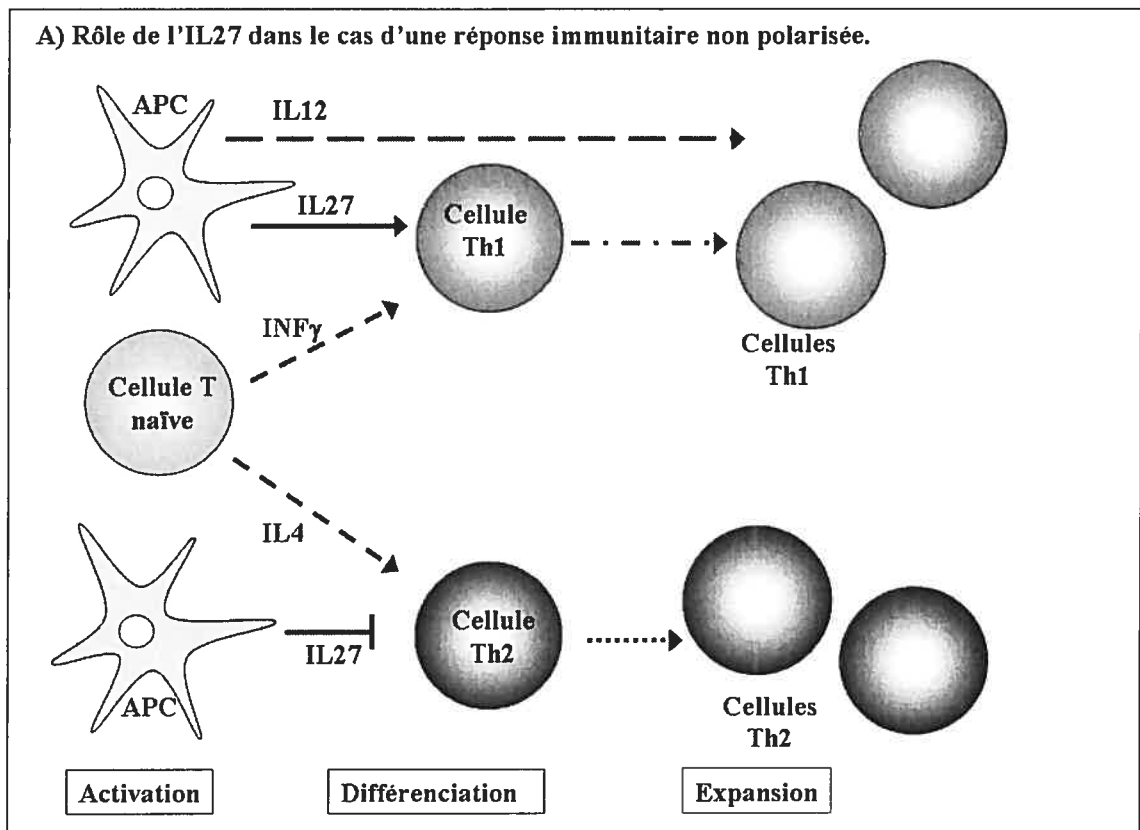
II.4.3.5.1.3. Conclusion

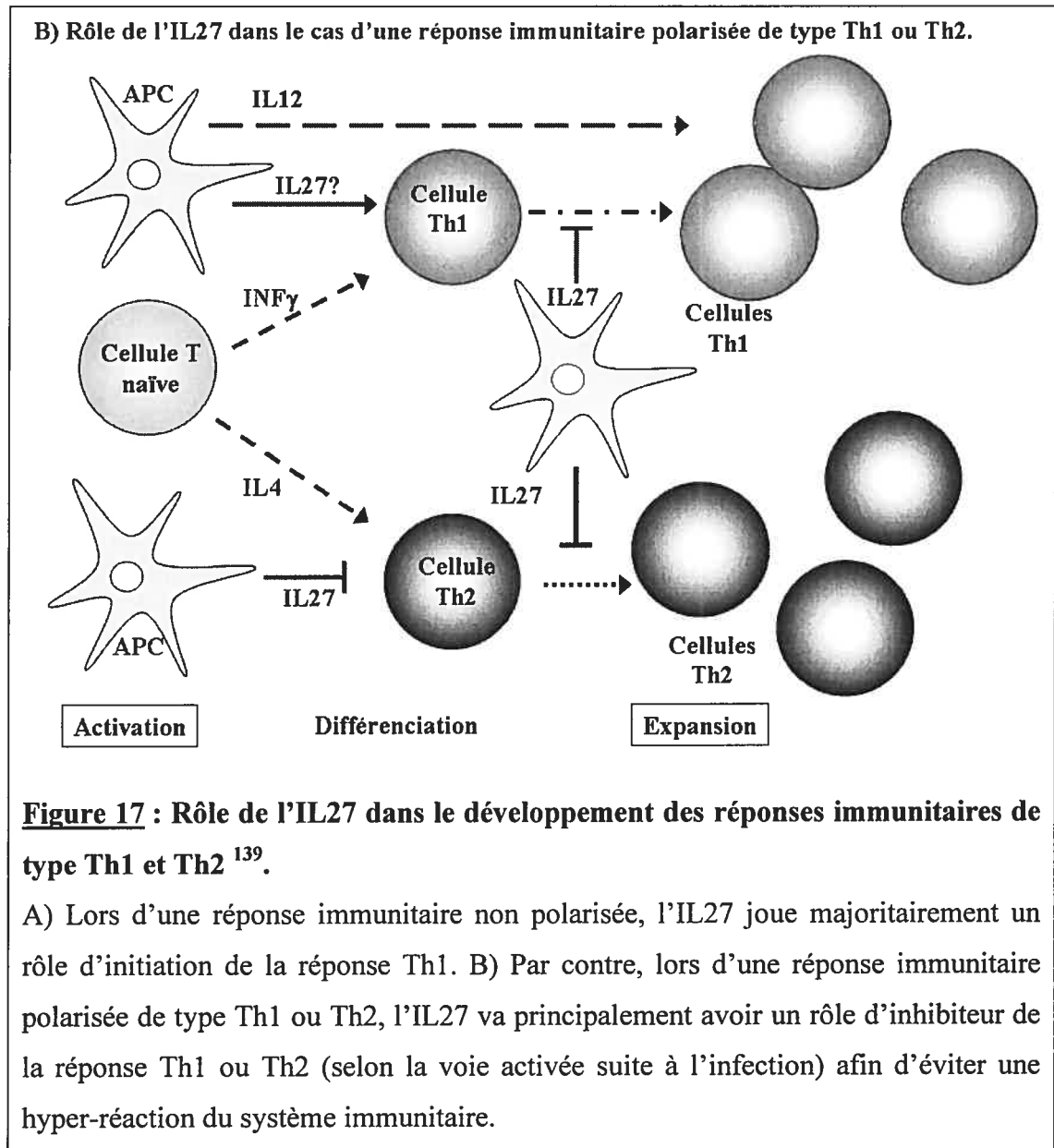
Les différentes études montrent donc un rôle controversé et complexe de l'IL27 au niveau de la régulation de la réponse immunitaire avec des activités pro- et anti-inflammatoires ¹²². L'IL27 peut donc soit induire une réponse contre un pathogène soit réguler par un contrôle négatif une trop forte activité du système immunitaire ¹²². En fait, l'IL27 induirait une réponse Th1 dans le cas d'infection avec une réponse immunitaire non polarisée c'est-à-dire induisant une faible production d'IL4 et d'IL12 (comme pour l'infection à *Leishmania major* ; Figure 17 A) ^{137,145}. L'IL27 compenserait au début de l'infection le manque d'IL12 (dont la production est inhibée par l'IL4) et induirait par la suite sa sécrétion permettant une réponse Th1 optimale.

Par contre, lors d'une réponse polarisée de type Th1 (infection à *Toxoplasma gondii* caractérisée par beaucoup d'IL12 et peu d'IL4), l'IL27 ne serait pas requise pour induire une différenciation Th1 ni pour inhiber une réponse Th2 déjà faible (Figure

17 B). Elle aurait plutôt un effet anti-proliférateur au niveau des cellules Th1 afin d'éviter une trop forte réponse immunitaire pouvant provoquer des pathologies diverses.

De même, lors d'une réponse immunitaire polarisée de type Th2 (infection à *Trichuris muris* caractérisée par beaucoup d'IL4 et peu d'IL12), l'IL27 jouerait son rôle inhibiteur majoritairement au niveau des cellules Th2 (Figure 17 B)¹³⁹. L'IL27 limite aussi la production de l'IL2 lors de la différenciation Th1. L'IL2 est aussi un inhibiteur de l'expression de WSX-1¹³². L'IL2 est un facteur de survie et de croissance des cellules T. Une trop forte production d'IL2 peut être corrélée au développement de maladies inflammatoires sévères. L'effet anti-inflammatoire et inhibiteur de la réponse des cellules T par l'IL27 pourrait donc passer par l'inhibition de la production d'IL2^{122,132}.





Enfin, les diversités des actions attribuées à l'IL27 peuvent être éventuellement dues à l'existence d'autres complexes impliquant EBI3 ou p28 ainsi qu'à la possibilité d'existence d'autres cytokines activant WSX-1 ¹⁴⁰. La génération et l'étude de souris p28^{-/-} devraient permettre de lever une partie de ces ambiguïtés. Mieux comprendre le rôle de l'IL27 et des cytokines de la famille de l'IL12 pourra amener à leur

utilisation en clinique dans le traitement de pathologies du système immunitaire. En particulier, des inhibiteurs spécifiques ou des agonistes de cette famille pourront être utilisés dans le traitement de maladies inflammatoires de type Th1 (comme la sclérose en plaques, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type I) et même de type Th2 ¹¹⁷.

II.4.3.5.2. Autres activités biologiques de l'IL27

L'IL27 aurait aussi un rôle anti-tumoral en augmentant l'activité cytotoxique et la production d'INF γ ^{111,146,147}.

L'IL27 joue un effet au niveau du changement de classe isotypique des cellules B ¹⁴⁸. Suite à une stimulation (par du LPS ou CD40), l'IL27 induit l'expression de T-bet et le changement de classe en IgG2a selon un mécanisme dépendant de STAT1. La classe d'anticorps IgG2a joue un rôle dans la genèse de maladie auto-immune humorale ainsi que dans la protection contre les pathogènes.

II.4.3.5.3. Rôle au niveau des maladies inflammatoires du CNS

Vu le rôle de l'IL27 dans la régulation de la réponse immunitaire, sa fonction au niveau d'une maladie Th1 comme de la sclérose en plaques a été étudiée. Dans les souris EAE, l'expression de p28, de EBI3 et légèrement de WSX-1 est stimulée à l'apogée de la maladie au niveau des CPA du système nerveux central et des ganglions lymphatiques. De plus, l'expression de WSX-1 est augmentée dans les premières phases de l'EAE surtout au niveau des lymphocytes CD4+ infiltrant le système nerveux central ¹⁴⁹. Enfin, l'IL27 est présent dans les microglies activées ¹⁵⁰. Cela peut laisser présager un rôle de cette cytokine dans les maladies inflammatoires du système immunitaire comme la sclérose en plaque.

L'utilisation d'anticorps neutralisant anti-p28 supprime les symptômes de l'EAE dans les souris (une même étude a été réalisée avec des anticorps anti-p40) ¹¹⁷. Ce traitement permet de diminuer la différenciation des cellules T CD4+ en cellules Th1

ainsi que la production d'INF γ par ses cellules ¹⁵¹. L'IL27 induit une production d'INF γ au niveau de lignées cellulaires de lymphocytes T effectrices et mémoires spécifiques du peptide MOG33-35 et des anticorps anti-p28 inhibe cette production d'INF γ ¹⁵¹. Au niveau de l'EAE ou de la sclérose en plaques, les anticorps anti-p28 pourraient donc éventuellement agir au niveau des lymphocytes T activés et mémoires. Ces effets pourraient être responsables de l'amélioration des symptômes observée lors du traitement des souris atteintes d'EAE par les anticorps anti-p28. Des traitements visant à inhiber l'IL27 pourrait donc être utilisés comme traitement des maladies inflammatoires impliquant une réponse Th1 ^{151,152}.

II.4.4. Autres complexes de EBI3

EBI3 est exprimé plus largement que p28 et p35 laissant supposer d'autres fonctions pour EBI3. De plus, les différences de phénotype de souris EBI3^{-/-} et WSX-1^{-/-} laissent supposer un rôle de EBI3 sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec une autre sous-unité non encore identifiée dans le développement de la réponse Th2 éventuellement par action sur les iNKT ou les lymphocytes T ^{107,127}.

Les homodimères de EBI3 ou un nouveau complexe hétérodimérique impliquant EBI3 pourraient jouer un rôle tampon au niveau de la réponse immunitaire en inhibant l'action de l'IL27. EBI3 étant fortement exprimé au niveau du placenta (principalement au niveau des trophoblastes durant toute la grossesse) et dans le sang périphérique de femmes enceintes, il pourrait agir comme régulateur de la réponse inflammatoire lors de la grossesse pour prévenir une attaque du fœtus par le système immunitaire maternel ^{123,153}. Notamment, il pourrait jouer un rôle au niveau de la production de cytokine de type Th2 ou au niveau de l'interaction des trophoblastes avec les NK. De même, l'excès d'EBI3 produit par les CPA pourrait empêcher une trop forte stimulation des lymphocytes T CD4+ naïfs par l'IL27.

Hypothèses et Objectifs

Le CNTF joue un rôle neuroprotecteur et est considéré comme traitement potentiel des maladies inflammatoires neurodégénératives. Il a été testé en essai clinique pour différentes maladies comme la SLA et la maladie de Huntington et plusieurs études laisse suggérer un rôle dans l'aggravation des symptômes de la sclérose en plaques. Cependant, les effets de l'administration du CNTF dans des modèles animaux de la sclérose en plaques n'ont pas encore été analysés. Nous avons donc émis l'hypothèse que le CNTF jouerait un rôle protecteur dans le modèle souris EAE de la sclérose en plaques. Des différences de spécificité de récepteurs ayant été répertoriées pour le CNTF, les objectifs du travail étaient donc dans un premier temps de mieux définir les caractéristiques du CNTF de souris qui servira à notre étude dans l'EAE afin de mieux évaluer les risques d'effets secondaires (Article 1¹⁵⁴ et 3). Nous avons donc caractérisé l'interaction du CNTF avec les récepteurs CNTFR, LIFR et IL6R et produit du CNTF biotinylé permettant entre autre la détection de cellules exprimant le CNTFR. Dans un deuxième temps, les effets thérapeutiques du CNTF dans un modèle murin d'EAE ont été évalués (Article 5¹⁵⁵).

CLC est l'autre ligand important du CNTFR α . Il est donc envisageable que CLC puisse jouer un rôle dans la neuroprotection et être impliqué dans le traitement des maladies neurodégénérative comme la sclérose en plaques. Bien qu'ayant des effets au niveau du système nerveux, CLC est aussi exprimée et joue un rôle dans le système immunitaire notamment au niveau des lymphocytes B. L'objectif à long terme étant de pouvoir tester les effets thérapeutiques de CLC au niveau des maladies neuro-inflammatoires, nous souhaitons mieux caractériser cette cytokine notamment au niveau du système immunitaire dans le but d'éviter tout effet indésirable à l'injection de CLC mais aussi de pouvoir cibler d'autres effets thérapeutiques de cette cytokine au niveau du système immunitaire. Les cellules du système immunitaire n'expriment ni le CNTFR α ni CLF, nous émettons donc l'hypothèse de l'existence d'autres récepteurs à CLC au niveau des cellules du système immunitaire.

Les objectifs du travail sont donc de définir les cellules cibles de CLC, d'identifier les partenaires d'interactions de CLC dans le système immunitaire et de mieux caractériser les rôles de CLC dans le système immunitaire (Articles 2¹⁵⁶ et 4). Pour cela, nous avons produit du CLC biotinylé permettant la détection et la purification de cellules exprimant le récepteur à CLC (Articles 2¹⁵⁶) puis nous avons identifié et caractérisé un nouveau complexe protéique impliquant CLC (4).

Articles

Article 1 : Expression of biologically active mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) and soluble CNTFR α in *Escherichia coli* and characterization of their functional specificities.

Publication : European Cytokine Network, September 2004, Vol.15, No 3, pages 255-62.

Isabelle Cagnet¹, Florence Guilhot¹, Sylvie Chevalier², Angélique Guay-Giroux¹, Alexandra Bert¹, Greg C.A. Elson³, Hugues Gascan² and Jean-François Gauchat¹

¹ Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montreal, Canada.

² INSERM U564, CHU Angers, 4, rue Larrey, 49033 Angers, France.

³ NovImmune SA, Geneva, Switzerland.

Keywords: Cytokines, ciliary neurotrophic factor, interleukin-6 family.

Running title: mouse recombinant CNTF and CNTFR α

Correspondence : Jean-François Gauchat, Faculté de médecine, Département de pharmacologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal QC H3C 3J7, Fax : +1 514 343 2291, E-mail : XXXXXXXXXX

ABSTRACT. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is a neuroprotective cytokine initially identified in chick embryo. It has been evaluated for the treatment of neurodegenerative diseases. CNTF also acts on non-neuronal cells such as oligodendrocytes, astrocytes, adipocytes and skeletal muscles cells. CNTF has regulatory effects on body weight and is currently in clinical trial for the treatment of diabetes and obesity. CNTF mediates its function by activating a tripartite receptor comprising the CNTF receptor α chain (CNTFR α), the leukemia inhibitory factor receptor β chain (LIFR β) and gp130. Human, rat and chicken CNTF have been expressed as recombinant proteins and most preclinical studies in murine models have been performed using rat recombinant protein. Rat and human CNTF differ in their fine specificities: in addition to CNTFR, rat CNTF has been shown to activate the LIFR (a heterodimer of LIFR β and gp130) whereas human CNTF can bind and activate a tripartite receptor comprising the IL-6 receptor α chain (IL-6R α) and LIFR. To generate tools designed for mouse models of human disease, we cloned and expressed in *E. coli* both mouse CNTF and the CNTFR α chain. Recombinant mouse CNTF was active and showed a high level of specificity for mouse CNTFR. It shares the arginine residue with rat CNTF which prevents binding to IL-6R α . It did not activate the LIFR at all concentrations tested. Recombinant mouse CNTF is therefore specific for CNTFR and as such represents a useful tool to study CNTF in mouse models. It appears well suited for the comparative evaluation of CNTF and the two additional recently discovered CNTFR ligands, cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 and neuropoietin.

INTRODUCTION

CNTF was identified in the chick embryo for its capacity to support the survival of ciliary ganglion neurons in eye tissues [1, 2]. It promotes the survival and differentiation of a broad spectrum of rodent neuronal cells such as peripheral, sensory, sympathetic and parasympathetic neurons [3-5]. CNTF also acts on rodent

non-neuronal cells such as oligodendrocytes [6-9], astrocytes [10, 11] adipocytes [12, 13] and skeletal muscles cells [14-16]. The neuroprotective properties of CNTF have lead to preclinical trials in primate models of neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Huntigton's disease and clinical trials in ALS patients [17-23]. CNTF contributes to weight regulation in mouse models of obesity [24, 25]. It is currently being evaluated for the treatment of obesity and diabetes [26].

A mutation inactivating the CNTF gene is homozygous in 2% of certain human populations [27, 28]. This mutation has been associated with early onset of multiple sclerosis (MS) [29] and ALS in patients with mutations in the gene coding for superoxide dismutase 1 [30], further supporting the neuroprotective role of CNTF in human.

CNTF is a member of the IL-6 family of haematopoietic cytokines, with a four alpha helix basic structure, comprising two long cross-over loops and one short loop [31]. CNTF lacks a signal peptide and is therefore a cytosolic protein released by injured or damaged cells [32].

Rabbit [33], rat [32], chicken [34] and human CNTF [35-37] recombinant proteins have been expressed and characterized. Rat [32], pig [38] and human [35-37] CNTF cDNAs code for proteins of 200 amino acids. Rabbit [33], mouse [39] and chicken [34] CNTF are slightly shorter, with 199, 198 and 195 amino acids respectively. The CNTF sequence has been conserved during mammalian evolution, with more than 70% amino acid identity between mouse, rat, rabbit, pig, and human primary sequences.

The CNTF receptor (CNTFR) comprises three subunits: CNTFR α , leukemia inhibitory factor β receptor (LIFR β) and gp130 [40, 41]. CNTFR α is a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored protein which can also be found in a soluble form (sCNTFR α) [42]. The binding of CNTF to membrane bound or soluble forms of CNTFR α leads to the recruitment and activation of two signal transducing receptor subunits, LIFR β and gp130, which are shared with other members of the

IL-6 family [43]. Human [40], chick [44, 45] and canine [46] CNTFR α chains have been cloned. CNTFR α is a highly conserved 372 amino acid protein with more than 90% of amino acids identity between the mouse, human, rat and dog sequences.

Despite their high level of homology, human and rodent CNTF differ according to their receptor specificities. Whereas human CNTF has an absolute requirement for a tripartite receptor to bind to the membrane, rat CNTF can activate cells expressing only LIFR β and gp130 [47]. Conversely, the membrane IL-6R α can substitute CNTFR α to form a receptor for human but not rat CNTF [48]. This particular property of human CNTF has been mapped to Gln-63 [48], which is replaced by an arginine in rat [32] and mouse CNTF [39]. These fine changes in the receptor specificity of CNTF between different species and of the human CNTF derivative Axokine [25, 49] complicate the interpretation of findings documented using human cell cultures, rodent models, or in clinical trials. For example, the protective role of CNTF in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) multiple sclerosis (MS) mouse model was deduced from observations made using CNTF^{-/-} mice [50]. If mouse CNTF does not absolutely require the CNTFR α component for function [47], this protective role could be mediated by a receptor complex which is not activated by human CNTF or its therapeutic derivative Axokine [47, 49].

We have generated tools to study the precise receptor specificity of mouse CNTF for biological activity. Murine CNTF (mCNTF) and CNTFR α chain (mCNTFR α) cDNAs were cloned and the corresponding proteins expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). Mouse CNTF or its complex with sCNTFR α were analysed for their biological activities using mouse Ba/F3 cells stably transfected with the functional tripartite human CNTF receptor or the two human LIFR chains, gp130 and LIFR β [51]. Mouse CNTF in conjunction with its soluble receptor was further tested using the LIFR β and gp130 expressing mouse myeloid M1 cell line [47, 52]. A high degree of functional specificity of mCNTF for the mouse receptor alpha chain was observed. The results obtained using recombinant mCNTF also indicate that the mouse cytokine displays an increased receptor specificity compared to its rat counterpart.

Recombinant mCNTF and mCNTFR α represent new tools to study the function of CNTF and its therapeutic applications using mouse models.

METHODS

Recombinant cytokines

hCNTF and hCNTFR α were purchased from R&D Systems (Cedarlane Laboratories, Homby, ON, Canada).

Expression of mouse CNTF and sCNTFR α

The cDNA coding for mCNTFR α was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from mouse brain cDNA (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) using the primers CTTATGACTGCTTCTGTCCCATGGG and TTCAGATCAGGAGATTGTTGGCTG. The amplified cDNA was cloned in pCR4TOPO (Invitrogen) and fully sequenced using an ABI-PRISM 3100 AVANT genetic analyser (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada). The fragment coding for soluble mCNTFR α (smCNTFR α) was amplified using the primers CTAGCTAGCTACACGCAGAAACACAGTCC and CCGCTCGAGGCTGCCAAGCTCCCCAGGGTC.

The cDNA coding for mCNTF was amplified by PCR from the IMAGE cDNA clone 1429801 (Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) using the primers CAGCCATGGCTTTCGCAGAGCAATCA and CGTCTCGAGCATTGCTTGGCCCAT. The smCNTFR α and mCNTF amplified cDNA fragments were cloned in the *E. coli* expression vector pET24d (Novagen, Madison, WI), using the restriction enzymes *NheI* and *XhoI* or *NcoI* and *XhoI*, respectively, fully sequenced and transformed in *E. coli* BL21 (DE3) Star (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Single colonies were used to inoculate Luria Bertani Broth (LB) containing 50 μ g/ml kanamycin. Overnight cultures were diluted 1/50 and grown at 37°C or 20°C until an O.D. 600 of 0.6 was reached. Expression of

the recombinant proteins was induced by addition of isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG; final concentration 1mM) for 4h at 37°C or 16 h at 20°C. Bacteria were harvested by centrifugation at 2200 g for 15 min, suspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/ml lysosyme, incubated at room temperature for 30 min, and lysed by sonication. The bacterial lysates were cleared by centrifugation (15 min., 25000g) at 4°C. The centrifugation pellets containing the inclusion bodies were suspended in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaH₂PO₄, 8 M Urea and incubated for 4 h at room temperature or overnight at 4°C. Aliquots of each fraction were analyzed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels followed by Coomassie blue staining [53].

Purification of mouse CNTF and sCNTFR α

Recombinant mCNTF was purified from the soluble fraction under native conditions by affinity chromatography on nickel nitriloacetic (NiNTA) agarose (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The bacterial lysates cleared by centrifugation were dialyzed against 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole pH 8.0. The soluble fractions were loaded on a 1 ml NiNTA column, washed with 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole pH 8.0 and eluted with 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole pH 8.0. Aliquots of each fraction (5 μ l) were analysed by SDS-PAGE. The fractions containing the purified mCNTF were pooled and dialyzed against phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4.

Soluble mCNTFR α was purified from bacterial inclusion bodies by affinity chromatography on NiNTA agarose under denaturing conditions. The urea solubilized inclusion bodies were loaded on a 1 ml NiNTA column. The resin was washed with 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M Urea pH 6.3. Soluble mCNTFR α was eluted in 100 mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8 M Urea pH 5.0 and analysed by SDS-PAGE. The mCNTFR α containing fractions were pooled and the protein was refolded by serial dialysis against PBS pH 8.0 containing decreasing

concentrations of Urea (7.5 M to PBS alone; 0.5 M steps). The precipitate formed during the dialysis was eliminated by centrifugation for 15 min. at 2200g.

Purified recombinant proteins were quantified using a BCA kit (Pierce, Biolynx, ON, Canada) and stored in aliquots at -80°C for further analysis.

Biological assay for mCNTF and mCNTFR α functional activity

Ba/F3 cells transfected with hgp130 and hLIFR β or hgp130, hLIFR β and hCNTFR α (A kind gift from Dr. K.J. Kallen, University of Mainz, Germany) were cultured as described [51]. To test for mCNTF and mCNTFR α biological activities, Ba/F3 transfectants (10^4 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% foetal calf serum (FCS). [3 H] thymidine (20-30 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) was added for 4h and the incorporated radioactivity measured by scintillation counting.

M1 cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. For the differentiation assays, M1 cells were incubated for 48 hours with the recombinant cytokines, stained for 30 min with FITC-labelled F4/80 monoclonal antibody (10 μ g/ml; Caltag, Cedarlane Laboratories) and the fluorescence was analysed using a FACScan flow cytometer (BD biosciences, Mississauga, ON, Canada).

RESULTS

Expression and purification of recombinant mCNTF and mCNTFR α

Mouse CNTF cDNA was amplified from mouse brain first-strand cDNA and cloned in the expression vector pET24d under the control of the T7 polymerase promoter [54]. Recombinant mCNTF was expressed as a carboxy-terminal six histidine tagged protein in the *E. coli* derivative BL21 (DE3) Star at 20 or 37°C (*Figure 1A*). A high level of recombinant protein was detected in the soluble fractions and the inclusion

bodies by growing the bacteria at either 20 or 37°C, as assessed by SDS-PAGE analysis and Coomassie blue staining (*Figure 1A*). The recombinant protein was purified from the soluble fraction by immobilized metal-ion affinity chromatography [55] (*Figure 1B*). The cytokine-containing fractions (E2 in the experiment shown in *Figure 1*) were pooled and dialysed against PBS before being re-analyzed by SDS PAGE and Coomassie blue staining (*Figure 1B*, lane rmCNTF).

The fragment of mCNTFR α cDNA coding for the mature protein up to serine 342 (smCNTFR α) [40] was cloned in pET24d in fusion with a carboxy-terminal six-histidine tag. Upon induction of the T7 polymerase promotor, production of the recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3) was readily detectable (*Figure 2A*, lanes IB). Most of the smCNTFR α was recovered in the insoluble fractions of the bacterial lysates containing the inclusion bodies, even when expression was performed at 20°C, a condition known to increase recombinant protein solubility in *E. coli* [56] (*Figure 2A*, lanes IB). To isolate the recombinant protein, the inclusion bodies were solubilized in 8M urea and smCNTFR α was purified under denaturing conditions (*Figure 2B*). The fractions containing the recombinant proteins (corresponding to lane E2-E4 in the experiment shown in *Figure 2B*) were pooled and recombinant protein was refolded by slow dialysis against decreasing concentration of urea to let the protein form the inter-strand disulfide bonds between the conserved cysteine residues of the receptor cytokine binding domain [40, 57]. Purified preparations of smCNTFR α were reanalysed by SDS-PAGE (*Figure 2B*, lane rmCNTFR α) and stored at -80°C.

Recombinant mCNTF induces the proliferation Ba/F3 cells expressing human tripartite CNTF receptor

To assess the biological activity of the *E. coli* expressed mCNTF, we used derivatives of the IL-3 dependant cell line Ba/F3 rendered responsive to CNTF by transfection with the cDNA coding for the three subunits of the human CNTFR (hgp130, hLIFR β and hCNTFR α) [51]. As expected from the high level of

homology between mouse and human CNTF (82% amino-acids identity), a strong proliferative response could be detected using the Ba/F3 expressing the human tripartite CNTF receptor (Figure 3, panel A). The proliferation observed was however reproducibly lower than the one induced by recombinant human CNTF (hCNTF; Figure 3, panel A).

Recombinant mCNTFR α can form a biologically active complex with CNTF inducing the proliferation of Ba/F3 cells expressing human LIFR β and gp130

The soluble form of the CNTFR α has been shown to form a complex with CNTF which can activate the LIFR [42]. Therefore to test the biological activity of the recombinant smCNTFR α , we assessed the proliferative response of Ba/F3 transfectants expressing LIFR β and gp130 to the combination of smCNTFR α and hCNTF. A strong proliferation of the transfectants to the cytokine-soluble alpha chain complex was observed (Figure 3, panel B). The proliferation was only slightly lower than the one induced by the autologous shCNTFR α -hCNTF (Figure 3, panel B) complex.

Recombinant mCNTF shows a functional preference for the mouse alpha chain

To see if the lower potency of the recombinant mouse CNTF was due to a species specificity, we tested mCNTF in combination with the smCNTFR α expressed in *E. coli* BL21 (DE3) or shCNTFR α (Figure 3, panel C). Proliferation of the Ba/F3 cells expressing the functional LIFR (hLIFR β and hgp130) was markedly higher in response to the mCNTF-smCNTFR α than in response to interspecies mCNTF-shCNTFR α hetero complex. The difference observed indicates a striking degree of specificity of mouse CNTF for the mouse receptor alpha chain (Figure 3 panel C). Interestingly, no proliferation of the Ba/F3 cells expressing the LIFR could be detected in response to the recombinant mCNTF, even at the concentration of 250 pg/ml. This suggests a functional difference between mouse and rat CNTF. The latter

has been shown to induce detectable proliferation of Ba/F3 transfectants expressing the human LIFR at concentrations above 10 pg/ml [47].

The recombinant mCNTF-mCNTFR α complex induces the differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells

To test the ability of mouse CNTF and CNTFR α to trigger the murine LIFR, we used the murine myeloid leukemic cell line M1. This cell line expresses mouse LIFR β and gp130 and responds to LIF by growth arrest and an expression of macrophage differentiation markers [52, 58]. The mCNTF-mCNTFR α and hCNTF-hCNTFR α complexes were compared for their capacity to induce the expression of the macrophage differentiation marker F4/80 [59, 60] in these cells. Maximal differentiation was observed at a concentration of 250 pg/ml of recombinant cytokine and 2.5 μ g/ml of soluble receptor (Figure 4 and data not shown). At all tested concentrations the effect of mCNTF-mCNTFR α complex was indistinguishable from that observed for hCNTF-hCNTFR α (Figure 4 and data not shown). Like its human homologue, mouse CNTF failed to induce detectable M1 differentiation in the absence of soluble CNTFR α chain (Figure 4, left panel), confirming the absolute requirement of the tripartite receptor to allow a functional response to mouse CNTF.

DISCUSSION

Using the *E. coli* BL21 (DE3) / pET system of T7 polymerase driven recombinant protein expression controlled by the *lac* repressor [54], we could express both recombinant mouse CNTF and soluble CNTFR α . As reported previously for human CNTF [35], a large fraction of mCNTF was soluble in the bacterial extracts and the recombinant protein could therefore be purified by IMAC under non-denaturing conditions.

Recombinant smCNTFR α was mostly detected in the insoluble fractions of the bacterial extracts containing the inclusion bodies. SmCNTFR α was therefore

solubilized using urea as a chaotropic agent, purified under denaturing conditions and refolded by step dialysis.

Mouse CNTF preparations were biologically active when tested for their capacity to induce the proliferation of the IL-3 dependant cell line Ba/F3 transfected with the cDNAs coding for the human tripartite CNTFR receptor. Similarly, smCNTFR α could be shown to form a biologically active complex with commercial human CNTF when tested on Ba/F3 expressing the LIFR.

Purified mCNTF and smCNTFR α could form an active complex: this complex induced the proliferation of Ba/F3 cells expressing the human signal transducing subunits of the CNTFR (LIFR β and gp130) or the differentiation of M1 cells expressing their mouse homologues.

When tested on Ba/F3 expressing the tripartite hCNTF receptor complex, mCNTF was significantly less potent than hCNTF. A comparison between the biological activities of mCNTF/ msCNTFR α and mCNTF/ hsCNTFR α complexes indicate that the reduced biological activity of mCNTF on Ba/F3 cells expressing the tripartite hCNTFR could be explained by the specificity of mouse CNTF for its autologous receptor alpha chain, as observed previously with other cytokines.

Interestingly, mCNTF alone did not induce detectable biological activities on cells only expressing human or mouse LIF receptor complex. Mouse recombinant CNTF seems therefore to differ slightly from rat CNTF: rat CNTF has been shown to activate the LIFR in the absence of the CNTFR α chain at concentration above 10 pg/ml [47]. Like rat CNTF, the mCNTF primary sequence comprises an Arg at the position corresponding to human Gln-63. This Arg has been shown to prevent binding of rat CNTF to IL-6R α chain [48]. Accordingly, we did not detect any biological activity of mCNTF preparations on the IL-6 responsive M1 cells [60, 61] in the absence of the CNTFR α chain, even if the highest concentrations tested (250 pg/ml) were in the range in which human CNTF has been reported to activate a composite receptor comprising IL-6R α , gp130 and LIFR β [48].

As mCNTF did not show any biological activity on LIF receptor complex expressing cells in the range of concentrations tested (up to 250 pg/ml), our results suggest that the protective functions of CNTF in mouse models such as EAE indicated by experiments with CNTF^{-/-} mice [50] are mediated by the activation of a tripartite CNTFR comprising a soluble or membrane bound form of CNTFR α rather than due to a LIF or IL-6 like activity of mCNTF. The protective functions of mCNTF are therefore likely to be shared with human CNTF.

We have recently shown that CLC/CLF and neuropoietin are two new ligands for the CNTFR [62, 63]. The *E. coli* produced recombinant mCNTF and smCNTFR α represent additional tools for the comparison of the therapeutic potential of CNTF with these more recently discovered CNTFR ligands using mouse models of neurodegenerative disease or obesity. Recombinant mCNTF and mCNTFR α will also facilitate the generation of specific monoclonal antibodies.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.

Expression and purification of mCNTF. Panel A: Proteins were isolated from *E.coli* BL21 (DE3) Stars transformed with pET mCNTF before (lanes C), or after 4 and 16 hours of recombinant protein expression induction (lanes +IPTG) at 37°C and 20°C respectively. Lanes S: soluble fractions. Lanes IB: inclusion bodies. Aliquots representing equivalent amounts of bacteria were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Panel B. mCNTF was purified by IMAC from the cleared lysate of the bacteria induced at 37°C and the chromatography fraction was analysed by SDS-PAGE. Lane S: cleared lysate. Lane FT : flow through. Lanes E: elution fractions. Lane rmCNTF: purified mCNTF preparation after dialysis. Aliquots (5µl) of the indicated fractions (S: 5ml, FT: 30ml, E: 500µl, D: 1ml) were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Panels A and B: Lane M : molecular mass marker with the size of the proteins indicated. The arrows show the migration of mCNTF.

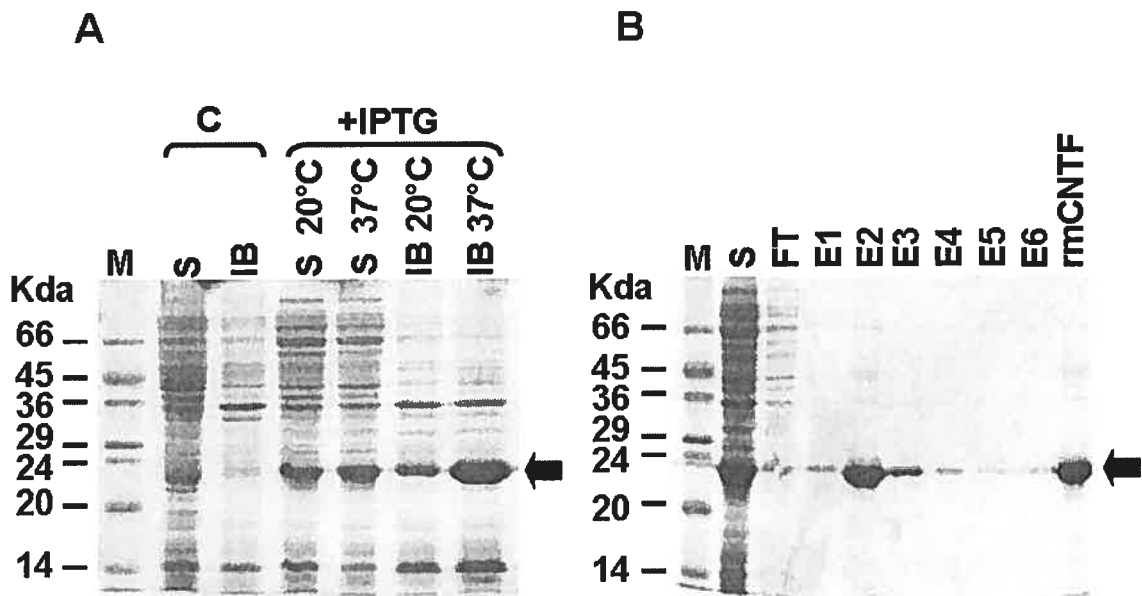


Figure 2.

Expression and purification of smCNTFR α . Panel A: Proteins were isolated from *E. coli* BL21 (DE3) Stars transformed with pET mCNTFR α before (lanes C), or after 4 and 16 hours of recombinant protein expression induction (lanes +IPTG) at 37°C and 20°C respectively. Lanes S: soluble fractions. Lanes IB: inclusion bodies. Aliquots representing equivalent amounts of bacteria were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Panel B. mCNTFR α was purified by IMAC from the insoluble fraction of the bacteria induced at 37°C and the chromatography fractions were analysed by SDS-PAGE. Lane IB: solubilized inclusion bodies. Lane FT : flow through. Lanes E: elution fractions. Lane rmCNTFR α : purified smCNTFR α preparation after refolding by step dialysis. Aliquots (5 μ l) of the indicated fractions (S: 5ml, FT: 30ml, E: 500 μ l, D: 1.5 ml) were analysed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Panels A and B: Lane M : molecular mass marker with the size of the proteins indicated. The arrows show the migration of smCNTFR α .

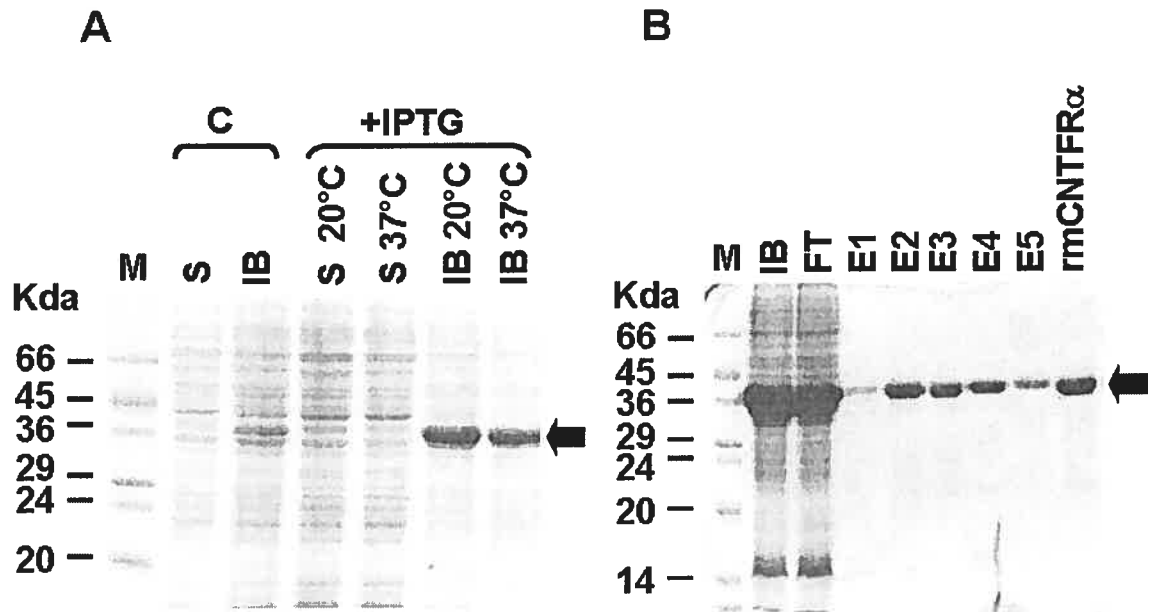


Figure 3.

Panel A: mCNTF induces the proliferation of Ba/F3 cells transfected with hgp130, hLIFR and hCNTFR α . **Panel B:** smCNTFR α and hCNTF induce the proliferation of Ba/F3 cells transfected with hgp130, hLIFR. **Panel C:** Comparison between the biological activities of mCNTF-smCNTFR α and mCNTF-shCNTFR α Ba/F3 cells stably transfected with the indicated receptor cDNAs were cultured in the presence of serial dilutions of the indicated cytokines. When added, sCNTFR α was used at the optimal concentration of 2.5 μ g/ml. Proliferation was measured by [3 H] thymidine incorporation and experiments were performed in triplicate. Errors bars: standard errors of mean.

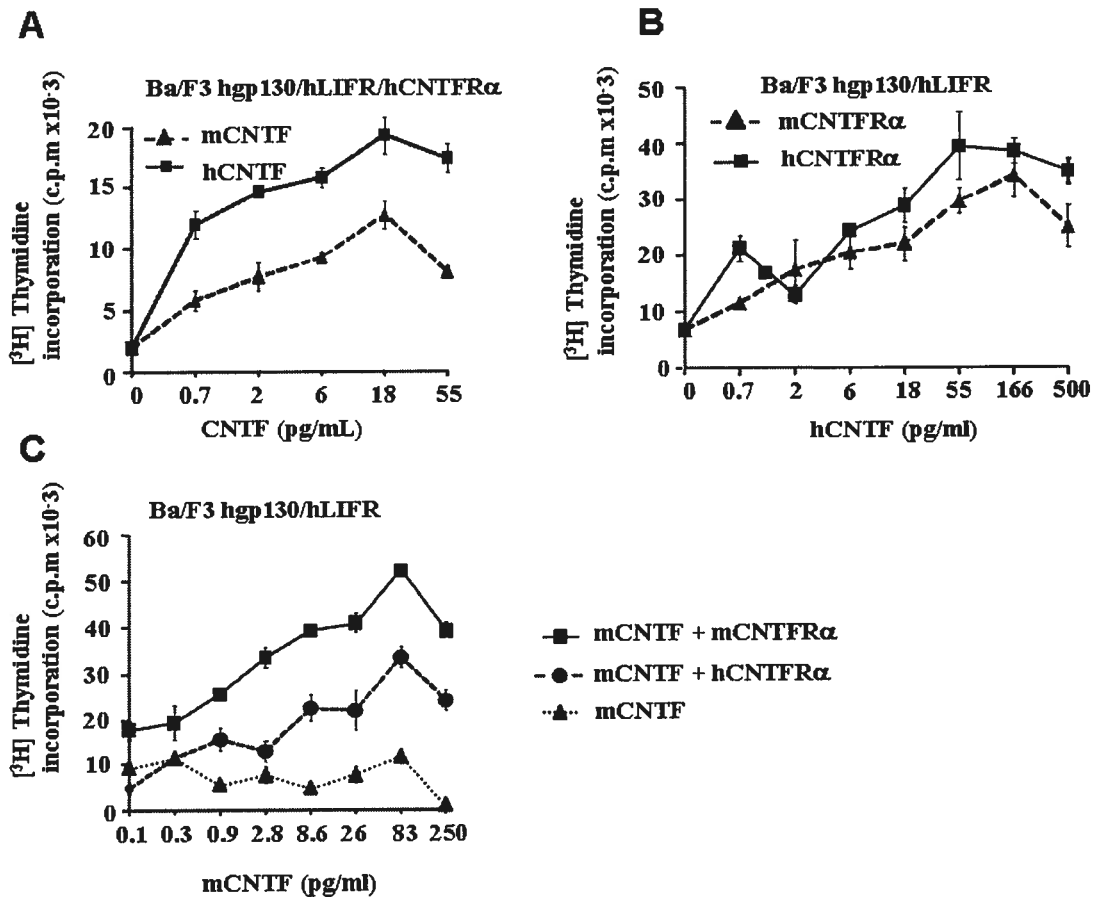
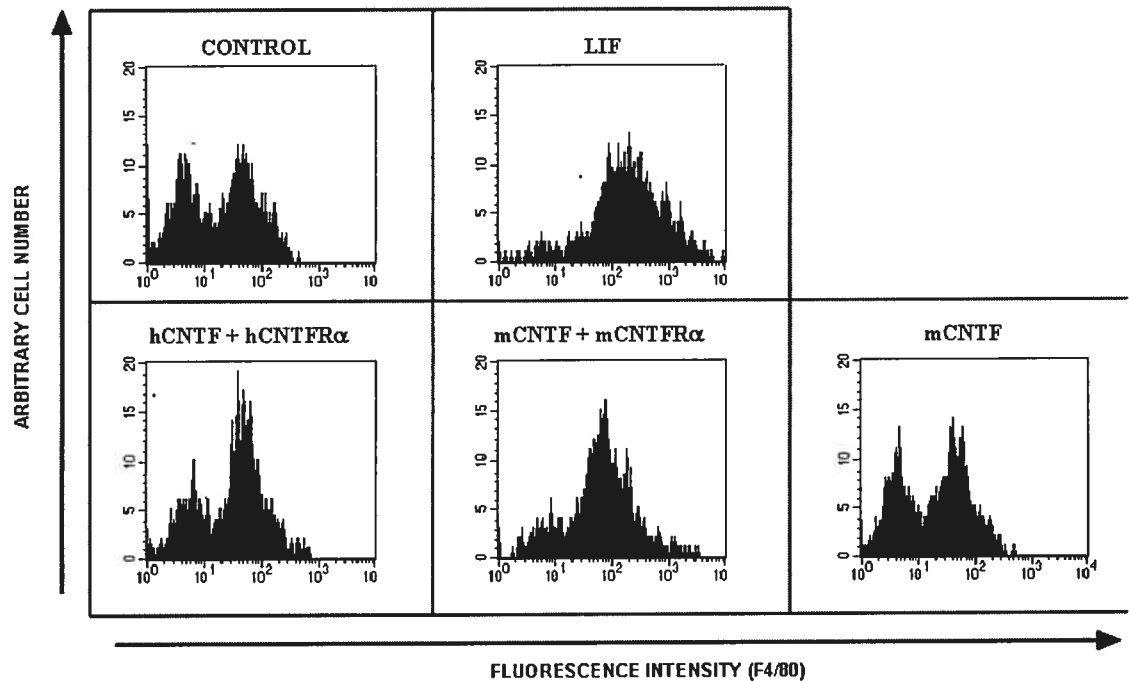


Figure 4.

The mCNTF-smCNTFR α complex induces the expression of the differentiation marker F4/80 on LIFR expressing M1 cells. Cells were incubated with the indicated cytokines (25 ng/ml) and soluble receptors (2.5 μ g/ml) for 48 h and expression of the F4/80 marker was measured by flow cytometry.



ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr K.J Kallen (University of Mainz, Germany) for kindly providing the stably transfected Ba/F3 cells. Financial support: this work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and the Multiple Sclerosis Scientific Research Foundation. J.F.G. is a Canada Research Chair recipient.

REFERENCES

1. Adler R, Landa, KB, Manthorpe M, Varon S. 1979. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204: 1434.
2. Barbin G, Manthorpe M, Varon, S. 1981. Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem.* 43: 1468.
3. Walicke P, Varon S, Manthrope M. 1986. Purification of a human red blood cell protein supporting the survival of cultured CNS neurons, and its identification as catalase. *J Neurosci.* 6: 1114.
4. Blottner D, Bruggemann W, Unsicker K. 1989. Ciliary neurotrophic factor supports target-deprived preganglionic sympathetic spinal cord neurons. *Neurosci Lett.* 105: 316.
5. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. 1990. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345: 440.
6. Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon, S. 1993. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science.* 259: 689.
7. Barres BA, Schmid R, Sendnter M, Raff MC. 1993. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118: 283.
8. D'Souza SD, Alinauskas KA, Antel JP. 1996. Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J Neurosci Res.* 43: 289.
9. Stankoff B, Aigrot MS, Noel F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C. 2002. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci.* 22: 9221.
10. Levison, SW, Ducceschi MH, Young GM, Wood TL. 1996. Acute exposure to CNTF in vivo induces multiple components of reactive gliosis. *Exp Neurol.* 141: 256.

11. Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann HD. 2002. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 37: 374.
12. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Klein HH, Klein J. 2002. Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. *J Endocrinol.* 173: R1.
13. Zvonic S, Cornelius P, Stewart WC, Mynatt RL, Stephens JM. 2003. The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem.* 278: 2228.
14. Forger NG, Roberts SL, Wong V, Breedlove, SM. 1993. Ciliary neurotrophic factor maintains motoneurons and their target muscles in developing rats. *J Neurosci.* 13: 4720.
15. Helgren ME, Squinto SP, Davis HL, Parry DJ, Boulton TG, Heck CS, Zhu Y, Yancopoulos GD, Lindsay RM, DiStefano PS. 1994. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76: 493.
16. Guillet C, Auguste P, Mayo W, Kreher P, Gascan, H. 1999. Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J Neurosci.* 19: 1257.
17. Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P, Baetge EE, Kordower JH. 1997. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386: 395.
18. Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ. 1996. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7346.
19. Miller RG, Bryan WW, Dietz MA, Munsat TL, Petajan JH, Smith SA, Goodpasture JC. 1996. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47: 1329.
20. Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, Hoagland RJ, Parry GJ, Ross MA, Stromatt SC. 1996. A placebo-controlled trial of

recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* 39: 256.

21. Mittoux V, Joseph JM, Conde F, Palfi S, Dautry C, Poyot T, Bloch J, Deglon N, Ouary S, Nimchinsky EA, Brouillet E, Hof PR, Peschanski M, Aebischer P, Hantraye P. 2000. Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther.* 11: 1177.

22. Penn RD, Kroin JS, York MM, Cedarbaum JM. 1997. Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery* 40: 94.

23. Aebische, P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. 1996. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med.* 2: 696.

24. Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R, Paonessa G, Chen F, Rosenblum CI, Van der Ploeg LH, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R. 1997. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6456.

25. Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hjarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. 2001. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4652.

26. Ettinger MP, Littlejohn TW, Schwartz SL, Weiss SR, McIlwain HH, Heymsfield SB, Bray GA, Roberts WG, Heyman ER, Stambler N, Heshka S, Vicary C, and Guler HP. 2003. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *Jama* 289: 1826.

27. 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.

28. Giess R, Goetz R, Schrank B, Ochs G, Sendtner M, Toyka K. 1998. Potential implications of a ciliary neurotrophic factor gene mutation in a German population of patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve* 21: 236.
29. Giess R, Maurer M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, Sendtner M, Rieckmann P. 2002. Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 59: 407.
30. Giess R, Holtmann B, Braga M, Grimm T, Muller-Myhsok B, Toyka KV, Sendtner M. 2002. Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am J Hum Genet.* 70: 1277.
31. McDonald NQ, Panayotatos N, Hendrickson WA. 1995. Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *Embo J.* 14: 2689.
32. Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R, Lindholm D, Thoenen H. 1989. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342: 920.
33. Lin LF, Mismar D, Lile JD, Armes LG, Butler ET 3rd, Vannice JL, Collins F. 1989. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246: 1023.
34. Leung DW, Parent AS, Cachianes G, Esch F, Coulombe JN, Nikolics K, Eckenstein FP, Nishi R. 1992. Cloning, expression during development, and evidence for release of a trophic factor for ciliary ganglion neurons. *Neuron* 8: 1045.
35. McDonald JR, Ko C, Mismar D, Smith DJ, Collins F. 1991. Expression and characterization of recombinant human ciliary neurotrophic factor from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1090: 70.
36. Negro A, Tolosano E, Skaper SD, Martini I, Callegaro L, Silengo L, Fiorini F, Altruda F. 1991. Cloning and expression of human ciliary neurotrophic factor. *Eur J Biochem.* 201: 289.

37. Masiakowski P, Liu HX, Radziejewski C, Lottspeich F, Oberthuer W, Wong V, Lindsay RM, Furth ME, Panayotatos N. 1991. Recombinant human and rat ciliary neurotrophic factors. *J Neurochem.* 57: 1003.
38. Weaks RL, Ramsoondar JJ, Gallagher DS Jr, Nogues C, Piedrahita JA. 1997. Isolation, characterization and chromosomal localization of the porcine ciliary neurotrophic factor (CNTF) gene. *Anim Genet.* 28: 354.
39. Saotome Y, Winter CG, Hirsh DA. 1995. A widely expressed novel C2H2 zinc-finger protein with multiple consensus phosphorylation sites is conserved in mouse and man. *Gene* 152: 233.
40. Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD. 1991. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253: 59.
41. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD. 1993. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260: 1805.
42. Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, 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.
43. Taga T, Kishimoto T. 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15: 797.
44. Heller S, Finn TP, Huber J, Nishi R, Geissen M, Puschel AW, Rohrer H. 1995. Analysis of function and expression of the chick GPA receptor (GPAR alpha) suggests multiple roles in neuronal development. *Development* 121: 2681.
45. Ip FC, Fu AK, Tsim KW, Ip NY. 1995. Cloning of the alpha component of the chick ciliary neurotrophic factor receptor: developmental expression and down-regulation in denervated skeletal muscle. *J Neurochem.* 65: 2393.
46. Beltran WA, Zhang Q, Kijas JW, Gu D, Rohrer H, Jordan JA, Aguirre GD. 2003. Cloning, mapping, and retinal expression of the canine ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3642.

47. Gearing DP, Ziegler SF, Comeau MR, Friend D, Thoma B, Cosman D, Park L, Mosley B. 1994. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1119.
48. Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grotzinger J, Rose-John S, Kallen KJ. 2003. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem.* 278: 9528.
49. Panayotatos N, Radziejewska E, Acheson A, Pearsall D, Thadani A, Wong, V. 1993. Exchange of a single amino acid interconverts the specific activity and gel mobility of human and rat ciliary neurotrophic factors. *J Biol Chem.* 268: 19000.
50. Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R. 2002. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med.* 8: 620.
51. Kallen KJ, Grotzinger J, Lelievre E, Vollmer P, Aasland D, Renne C, Mullberg J, Myer zum Buschenfelde KH, Gasca, H, 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.
52. Gascan H, Anegon I, Praloran V, Naulet J, Godard A, Soullillou JP, Jacques, Y. 1990. Constitutive production of human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor by human tumor cell lines derived from various tissues. *J Immunol.* 144: 2592.
53. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
54. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn J.J, Dubendorff JW. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60.

55. Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stuber D, Henco K. 1994. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol.* 31: 371.
56. Schein CH. 1991. Optimizing protein folding to the native state in bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 2: 746.
57. Man D, He W, Sze KH, Gong K, Smith DK, Zhu G, Ip NY. 2003. Solution structure of the C-terminal domain of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor and ligand free associations among components of the CNTF receptor complex. *J Biol Chem.* 278: 23285.
58. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. 2003. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J.* 6: 3995.
59. Austyn JM, Gordon S. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol.* 11: 805.
60. Tsuberi B, Naparstek E. 1995. Modification of M1 cells by exogenous introduction of IL6 gene: a model for gene therapy of acute and chronic myeloid leukemia in mice. *Leukemia* 9 Suppl 1: S93.
61. Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. 1991. Interleukin-6- and leukemia inhibitory factor-induced terminal differentiation of myeloid leukemia cells is blocked at an intermediate stage by constitutive c-myc. *Mol Cell Biol.* 11: 2375.
62. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H. 2000. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci.* 3: 867.
63. Derouet, D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F, Perret D, Diveu C, Guillet C, Preisser L, Dumont A, Barbado M, Morel A, deLapeyrière O, Gascan H, Chevalier, S. Neuropoietin, an IL-6 related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* In press.

“Reprinted from Isabelle Cognet, Florence Guilhot, Sylvie Chevalier, Angélique Guay-Giroux, Alexandra Bert, Greg C.A. Elson, Hugues Gascan and Jean-François Gauchat, *Expression of biologically active mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) and soluble CNTFR α in Escherichia coli and characterization of their functional specificities*, European Cytokine Network, Copyright (2004), Vol.15, Pages No. 255-62 with kind permission from Edition John Libbey Eurotext, Paris.”

Article 2 : Cardiotrophin-like cytokine labelling using Bir A biotin ligase: A sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells.

Publication : Journal of Immunological Methods. 2005, Vol.301, No 1-2, pages 53-65.

Isabelle Cognet^a, Florence Guilhot^a, Mélanie Gabriac^a, Sylvie Chevalier^b, Younes Chouikh^c, Alexandra Herman-Bert^a, Angélique Guay-Giroux^a, Sophie Corneau^a, Giovanni Magistrelli^d, Greg C. Elson^d, Hugues Gascan^b and Jean-François Gauchat^{a,*}

^a Département de pharmacologie, Université de Montréal, C.P 6128, succursale Centre-ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

^b INSERM U564, CHU Angers, 4 rue Larrey, Angers, France

^c Centre de Recherche du CHUM, Hôpital St-Luc, Montreal, Canada

^d NovImmune SA, Geneva, Switzerland

Abbreviations: APC, allophycocyanin; CLC, Cardiotrophin-like cytokine; CLF, cytokine-like factor-1; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CNTFR, CNTF receptor; CNTFR α , CNTF receptor alpha chain; FITC, fluorescein isothiocyanate; h, human; IRES, internal ribosome entry site; LIFR β , leukemia inhibitory factor receptor β ; m, mouse;

*Corresponding author. Fax : +1 514 343 2291. E-mail adress:

████████████████████(J.-F. Gauchat).

Keywords : Cytokine; Bira A biotin ligase; receptor expression.

Abstract

The recently identified IL-6 family member cardiotrophin-like cytokine (also named novel neurotrophin-1 or B cell stimulating factor-3) forms a secreted complex with cytokine-like factor-1 which binds and activates the tripartite ciliary neurotrophic factor receptor. The striking differences between the phenotype of mice in which either the ciliary neurotrophic factor or its receptor are inactivated suggest that the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 complex could be the developmentally important ciliary neurotrophic factor receptor ligand.

Cardiotrophin-like cytokine is also produced in the immune system and has been reported to activate B cells *in vivo* and *in vitro*. B cells do not express the ciliary neurotrophic factor receptor suggesting the existence of an alternative receptor.

We produced the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 complex tagged with a Bir A biotin ligase AviTag peptide substrate. This cytokine could be efficiently biotinylated *in vitro* with BirA. It was subsequently validated as a sensitive tool for ciliary neurotrophic factor receptor detection by flow cytometry and for magnetic-activated cell sorting. It was also shown to allow the detection of a specific receptor by activated B cells. Whereas binding to cells expressing the ciliary neurotrophic factor receptor could be prevented by competition with ciliary neurotrophic factor, binding to B cells was not. The biotinylated cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 complex therefore represents a new reagent to study ciliary neurotrophic factor and cardiotrophin-like cytokine receptor expression and for the identification of the putative cardiotrophin-like cytokine B cell receptor. It further validates the use of biotin ligase catalysed biotinylation for the detection of cytokine receptors.

1. Introduction

Cardiotrophin-like cytokine (CLC), also named novel neurotrophin-1 or B cell stimulating factor-3 is an IL-6 family cytokine with neurotrophic and interleukin-like activities (Senaldi et al., 1999; Shi et al., 1999; Elson et al., 2000;

Plun-Favreau et al., 2001; Senaldi et al., 2002; Uemura et al., 2002; Burger et al., 2003). It displays high homology levels with cardiotrophin-1, ciliary neurotrophic factor (CNTF) and neuropoietin (Senaldi et al., 1999; Shi et al., 1999; Derouet et al., 2004). Whereas CLC has a canonical signal peptide, it is not secreted when expressed in fibroblastic cell lines (Elson et al., 2000; Plun-Favreau et al., 2001). Secretion of CLC requires co-expression with the soluble cytokine receptor, cytokine-like factor-1 (CLF) (Elson et al., 1998) also known as NR6 (Alexander et al., 1999) or with the soluble CNTF receptor alpha chain (CNTFR α) (Elson et al., 2000; Plun-Favreau et al., 2001).

The CLC/CLF complex binds and activates the tripartite CNTF receptor complex (CNTFR) (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001). Many lines of evidence suggest that the CLC/CLF complex could play a pivotal role in nervous system development: newborn mice deficient in CNTFR α fail to begin feeding, die shortly after birth and show a major loss of motor neuron populations (DeChiara et al., 1995). In striking contrast, CNTF-deficient mice have a mild phenotype (DeChiara et al., 1995). A mutation inactivating the CNTF gene is homozygous in ~ 2% of the studied human populations without signs of neurological defect (Takahashi et al., 1994), with the exception of an association with early onset of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis (Giess et al., 2002a, b). CNTF has no signal peptide and is released by damaged cells (Stockli et al., 1989). This suggests that CNTF has a protective role in injury during an inflammatory attack of the nervous system (Sleeman et al., 2000).

Whereas phenotypes of CNTF^{-/-} and CNTFR α ^{-/-} mice are contrasting, those CNTFR α ^{-/-} and CLF^{-/-} are similar: in both cases, mice fail to suckle, die rapidly after birth and lack specific pools of motoneurons (Alexander et al., 1999; Forger et al., 2003). This indicates that CLC/CLF could be a developmentally important CNTFR ligand. Subtle differences remain between CNTFR α and CLF deficient mice (DeChiara et al., 1995; Forger et al., 2003). This could be due to the roles of the CLC/CNTFR α complex (Plun-Favreau et al., 2001) or the existence of a third

CNTFR ligand, neuropoietin, expressed in the first stages of mouse embryogenesis (Derouet et al., 2004). In man, the gene for this third CNTFR ligand is inactivated by a deletion (Derouet et al., 2004) and the importance of CLC/CLF is supported by the phenotypes of patients suffering from CLF gene deletions (Knappskog et al., 2003).

In adult mice, CLC mRNA is strongly expressed in immune cells (Senaldi et al., 1999; Shi et al., 1999). Injection of recombinant CLC produced in *E. coli* causes an acute type of response, body weight loss and B cell hyperplasia in mice (Senaldi et al., 1999). Observations with transgenic mice expressing CLC further indicate a potent effect of this cytokine on B cells, with increases in all major B cell subsets coupled with elevated antibody production, including auto-antibodies (Senaldi et al., 2002). These data show that CLC can also act on cells which do not express CNTFR (Sleeman et al., 2000) and point to the existence of a second receptor, CLCR.

To study the expression of CNTFR and CLCR, we generated a derivative of mouse CLC (mCLC) tagged with an epitope, (AviTag™) which can be biotinylated in vitro at a specific lysine using *E. coli* Bir A biotin ligase (Beckett et al., 1999; Cull and Schatz, 2000). To be secreted (Elson et al., 2000), the mCLC derivative was expressed in mammalian cells as a complex with mouse CLF (mCLF) and biotinylated in vitro. The biotinylated mCLC/CLF composite cytokine was shown to be biologically active and validated as a sensitive tool for the detection of the CNTFR. Using the mCLC derivative, expression of the specific CLCR could be detected on activated B cells.

2. Materials and methods

2.1. Generation of a bicistronic expression vector coding for mCLC-protC-AviTag and mCLF

The cDNA for mouse CLC was cloned by polymerase chain reaction (PCR) from mouse lymph node cDNA (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The amplified

cDNA was cloned in pCR4TOPO (Invitrogen) and fully sequenced using an ABI-PRISM 3100 AVANT genetic analyser (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada). The mouse CLF cDNA in the vector pT7T3D-Pac (Clone UI-M-BH1-AKP-C-12-O-UI) was obtained from ResGen (Invitrogen). The mouse CLF cDNA of this clone lacks the region in 5' of the internal *NotI* restriction site. Therefore the cDNA was rendered full length by cloning the phosphorylated annealed oligonucleotides

AGCTTGGTACCGTCGACGCCACCATGGCCGCGGGTCGCCCCGGGCCCCGTC
GCCCAATCCGCGCGGC and
GGCCGCGCGCGGATTGGGCGACGGGGCCCCGGGCGACCCGCGGCCATGG
TGGCGTCGACG

GTACCA between the *Not I* and *Hind III* restriction sites of pT7T3D-Pac mCLF. The internal ribosome entry site (IRES) sequence of pEBS-IRES GFP (Rees et al., 1996; Bontron et al., 1997) was amplified by PCR using the primers CTTCTAGGCCTGTACGGAAG and GCCGGTGGTGCAGATGAACT, digested with the restriction enzymes *Sal I* and *NcoI* and cloned between the corresponding restriction sites of the modified pT7T3D-Pac mCLF to generate pT3-T7IRESmCLF. The IRES and the modified CLF cDNA were verified by DNA sequencing. To introduce a consensus Kozak sequence (Kozak and Shatkin, 1979) and the sequence coding for a protein C affinity tag (Rezaie et al., 1992), mCLC cDNA was amplified with a mix of the oligonucleotides CTAGCTAGCCACCATGGACCTCCGAGCAGGGG (20 nM), TCGGTACCTCACTTACCATCGATTAACCGTGGATCTACCTGATCTTCGCG GCCGCGTCGACAGTCAGCGAAACCATGTGCCTCCAAGTG (20 nM), CTAGCTAGCCACCATGGACC (400 nM) and TCGGTACCTCACTTACCATC (400 nM), cloned in pCR4TOPO and fully sequenced. The modified CLC cDNA was digested with the restriction enzymes *Nhe I* and *Kpn I* and recloned in the corresponding sites of the plasmid pCDNA5/FRT (Invitrogen) to generate the vector pCDNA5 mCLCprotC. To obtain a bicistronic pCDNA5 derivative with mCLC and mCLF cDNAs, pT3-T7IRESmCLF was digested with the restriction enzymes *Hinc II*

and *Xho* I and the IRES-mCLF coding fragment cloned between the *Eco*R V and *Xho*I sites of pcDNA5 mCLCprotCmCLF. To introduce the sequence coding for the AviTag, the plasmid pcDNA5 mCLCprotCmCLF was amplified in the *Dam*⁻ *Dcm*⁻ *E. coli* strain GM2183 (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada) and digested with the restriction enzymes *Cla* I and *Fsp* I or *Spe* I and *Fsp* I. Gel purified 2327 bp *Cla* I-*Fsp* I and 5471 bp *Spe* I-*Fsp* I fragments of pcDNA5 mCLCprotCmCLF were ligated with the phosphorylated and annealed oligonucleotides CGATGGTAAGGGTGGCGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATC GAATGGCACTGATGTACAA and CTAGTTGTACATCAGTGCCATTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTTCGTTCCAGACCGCCACCCTTACCAT. This final pcDNA5 mCLCprotCAviTagmCLF construct was checked by DNA sequencing.

2.2. Production and purification of the mCLCprotCAviTag/mCLF complex

The plasmid pcDNA5 mCLCprotCAviTagmCLF and the Flp recombinase coding plasmid pOG44 (Invitrogen) were cotransfected in the Flp-InTM-293 cell line (Invitrogen) using the lipofection agent Escort V (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) according to manufacturer's instructions. Transfected clones were selected using hygromycin (100 µg/ml). The individual clones were tested for mCLC/CLF secretion by immunoprecipitation using anti-protein C resin (Roche Applied Sciences, Laval, QC, Canada) as described previously (Elson et al., 2000). For the production of the mCLCprotCAviTagmCLF complex, cells were expanded in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and hygromycin (100 µg/ml) to confluence. Confluent cells were maintained for one week in DMEM supplemented with 1% FCS. Cell culture supernatants were pooled. Batches of 3 litres of supernatants were concentrated by centrifugation (Centricon-Plus-80, Millipore, Bedford, MA, USA) and the mCLC/CLF complex was purified by affinity

chromatography on a 1ml anti-protein C column (Roche) using an ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada).

2.3. Biotinylation of the recombinant mCLC/CLF using BirA biotin ligase

The irreversible binding sites of the avidin resin (SoftLink; Promega, Madison, USA) were saturated using biotin according to the manufacturer's instructions. The purified mCLC/CLF was dialyzed against 10mM Tris-HCl, pH 7,9 and biotinylated *in vitro* with biotin ligase (BirA, Avidity, Denver, CO, USA) according to manufacturer's instructions. The biotinylated mCLC/CLF was dialyzed against 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl (Buffer A) and loaded onto avidin resin equilibrated with the same buffer. The affinity column was washed with 5 volumes of buffer A. Biotinylated cytokine was eluted in buffer A containing 5 mM biotin and analysed by SDS-PAGE and Western blot with anti-CLC polyclonal antiserum (see section 2.5) or horseradish peroxidase-labelled streptavidin.

Purified proteins were quantified using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Biolynx, ON, Canada) and stored at -80°C until further analysis.

2.4. Biological assay for mCLC/CLF activity.

Ba/F3 cells transfected with hgp130, human leukemia inhibitory factor receptor β (hLIFR β) and hCNTFR α (A kind gift from Dr. K. J. Kallen, Christian Albrechts Universität zu Kiel, Germany) were maintained as described (Kallen et al., 1999). Ba/F3 transfectants (10^4 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. [3 H] thymidine (20-30 Ci/mmol; Amersham Biosciences) was added for 4h and the incorporated radioactivity measured by scintillation counting.

2.5. Generation of a rabbit anti-CLC and anti-CLF serum

The CLC and CLF proteins used for immunization were produced in *E. coli*. For this production, the segments of the mCLC and mCLF cDNA sequences coding for the mature proteins were amplified by PCR using the oligonucleotides CTAGCTAGCCTTAATCGCACAGGAGATCC, CCGCTCGAGGAAACCATGTGCCTCCAAG, CTAGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAT and CCGCTCGAGTTTAGCCGGCAGGACCTCTC. The amplified cDNAs was cloned in the *E. coli* expression vector pET24d(+) (Novagen, Madison, WI, USA), using the restriction enzymes *Nhe* I and *Xho* I and fully sequenced. Recombinant CLC and CLF were expressed in BL21 (DE3) Star (Invitrogen) and purified under denaturing conditions as described (Cognet et al., 2003). Two rabbits were immunized with each of the purified proteins in incomplete Freund's adjuvant. The antisera were collected after two subsequent boosts with the protein in incomplete Freund's adjuvant. The rabbit anti-mCLC and anti mCLF antisera were used to quantify the CLC/CLF complex by Western blot (Burnette, 1981).

2.6. Production of recombinant mCNTF

Production and purification of mCNTF was performed as described previously (Cognet, 2004).

2.7. Generation of HEK-293 transfectants expressing mCNTFR α

The cDNA coding for mCNTFR α was amplified by PCR from mouse brain cDNA (Invitrogen) using the primers CTTATGACTGCTTCTGTCCCATGGG and TTTCAGATCAGGAGATTGTTGGCTG. The amplified cDNA was cloned in pCR4TOPO (Invitrogen). For recloning in pcDNA5/FRT, the insert was re-amplified

using the primers CGCGATCCGCCACCATGACTGCTTCTGTCCCATG and CCGCTCGAGTCAGATCAGGAGATTGTTGG and cloned in pcDNA5/FRT using the restriction enzymes *Bam*HI and *Xho*I. The pcDNA5 mCNTFR α insert was fully sequenced. Stable transfectants were obtained and maintained as described in section 2.2. Control transfectants were generated using empty pcDNA5/FRT.

2.8. B cell isolation and culture

Mouse spleen from female C57BL/6 mice (3-5 weeks) were isolated and digested with collagenase and DNase (Sigma) (Poudrier et al., 1999). Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation on Histopaque® (Sigma). B cells were then purified using anti-B220 magnetic Microbeads (Miltenyl Biotech Inc. Auburn, CA, USA). The purity was checked by FACS analysis using a FITC-labeled anti-mouse CD45R/B220 mAb (Becton Dickinson). The B cells were then incubated for 16 to 18h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin (all from Sigma) and 50 μ M 2-mercaptoethanol. Stimulated B cells were activated with 10 μ g/ml LPS from *E. coli* isotype O55:B5 (Sigma).

2.9. Detection of receptor expression by flow cytometry

Cells were incubated for 1 h on ice with 1 μ g/ml biotinylated mCLC with or without a 10 min pre-incubation with 100 μ g/ml recombinant mCNTF or the rabbit polyclonal anti-mCLC antiserum (1:50). The binding was then revealed with Streptavidin-APC (BD Biosciences/Pharmingen, San Diego, CA). Dead cells were excluded by propidium iodide staining. FACS analyses were performed using a FACScalibur cytofluorometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Staining with anti-CNTFR α mAbs 78V was performed as described previously (Elson et al., 2000) and revealed using

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse antiserum (1:25; BD Bioscience/Pharmingen).

2.10. Detection of mouse CNTFR α chain by RT-PCR

Total RNA was isolated using Trizol™ (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Random hexanucleotide primed cDNA was synthesized using Superscript II (Invitrogen) using 5 μ g RNA aliquots as template, following manufacturer's instructions. The cDNA was subjected to 30 cycles of PCR with the primers CATTTCGGTACATGCACCTGTTC and TCTGTTGTGAGATGCCGAGGTT (mCNTFR α), and CCACAGTCCATGCCATCACTGC and GCCATGTAGGCCATGAGGTCCA (mGAPDPH) and the PCR products analysed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

2.11. Purification of CNTFR α expressing cells with paramagnetic beads

HEK 293 Flp-in transfectants expressing CNTFR α were labelled with CFSE (Molecular Probes, Eugene, USA). Transfectants at 10 millions cells per ml were incubated with CFSE (final concentration 0, 5 μ M) in PBS for 8 minutes with gentle mixing in the dark. The reaction was quenched with 1 volume FCS for 1 minute. Cells were washed 3 times with PBS, 5% FCS and grown overnight in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, hygromycin B (100 μ g/ml). One million HEK 293 transfectants expressing CNTFR α labelled with CFSE were mixed with 3×10^7 unlabelled HEK 293 cells. These cells were resuspended in PBS, 2% FCS, 1mM EDTA (EasySep buffer) at $2 \cdot 10^8$ cells per ml and incubated with 1 μ g/ml biotinylated mCLC 1h at 4°C. Cells were washed with an excess of EasySep buffer and resuspend to the original volume in 12x75mm polystyrene tube. Cells were then labelled with

EasySep™ Biotin Selection Cocktail and EasySep™ Magnetic Nanoparticles (StemCell, Toronto, Ontario, Canada) and separated according to the manufacturer's instructions. The purity of the cell sorting was assessed by flow cytometry.

3. Results

3.1. mCLC tagged with the AviTag epitope can be expressed with CLF as a biologically active complex and efficiently labelled in vitro with BirA E. coli biotin ligase.

We previously observed that the protein C epitope (Rezaie et al., 1992) can be efficiently used for the purification of CLC/CLF from supernatants of transfected cells (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001). Mouse CLC cDNA was therefore modified at the 3' end to encode for a protein with a protein C tag followed by an AviTag™ epitope. The latter was chosen as it represents a Bir A biotin ligase substrate efficiently recognised when fused to the carboxy terminus of recombinant proteins (Beckett et al., 1999; Cull and Schatz, 2000). In previous work on the human CLC/CLF complex, we failed to detect effects of carboxyl-terminal tags on biological activity, in accordance with the predicted structure of the complex (Elson et al., 2000; Lelievre et al., 2001; Plun-Favreau et al., 2001).

A bicistronic construct was generated by introducing an IRES between the cDNA coding for the tagged mCLC and the mCLF. It was cloned in the eukaryotic expression plasmid pcDNA5/FRT (named pcDNA5 mCLCprotCAviTagmCLF).

The Flp-in™-293 HEK-293 derivative designed for the rapid selection of stable transfectants was used for the expression of the cytokine. This cell line contains an Flp recombinase target (pFRT/lacZeo) integrated in a transcriptionally active genomic locus. Stable HEK-293 derivatives co-expressing mCLC and mCLF were generated by transfection and Flp recombinase catalyzed exchange between pcDNA5 mCLCprotCAviTagmCLF and the integrated pFRT/lacZeo. HEK-293

clones were isolated and screened for mCLC and mCLF production by Western blot (data not shown). Two clones were expanded for production of recombinant mCLC/CLF. The recombinant complex was purified by affinity chromatography on anti-protein C resin (Rezaie et al., 1992; Elson et al., 2000). The purified complex was analysed by Western blot (Fig.1 and data not shown).

The protein could be efficiently biotinylated in vitro using recombinant BirA (Fig. 1), as assessed by Western blot with horseradish-labelled streptavidin. When subjected to chromatography on an avidin agarose column, most of the mCLC/CLF complex was retained indicating that the majority of the protein was biotinylated (Fig.1 and data not shown).

The biological activity of the mCLC/CLF complex was assessed using a derivative of the IL-3 dependant cell line Ba/F3 rendered responsive to CNTFR ligands by transfection with the cDNAs coding for the three subunits of the human CNTFR (hgp130, hLIFR β and hCNTFR α) (Kallen et al., 1999). A robust Ba/F3 proliferative response to mCLC/CLF was observed showing that the mouse AviTag tagged protein was active (Fig. 2).

3.2. Bir A biotinylated mCLC/CLF can be used to detect CNTFR α

The CLC/CLF complex is a ligand for the tripartite CNTFR (Elson et al., 2000). A strong binding of the Bir A biotinylated mCLC/CLF could be revealed on Ba/F3 cells expressing the tripartite receptor using APC (allophycocyanin)-labeled streptavidin (Fig.3). This binding was not detected on Ba/F3 cells transfected only with the two signalling chains of the CNTFR, LIFR β and gp130 (Fig.3) and could be displaced by competition with an excess of mouse CNTF (mCNTF; Fig.3) indicating that it was specific. The receptor expressed by the Ba/F3 cells being of human origin, we generated stable transfectants expressing the mouse CNTFR α chain in the Flp-inTM-293 cell lines to further test the biotinylated complex. Transfected cells were screened by flow cytometry using an anti-CNTFR α monoclonal antibody (Fig. 4,

panel A). When the cells were incubated with the biotinylated CLC, a binding could be readily detected using APC-labeled streptavidin (Fig. 4, panel B). No binding was observed on the control transfectants (Fig. 4, panel B). The signal was strongly reduced by competition with recombinant mCNTF (Fig. 4, panel C) but not by mIL-4 (Fig. 4, panel D).

3.3. Bir A biotinylated mCLC/CLF can be used to isolate CNTFR α positive cells

To test if biotinylated mCLC/CLF could be used to isolate CNTFR α positive cells, we labelled HEK-293 transfectants expressing CNTFR α with CFSE and mixed them with a 30 time excess of non-transfected HEK-293 cells (Fig. 5, panel A). The mix was successively incubated with biotinylated mCLC/CLF and streptavidin-labelled paramagnetic beads. Magnetically sorting of the mCLC/CLF bound cells lead to a very strong enrichment of the CNTFR α transfectants as indicated by the analysis of the sorted cells for CFSE staining by flow cytometry (Fig. 5, panel B).

3.4. Bir A Biotinylated mCLC/CLF can be used to detect CLCR expressed by mouse B cells.

Normal and malignant B cells have been shown to be responsive to CLC whereas B cells have not been reported to express CNTFR α (Sleeman et al., 2000). When B cells were incubated with biotinylated mCLC/CLF, a faint binding signal could be detected (Fig. 6A). This signal was strongly up-regulated in B cells stimulated with lipopolysaccharide for 16h (Fig. 6B). As expected, CNTFR α mRNA was not detectable by RT-PCR in the LPS stimulated B cells (Fig. 7) and the binding of biotinylated mCLC/CLF could not be competed by an excess of mCNTF (Fig.6C), indicating that the B cell CLC receptor is different from CNTFR α . We generated a polyclonal anti-mouse CLC by immunisation of rabbits with recombinant CLC produced in bacteria. This polyclonal anti-serum could specifically reduce the

proliferation of Ba/F3 expressing the tripartite CNTFR in response to mCLC/CLF but not to mCNTF (data not shown). When used at the same concentration, it could partially prevent the binding of biotinylated mCLC/CLF to activated B cells (Fig. 6 panel D).

4. Discussion.

Two new ligands for CNTFR, CLC/CLF and neuropoietin have been identified recently (Senaldi et al., 1999; Shi et al., 1999; Elson et al., 2000; Plun-Favreau et al., 2001; Senaldi et al., 2002; Uemura et al., 2002; Burger et al., 2003; Derouet et al., 2004). As one of these two ligands, neuropoietin has been lost recently during evolution in human (Derouet et al., 2004), CLC is likely to be the long sought after developmentally important CNTFR ligand (DeChiara et al., 1995; Elson et al., 2000). To facilitate the identification of the targets for this family of cytokines, we generated a derivative of mCLC/CLF which can be used to detect CNTFR and the putative CLCR expression by flow cytometry. The CLC/CLF derivative was tagged with an optimized Bir A biotin ligase substrate (AviTag), which is biotinylated at a single residue (Beckett et al., 1999; Cull and Schatz, 2000). The modified CLC/CLF was biologically active and could be efficiently biotinylated in vitro with commercially available recombinant Bir A enzyme. Using fluorescently labelled streptavidin as a detection reagent, biotinylated mCLC/CLF was shown to allow the detection of CNTFR by flow cytometry on various cells: Ba/F3 and HEK-293 fibroblasts transfected respectively with human and mouse CNTFR α cDNA. Biotinylated mCLC/CLF is therefore likely to be useful to assess the expression of CNTFR by CNTF responsive cells such as neuronal cells (Walicke et al., 1986; Blottner et al., 1989; Sendtner et al., 1990), astrocytes, muscle cells (Forger et al., 1993; Helgren et al., 1994; Guillet et al., 1999), oligodendrocytes (Barres et al., 1993; Louis et al., 1993; D'Souza et al., 1996; Stankoff et al., 2002), adipocytes (Ott et al., 2002; Zvonic et al., 2003). It should facilitate the study of CNTFR expression

during cell differentiation (Stankoff et al., 2002), during the progression of neurodegenerative diseases and in mouse models in which CNTF is protective (Sendtner et al., 1992; Mitsumoto et al., 1994; Gloaguen et al., 1997; Lambert et al., 2001; Linker et al., 2002).

More relevant for immunologists, this mCLC/CLF derivative was shown to permit the detection of CLC specific receptors. CLC is expressed in the immune system (Senaldi et al., 1999; Shi et al., 1999; Senaldi et al., 2002) and B cell lymphocytes respond to CLC (Senaldi et al., 1999; Senaldi et al., 2002) without expressing CNTFR α (Sleeman et al., 2000). Using biotinylated mCLC/CLF, CLCR was clearly detectable on LPS activated B cells. Biotinylated mCLC/CLF should therefore allow the identification of the B cell receptor and is likely to help in the identification of other CLC/CLF cellular targets in the immune system.

Rat CNTF was demonstrated to activate directly the LIFR (gp130 and LIFR β), whereas human CNTF was recently shown to bind and activate the IL-6 receptor (Gearing et al., 1994; Schuster et al., 2003). This led to the suggestion that the toxicity of human CNTF observed in clinical trials (Miller et al., 1996a,b) might be due to direct activation of cells expressing the IL-6 receptor or indirect effects of complexes between CNTF and soluble IL-6R α on cells expressing gp130 (Schuster et al., 2003). CLC and CNTF are related and their site I, involved in the interaction with the receptor α chains, conserved (Perret et al., 2004). However, no activation of Ba/F3 cells expressing either LIFR (gp130 and LIFR β) or IL-6R (gp130 and IL-6R α) could be detected (Elson et al., 2000 and data not shown). The observation reported with the CNTF nevertheless point to plasticity in the cytokine network in this family of cytokines and suggest that another receptor of the IL-6 or the related IL-12/IL-23/IL-27 families (Trinchieri et al., 2003; Murakami et al., 2004) could be responsible for the binding on activated B cells.

The possibility to carefully monitor and compare CNTFR and CLCR expression should facilitate the preclinical validation of CLC/CLF and CNTF, avoiding secondary effects linked to receptor expression by non-targeted cells. Biotinylated

mCLC/CLF represents a tool for the evaluation of this cytokine as a potential neuroprotective, immunostimulatory or anti-obesity agent in murine models and should ease the identification of mutant specific for CNTF or CLC receptors.

Whereas our study was mainly restricted to the validation of biotinylated mCLC/CLF for flow cytometry, the labelled cytokine was shown to allow the isolation of cells expressing CNTFR using anti-biotin and paramagnetic beads. It could be used for the purification of interacting molecules by affinity chromatography. Finally, the availability of a form of mCLC/CLF which can be purified with very high affinity chromatography and detected with high sensitivity (Wilchek and Bayer, 1990) might facilitate the evaluation the bioavailability of the cytokine.

Acknowledgments.

We are grateful to Dr K.J Kallen (Christian Albrechts Universität zu Kiel, Germany) for kindly providing the stably transfected BaF/3 derivatives. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and the Multiple Sclerosis Scientific Research Foundation. F.G was supported by a grant from the International Council for Canadian Studies. J.F.G. is a Canada Research Chair recipient.

Figure legends

Fig.1. Purification process of mCLC/CLF. Stable transfectants expressing mCLCprotCAviTag/mCLF were obtained by co-transfecting pOG44 and pcDNA5 mCLCprotCAviTagmCLF plasmids in HEK 293 Flp-inTM cells. Transfectant supernatants were concentrated by ultrafiltration and the cytokine was purified by anti-protein C affinity chromatography. The cytokine was then biotinylated *in vitro* with BirA biotin ligase and purified by affinity chromatography on monomeric avidin. The recombinant protein was detected by Western blot with anti-CLC polyclonal Ab or streptavidin-HRP, as indicated.

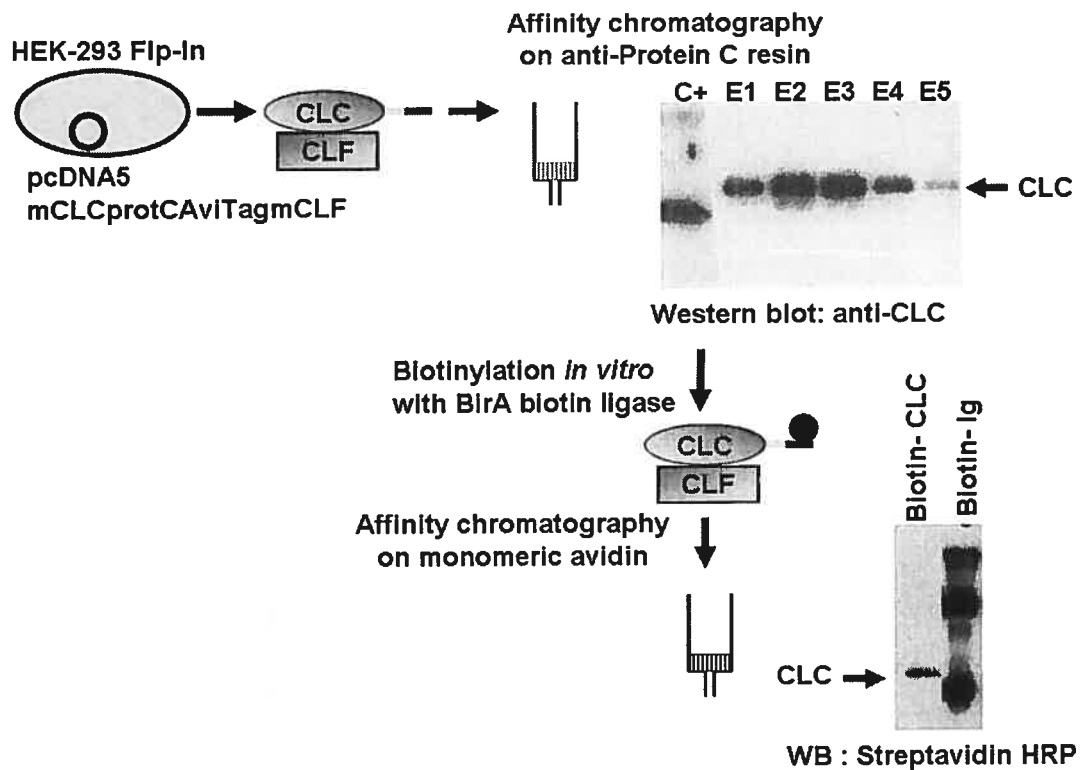


Fig.2. mCLC/CLF induces the proliferation of Ba/F3 cells transfected with hgp130, hLIFR β and hCNTFR α . Ba/F3 cells were cultured in the presence of serial dilutions of the indicated cytokine. Proliferation was measured by [3 H] thymidine incorporation in triplicates. Errors bars represent standard deviation.

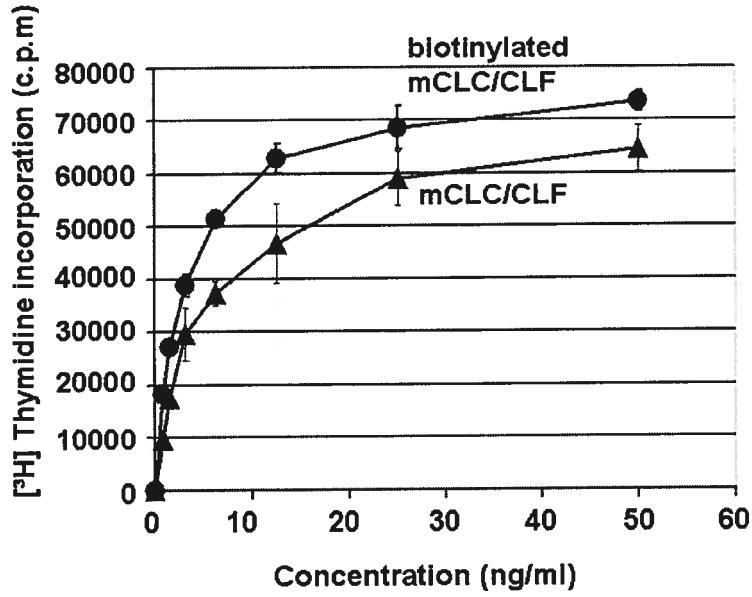


Fig.3. The biotinylated mCLC/CLF complex binds to Ba/F3 cells expressing the human tripartite receptor CNTFR α . Ba/F3 cells expressing the human tripartite receptor CNTFR α (dotted line) or Ba/F3 cells transfected with the two signalling subunits LIFR β and gp130 only (filled histogram) were incubated with biotinylated mCLC/CLF (panel A). The binding of biotinylated mCLC/mCLF could be inhibited by a hundred-fold excess of mCNTF (bold line, panel B). The binding was subsequently revealed with streptavidin-APC. Thin lines indicate the background binding of streptavidin-APC alone.

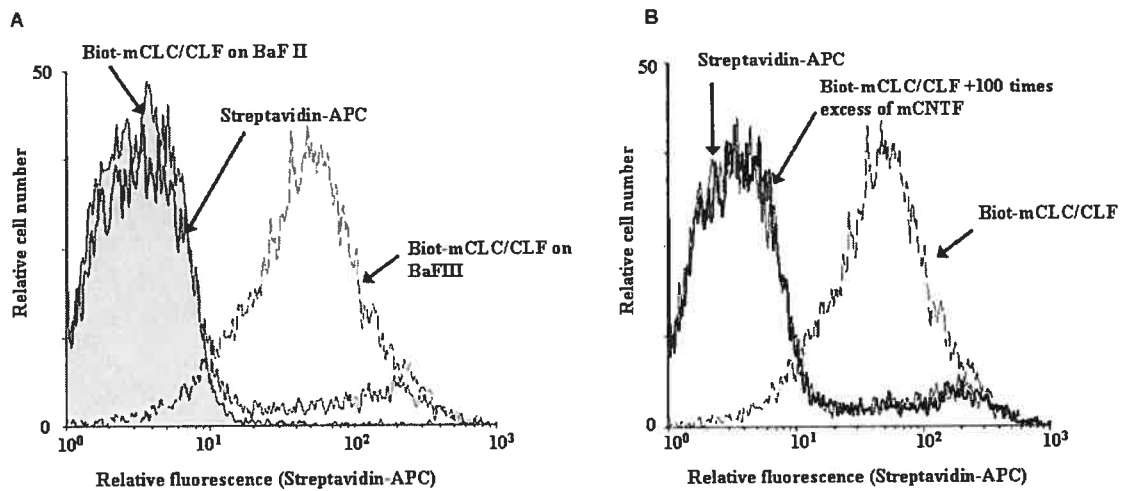


Fig.4. The biotinylated mCLC/CLF complex binds to Flp-inTM-293 cells expressing the mouse CNTFR α . Panel A: Transfectant clones were screened for the expression of CNTFR α by flow cytometry using an anti-CNTFR α monoclonal antibody (thin line) and an FITC-conjugated goat anti-mouse antiserum. The filled histogram shows the binding on mock transfected cells. Transfectants expressing the mouse CNTFR α were incubated with biotinylated mCLC/CLF with (bold line, panel C and D) or without (dotted line, panel B, C, D) a hundred-fold excess of mCNTF (panel C) or mIL-4 (panel D). The binding was then revealed with streptavidin-APC. Thin lines indicate the background binding of streptavidin-APC alone. The filled histogram shows the binding of biotinylated mCLC on mock transfected Flp-inTM-293 cells (panel B).

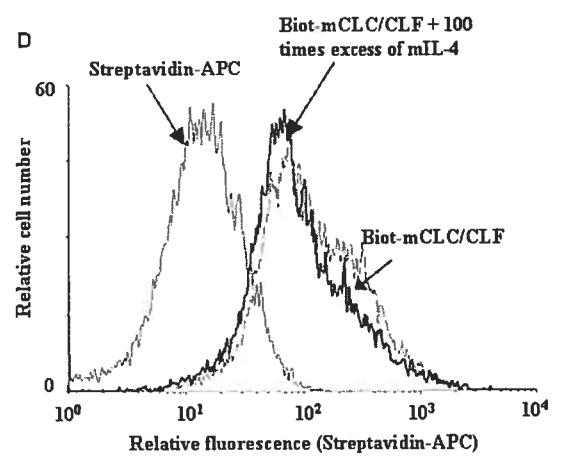
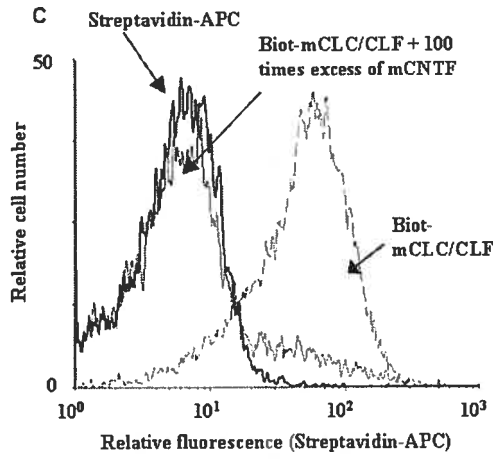
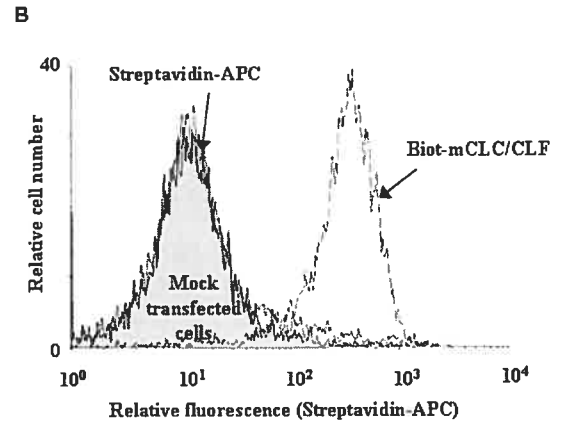
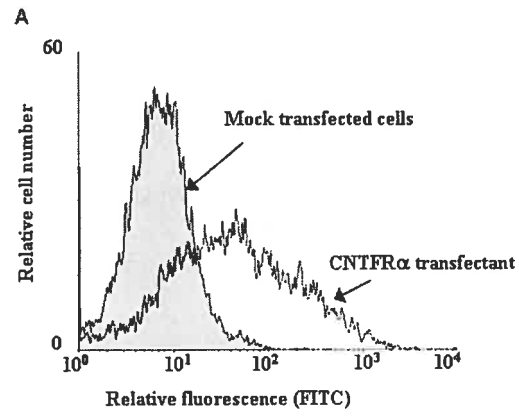


Fig.5. The biotinylated mCLC/CLF complex can be used to isolate CNTFR α expressing cells. Transfectants expressing CNTFR α were labelled with CFSE, mixed with mock-transfected Flp-inTM-293 cells and incubated with biotinylated mCLC/mCLF and anti-biotin and paramagnetic beads. Cells were analysed by flow cytometry before (panel A) and after (panel B) magnetic cell sorting.

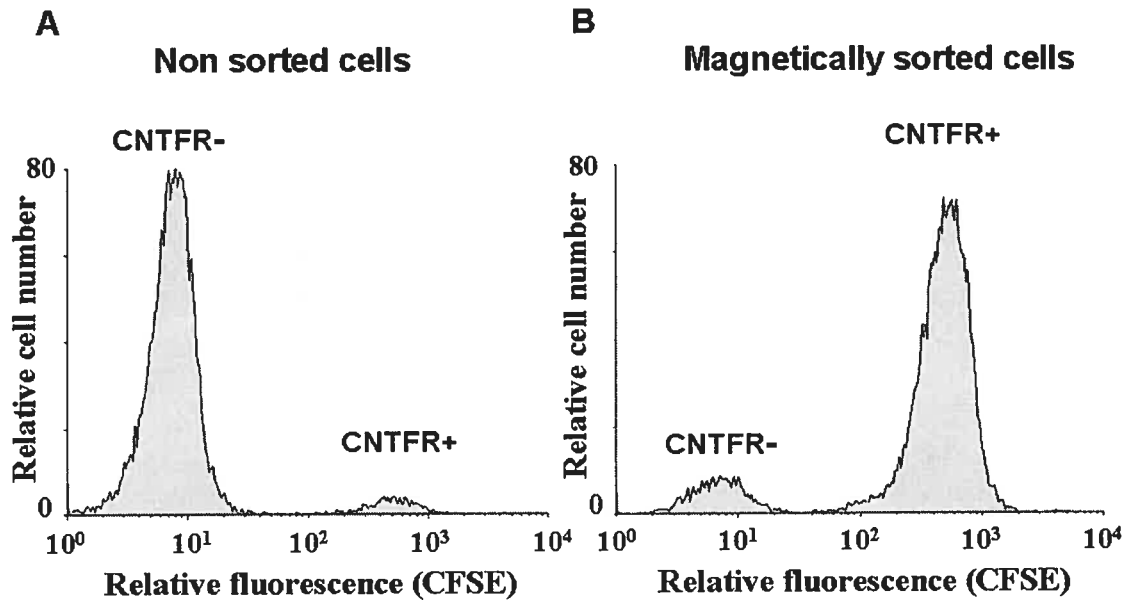


Fig.6. The biotinylated mCLC/CLF complex can be used to detect the mCLCR on B cells. Mouse B cells were cultured for 18h without (panel A) or with (panels B, C and D) LPS. Cells were stained with biotinylated mCLC/CLF and the binding was revealed with streptavidin-APC (dotted line). Thin lines indicate the background binding of the streptavidin-APC on the cells. The binding is not inhibited by an excess of mCNTF (panel C, bold line) but could be partially prevented by incubation with a polyclonal anti-mCLC (panel D, bold line).

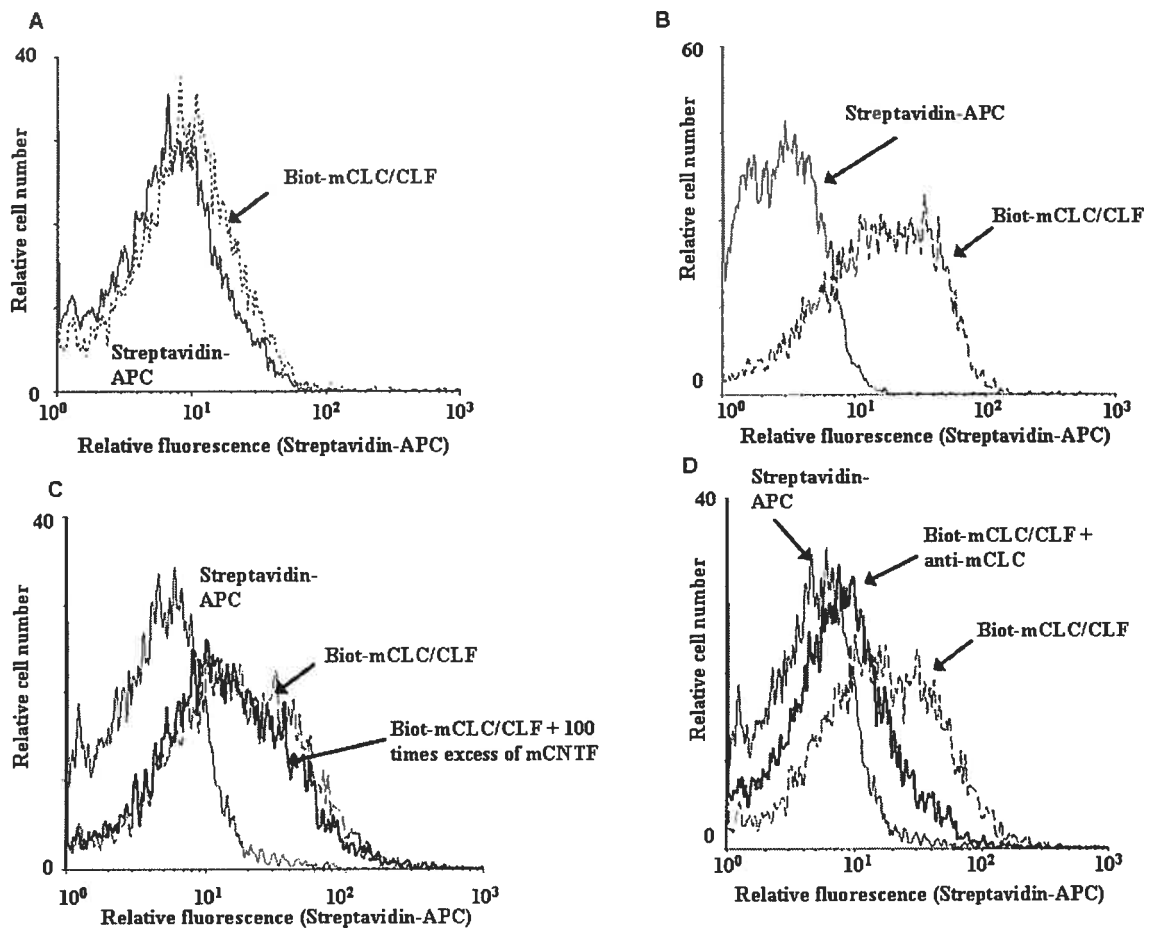
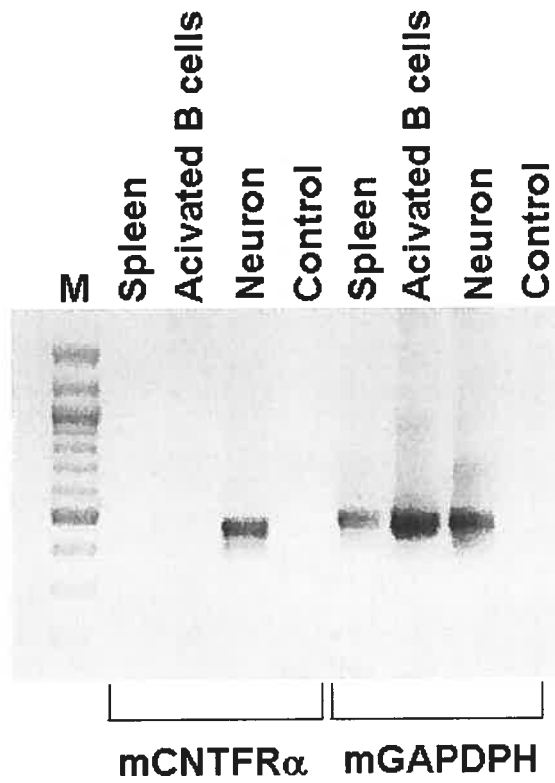


Fig.7. CNTFR α is not expressed by mouse spleen and LPS stimulated B cells. Total RNA isolated from mouse spleen cells, purified B cells stimulated with LPS for 18h and brain was subjected to RT-PCR with CNTFR α and GAPDH specific primers. Lane control: no reverse transcriptase added before PCR. Lane M: 100 bp DNA ladder.



References.

- 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. and Hilton, D.J., 1999. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr. Biol.* 9, 605-8.
- Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M. and Raff, M.C., 1993. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118, 283-95.
- Beckett, D., Kovaleva, E. and Schatz, P.J., 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* 8, 921-9.
- Blottner, D., Bruggemann, W. and Unsicker, K., 1989. Ciliary neurotrophic factor supports target-deprived preganglionic sympathetic spinal cord neurons. *Neurosci. Lett.* 105, 316-20.
- Bontron, S., Ucla, C., Mach, B. and Steimle, V., 1997. Efficient repression of endogenous major histocompatibility complex class II expression through dominant negative CIITA mutants isolated by a functional selection strategy. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4249-58.
- Burger, R., Bakker, F., Guenther, A., Baum, W., Schmidt-Arras, D., Hideshima, T., Tai, Y.T., Shringarpure, R., Catley, L., Senaldi, G., Gramatzki, M. and 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, 869-78.
- Burnette, W.N., 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Cognet, I., de Coignac, A.B., Magistrelli, G., Jeannin, P., Aubry, J.P., Maisnier-Patin, K., Caron, G., Chevalier, S., Humbert, F., Nguyen, T., Beck, A., Velin, D., Delneste, Y., Malissard, M. and Gauchat, J.F., 2003. Expression of recombinant

proteins in a lipid A mutant of *Escherichia coli* BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. *J. Immunol. Methods* 272, 199-210.

Cognet, I., Guilhot, F., Chevalier, S., Guay-Giroux, A., Bert, A., Elson, G.C.A., Gascan, H., Gauchat, J.F., 2004. Expression of biologically active mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) and soluble CNTFR α in *Escherichia coli* and characterization of their functional specificities. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 15, 1-8.

Cull, M.G. and Schatz, P.J., 2000. Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags. *Methods Enzymol.* 326, 430-40.

DeChiara, T.M., Vejsada, R., Poueymirou, W.T., Acheson, A., Suri, C., Conover, J.C., Friedman, B., McClain, J., Pan, L., Stahl, N. and et al., 1995. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83, 313-22.

Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H. and Chevalier, S., 2004. Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4827-32.

D'Souza, S.D., Alinauskas, K.A. and Antel, J.P., 1996. Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J. Neurosci. Res.* 43, 289-98.

Elson, G.C., 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.* 161, 1371-9.

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. and Gascan, H., 2000. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat. Neurosci.* 3, 867-72.

Forger, N.G., Prevet, 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.* 23, 8854-8.

Forger, N.G., Roberts, S.L., Wong, V. and Breedlove, S.M., 1993. Ciliary neurotrophic factor maintains motoneurons and their target muscles in developing rats. *J. Neurosci.* 13, 4720-6.

Gearing, D.P., Ziegler, S.F., Comeau, M.R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L., Mosley, B., 1994. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1119.

Giess, R., Holtmann, B., Braga, M., Grimm, T., Muller-Myhsok, B., Toyka, K.V. and Sendtner, M., 2002a. Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1277-86.

Giess, R., Maurer, M., Linker, R., Gold, R., Warmuth-Metz, M., Toyka, K.V., Sendtner, M. and Rieckmann, P., 2002b. Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 59, 407-9.

Gloaguen, I., Costa, P., Demartis, A., Lazzaro, D., Di Marco, A., Graziani, R., Paonessa, G., Chen, F., Rosenblum, C.I., Van der Ploeg, L.H., Cortese, R., Ciliberto, G. and Laufer, R., 1997. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6456-61.

Guillet, C., Auguste, P., Mayo, W., Kreher, P. and Gascan, H., 1999. Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging. *J. Neurosci.* 19, 1257-62.

Helgren, M.E., Squinto, S.P., Davis, H.L., Parry, D.J., Boulton, T.G., Heck, C.S., Zhu, Y., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M. and DiStefano, P.S., 1994. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76, 493-504.

Kallen, K.J., 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, 11859-67.

Knappskog, P.M., 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, 375-83.

Kozak, M. and Shatkin, A.J., 1979. Characterization of translational initiation regions from eukaryotic messenger RNAs. *Methods Enzymol.* 60, 360-75.

Lambert, P.D., Anderson, K.D., Sleeman, M.W., Wong, V., Tan, J., Hajarunguru, A., Corcoran, T.L., Murray, J.D., Thabet, K.E., Yancopoulos, G.D. and Wiegand, S.J., 2001. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4652-7.

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, 22476-84.

Linker, R.A., Maurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K.V., Sendtner, M. and Gold, R., 2002. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat. Med.* 8, 620-4.

Louis, J.C., Magal, E., Takayama, S. and Varon, S., 1993. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 259, 689-92.

Miller, R.G., Bryan, W.W., Dietz, M.A., Munsat, T.L., Petajan, J.H., Smith, S.A., Goodpasture, J.C., 1996a. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary

neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 1329.

Miller, R.G., Petajan, J.H., Bryan, W.W., Armon, C., Barohn, R.J., Goodpasture, J.C., Hoagland, R.J., Parry, G.J., Ross, M.A., Stromatt, S.C., 1996b. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann. Neurol.* 39, 256.

Mitsumoto, H., Ikeda, K., Klinkosz, B., Cedarbaum, J.M., Wong, V. and Lindsay, R.M., 1994. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 265, 1107-10.

Murakami, M., Kamimura, D., Hirano, T., 2004. New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth factor* 22, 75.

Ott, V., Fasshauer, M., Dalski, A., Klein, H.H. and Klein, J., 2002. Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis. *J. Endocrinol.* 173, R1-8.

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.

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.* 20, 1692-703.

Poudrier, J., Graber, P., Herren, S., Gretener, D., Elson, G., Berney, C., Gauchat, J.F. and Kosco-Vilbois, M.H., 1999. A soluble form of IL-13 receptor alpha 1 promotes IgG2a and IgG2b production by murine germinal center B cells. *J. Immunol.* 163, 1153-61.

Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S. and Lee, M.G., 1996. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all

antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques* 20, 102-4, 106, 108-10.

Rezaie, A.R., Fiore, M.M., Neuenschwander, P.F., Esmon, C.T. and Morrissey, J.H., 1992. Expression and purification of a soluble tissue factor fusion protein with an epitope for an unusual calcium-dependent antibody. *Protein Expr. Purif.* 3, 453-60.

Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grotzinger, J., Rose-John, S., Kallen, K.J., 2003. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J. Biol. Chem.* 278, 9528.

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. and 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, 5690-8.

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, 11458-63.

Sendtner, M., Kreutzberg, G.W. and Thoenen, H., 1990. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345, 440-1.

Sendtner, M., Schmalbruch, H., Stockli, K.A., Carroll, P., Kreutzberg, G.W. and Thoenen, H., 1992. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 358, 502-4.

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.* 262, 132-8.

Sleeman, M.W., 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, 265-72.

Stankoff, B., Aigrot, M.S., Noel, F., Wattilliaux, A., Zalc, B. and Lubetzki, C., 2002. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J. Neurosci.* 22, 9221-7.

Stockli, K.A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D. and Thoenen, H., 1989. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342, 920-3.

Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., Hayashi, M., Hu, J. and Deguchi, T., 1994. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat. Genet.* 7, 79-84.

Trinchieri, G., Pflanz, S., Kastelein, R.A., 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19, 641.

Uemura, A., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Nakashima, K. and Taga, T., 2002. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18, 1-7.

Walicke, P., Varon, S. and Manthorpe, M., 1986. Purification of a human red blood cell protein supporting the survival of cultured CNS neurons, and its identification as catalase. *J. Neurosci.* 6, 1114-21.

Wilchek, M. and Bayer, E.A., 1990. Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol.* 184, 5-13.

Zvonic, S., Cornelius, P., Stewart, W.C., Mynatt, R.L. and Stephens, J.M., 2003. The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 2228-35.

“Reprinted from *Journal of Immunological Methods*, Vol.301, Isabelle Cognet, Florence Guilhot, Mélanie Gabriac, Sylvie Chevalier, Younes Chouikh, Alexandra Herman-Bert, Angélique Guay-Giroux, Sophie Corneau, Giovanni Magistrelli, Greg C. Elson, Hugues Gascan and Jean-François Gauchat, *Cardiotrophin-like cytokine labelling using Bir A biotin ligase: A sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells*, Pages No. 53-65, Copyright (2005), with permission from Elsevier”.

Article 3 : Ciliary Neurotrophic Factor Biotinylated using BirA Biotin Ligase: a Flow Cytometry Reagent for Receptor Detection.

Publication envisagée : The journal of Neuroscience Methods.

Isabelle Cagnet¹, Mélanie Gabriac¹, Florence Guilhot¹, Alexandra Bert¹, Sophie Corneau¹, Sylvie Chevalier², Hugues Gascan², Greg Elson³ and Jean-François Gauchat^{1,*}.

¹Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Canada,

²INSERM U564, Angers, France and ³NovImmune SA, Geneva, Switzerland.

*Corresponding author : Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, C.P 6128, succursale Centre-ville, Montréal QC H3C 3J7, Canada. Fax : +1 514 343 2291. E-mail address : XXXXXXXXXX

Running title: Receptor detection with biotin ligase labelled CNTF.

Abstract

The ciliary neurotrophic factor receptor comprises a specific non-signalling α chain of restricted expression and two ubiquitously expressed signalling subunits shared with other cytokines. This receptor is important for nervous system development. Most studies on its expression have been performed at the mRNA level. We tested a ciliary neurotrophic factor derivative enzymatically biotinylated during production in *E. coli* for receptor detection by flow cytometry.

Ciliary neurotrophic factor tagged with a minimal Bir A peptide substrate and 6 histidines was biotinylated during production in *E. coli*. The cytokine was purified by

successive affinity chromatography on nickel nitriloacetic acid and monomeric avidin resins and used in conjunction with allophycocyanin-labeled streptavidin.

Binding of the biotinylated cytokine was detected on transfectants and cell lines expressing the α chain of the receptor. No binding was observed on transfectants or cell lines expressing only the two signalling subunits of the receptor.

The enzymatically labelled cytokine allows receptor detection by flow cytometry. Identification of receptor expressing cells should help evaluation of the roles and therapeutic applications of its three ligands, ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin like cytokine and neuropoietin. This further validates enzymatic labelling with biotin for the generation of flow cytometry reagents.

Key terms: Flow cytometry; cytokine receptors; ciliary neurotrophic factor; ciliary neurotrophic factor receptor; biotinylation; streptavidin.

Abbreviations: CLC, cardiotrophin like cytokine; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CNTFR, ciliary neurotrophic factor receptor; h, human; IMAC, immobilized metal-ion affinity chromatography; IPTG, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside; LIFR β , leukemia inhibitory factor receptor β ; m, mouse; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; STAT, signal transducer and activator of transcription.

1. Introduction

The glycosyl-phosphatidylinositol anchored ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor alpha chain (CNTFR α) form with leukemia inhibitory factor receptor β (LIFR β) and gp130 a tripartite receptor specific for 3 cytokines: CNTF, cardiotrophin like cytokine (CLC; also known as B cell stimulating factor 3 or novel neurotrophin-1) and neuropoietin (Derouet, Rousseau et al., 2004; Elson, Lelievre et al., 2000; Senaldi, Varnum et al., 1999; Shi, Wang et al., 1999; Sleeman, Anderson et al., 2000). This receptor is expressed predominantly in neural tissue and skeletal

muscle (Sleeman, Anderson et al., 2000). Lower expression of the receptor or its mRNA has been detected in adrenal gland, sciatic nerve, skins, liver, kidney and testis (Sleeman, Anderson et al., 2000).

The importance of the CNTFR and its ligands is indicated by the phenotype of the CNTFR α knock-out mice, which die perinatally and display severe motoneuron deficits (DeChiara, Vejsada et al., 1995). The high affinity action of CNTF, CLC and neuropoietin requires an initial binding to CNTFR α , which leads to the recruitment and activation of the signalling subunit, LIFR β and gp130 and induction of the downstream signalling events, such as signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) and STAT-1 phosphorylation (Derouet, Rousseau et al., 2004; Elson, Lelievre et al., 2000; Lelievre, Plun-Favreau et al., 2001; Sleeman, Anderson et al., 2000). These signalling pathways are shared with many other cytokines receptors (Bravo and Heath, 2000; Kamimura, Ishihara et al., 2003) and therefore the specificity of CNTFR ligand family, like other cytokines, is linked to the restricted receptor expression and cytokine bioavailability. A significant fraction of current data on CNTFR α expression pattern derives from study on mRNA expression rather than expression of the protein (Sleeman, Anderson et al., 2000). To detect CNTFR α by flow cytometry, we produced an enzymatically biotinylated derivative of mouse CNTF (mCNTF). As bioactive CNTF can be produced in bacteria (Cognet, Guilhot et al., 2004; Lin, Mismar et al., 1989; McDonald, Ko et al., 1991; Stockli, Lottspeich et al., 1989), mCNTF was expressed in *E. coli*. The last amino acids of the cytokine are dispensable for bioactivity (Panayotatos, Radziejewska et al., 1993), as expected from the protein three dimensional structure (McDonald, Panayotatos et al., 1995). The cytokine was therefore tagged at the carboxyl terminus with an epitope, (AviTag) biotinylated at a specific lysine in *E. coli* expressing BirA biotin ligase (Beckett, Kovaleva et al., 1999; Cull and Schatz, 2000). The biotinylated mCNTF was shown to be biologically active and validated as a sensitive tool for receptor detection on transfectants cell lines.

2. Material and methods

2.1. Expression plasmids and bacterial strains

The pET24d (+) vectors (Novagen, Madison, WI, USA) allow the expression of a cDNA under the control of the T7 promoter (Studier, Rosenberg et al., 1990) and in frame with a 6 histidines tag. A derivative (pET-AviTagMycHis) was produced by inserting a sequence coding for a minimal BirA peptide substrate (AviTag, Avidity, Denver, CO, USA) (Beckett, Kovaleva et al., 1999; Cull and Schatz, 2000), a c-myc peptide epitope (Evan, Lewis et al., 1985) and 6 histidines (ELLGGGLNDIFEAQKIEWHEPRFEQKLISEEDLNMHTGHHHHHH) between the *XhoI* and *AvaI* restriction sites of pET24d (+). The 596 bp *NcoI-XhoI* restriction fragment of the pET-mCNTF plasmid (Cognet, Guilhot et al., 2004) was cloned between the corresponding restriction sites of pET-AviTagMycHis. The resulting plasmid pET-mCNTF-AviTag was checked by DNA sequencing using a 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

The plasmid pACYC-184BirA was isolated from the strain AVB99 (Avidity).

2.2. Expression of recombinant biotinylated mouse CNTF

Plasmids pET mCNTF-AviTag and pACYC-184BirA were introduced into competent BL21 Star (DE3) bacteria (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) by successive transformation (Inoue, Nojima et al., 1990). Overnight cultures of double transformants were diluted 1:50 and grown at 37°C in LB broth with 25 µg/ml kanamycin and 100 µg/ml ampicillin until an O.D.600 of 0.6 was attained. Expression of the recombinant proteins (mCNTF and BirA) was induced by addition of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG; final concentration 1 mM) for 4h at 37°C. At the time of induction, biotin was added to the medium (final concentration 50 µM). Bacteria were harvested by centrifugation, resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF

(phenylmethylsulfonyl fluoride) and 1 mg/ml lysosyme, incubated at room temperature for 30 min and lysed by sonication. Soluble proteins were separated from inclusion bodies and cell debris by centrifugation (15 min; 25000g) at 4°C. The centrifugation pellets representing the insoluble fractions were resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaH₂PO₄, 8 M Urea and incubated for 4h at room temperature or overnight at 4°C. Aliquots of each fraction were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

2.3. Purification of biotinylated recombinant mCNTF

mCNTF was first purified from the soluble bacterial lysate fractions under native condition by affinity chromatography on nickel nitriloacetic acid resin (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) as described (Cognet, Guilhot et al., 2004).

The biotinylated fraction of mCNTF was isolated using monomeric avidin resin (SoftLink; Promega, Madison, WI, USA). The irreversible binding sites of the avidin resin were saturated using biotin according to manufacturer's instructions. The recombinant mCNTF was dialyzed against 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl (Inoue, Nojima et al., 1990) and loaded onto avidin resin equilibrated with the same buffer. The affinity column was washed with 5 volumes of buffer A. Biotinylated mCNTF was eluted in buffer A containing 5 mM biotin. Then 10 µl aliquots of each fraction (flow through, washes and eluates) were analysed by SDS-PAGE.

Purified proteins were quantified using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Biotechnology Inc Rockford, IL, USA) and stored at -80°C until further analysis.

2.4. mCNTF biological activity measurement

The biological activity of biotinylated mCNTF was assessed using Ba/F3 cells transfected with hgp130, hLIFR β and hCNTFR α (Kallen, Grotzinger et al., 1999) as

described previously (Cognet, Guilhot et al., 2004). Recombinant mCNTF (Cognet, Guilhot et al., 2004) was used as standard.

2.5. Generation of HEK-293 transfectants expressing mCNTFR α

The generation and maintenance of HEK-293 cells transfectants expressing CNTFR α were performed as described previously (Cognet, Guilhot et al., 2005).

2.6. Detection of CNTF receptor by flow cytometry

Cells were incubated with 1 μ g/ml biotinylated mCNTF in PBS (phosphate buffer saline) supplemented with 1% bovine serum albumin and 0,01% NaN₃ for 1 h on ice. For competition assays, cells were pre-incubated for 10 min with 100 μ g/ml recombinant mCNTF (Cognet, Guilhot et al., 2004) or mIL-4 (Cognet, de Coignac et al., 2003). The binding was revealed with allophycocyanin (APC) labelled streptavidin (62 ng/ml; BD Biosciences/Pharmingen, San Diego, CA, USA). Dead cells were excluded by propidium iodide staining. FACS analyses were performed using a FACScalibur cytofluorometer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San-Jose, CA, USA).

3. Results

3.1. mCNTF tagged with the AviTag peptide is biotinylated in vivo in E. coli BL21 (DE3) overexpressing BirA biotin ligase

The mCNTF cDNA was modified to encode for a CNTF fused with an AviTag epitope and a 6 histidines tag and recloned in the *E. coli* expression vector pET24d(+). The AviTag was chosen as a substrate efficiently recognised by the BirA biotin ligase when located at the carboxyl terminus of recombinant proteins (Beckett,

Kovaleva et al., 1999; Cull and Schatz, 2000). The 6 histidines tag was added to allow purification of the mCNTF by immobilized metal-ion affinity chromatography [IMAC; (Crowe, Dobeli et al., 1994)], as previously described (Cognet, Guilhot et al., 2004).

The mCNTF was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Star transformed with a plasmid coding for the BirA biotin ligase (Fig.1 panel A). The biotinylated cytokine could be detected in both soluble and insoluble fractions of the bacterial lysates, when co-expression of CNTF and biotin ligase was induced with IPTG and bacteria were grown in the presence of biotin (Fig 1, panel B, lane 4 and 8). The mCNTF was purified from the bacterial lysates soluble fractions by IMAC (Fig 1, panel C) under non-denaturing conditions. The IMAC purified recombinant cytokine was subjected to affinity chromatography on a biotin binding resin (monomeric avidin). Most of the cytokine was retained on avidin (Fig 1, panel D), indicating that mCNTF had been efficiently biotinylated *in vivo*. The mCNTF biotinylation was confirmed by Western blot analysis with horseradish peroxidase-labelled streptavidin (Fig. 1, panel D).

The biological activity of the biotinylated mCNTF was assessed using a derivative of the IL-3 dependant cell line Ba/F3 rendered responsive to CNTFR ligands by transfection with the cDNAs coding for the three subunits of human CNTFR [hgp130, hLIFR β and hCNTFR α ; (Kallen, Grotzinger et al., 1999)]. The Ba/F3 proliferative response to biotinylated mCNTF was almost identical to the one induced by non-labelled mCNTF, indicating that, as expected (Panayotatos, Radziejewska et al., 1993), neither the AviTag nor the biotin impaired bioactivity (Fig. 2).

3.2. BirA biotinylated mCNTF can be used to detect CNTFR α expressed by Ba/F3 or HEK-293 transfectants

A strong binding of the biotinylated mCNTF could be revealed on Ba/F3 cells expressing the tripartite receptor using APC-labelled streptavidin (Fig. 3). CNTF

does not activate Ba/F3 transfected with the two signalling chains of the CNTFR, LIFR β and gp130 in the absence of CNTFR α (Cognet, Guilhot et al., 2004; Sleeman, Anderson et al., 2000). In accordance with this CNTFR α chain requirement, no binding was detected on those cells (Fig. 3, filled histogram). The binding on Ba/F3 cells expressing the tripartite receptor could be displaced by competition with an excess of mCNTF (Fig.3), indicating that it was specific.

The CNTFR expressed by the Ba/F3 derivative is of human origin and mCNTF show a partial species specificity (Cognet, Guilhot et al., 2004). We therefore further tested the biotinylated cytokine using HEK-293 stable transfectants expressing mCNTFR α chain. When the cells were incubated with the biotinylated mCNTF, a binding could readily be detected using APC-labelled streptavidin (Fig. 4, panel A). No binding was observed on the control transfectants (Fig. 4, panel A). The signal was strongly reduced by competition with an excess of recombinant mCNTF (Fig. 4, panel A) but was unaffected by competition with an irrelevant cytokine, recombinant mIL-4 (Fig 4, panel B).

3.3. CNTFR expressed by neuronal and liver cell lines is detectable using BirA Biotinylated mCNTF

As transfectants can express high levels of recombinant proteins, we further validated the BirA biotinylated mCNTF as a flow cytometry reagent using two cell lines expressing CNTFR α messenger RNA, the neuroblastoma NGP and the liver cell line HepG2 (Fig 5, panel A and B). The expression of CNTFR on NGP and HepG2 cells was clearly detectable with biotinylated mCNTF (Fig. 5 panel A and B). Specificity of the signal was assessed by competition with an excess of mCNTF (Fig. 5, panel A and B).

Discussion

The identified ligands of CNTFR form a 3 member family in rodents, comprising CNTF, CLC and neuropoietin (Burger, Bakker et al., 2003;Derouet, Rousseau et al., 2004;Elson, Lelievre et al., 2000;Plun-Favreau, Elson et al., 2001;Senaldi, Stolina et al., 2002;Senaldi, Varnum et al., 1999;Shi, Wang et al., 1999;Uemura, Takizawa et al., 2002). The most recently identified member of this family, neuropoietin, has been lost during simian evolution: the human gene is inactivated by a deletion leading to a frame shift (Derouet, Rousseau et al., 2004).

CNTFR plays a pivotal role in the nervous system development, as indicated by the phenotype of CNTFR $\alpha^{-/-}$ mice (DeChiara, Vejsada et al., 1995). The protective properties of CNTF for neurons and oligodendocytes have been extensively documented (Sleeman, Anderson et al., 2000) and the hCNTF derivative Axokine™ has been tested in preclinical models and in clinical trials for the treatment of neurodegenerative diseases and is currently evaluated as drug candidate for obesity and obesity linked-type II diabetes (Aebischer, Schluep et al., 1996;Anderson, Panayotatos et al., 1996;Emerich, Winn et al., 1997;Ettinger, Littlejohn et al., 2003;Miller, Bryan et al., 1996;Miller, Petajan et al., 1996;Mittoux, Joseph et al., 2000;Penn, Kroin et al., 1997).

To facilitate the detection and quantification of CNTFR by flow cytometry, we generated a derivative of mCNTF tagged with an optimized BirA biotin ligase substrate (AviTag), which is biotinylated at a single residue (Beckett, Kovaleva et al., 1999;Cull and Schatz, 2000). The modified mCNTF could be produced and biotinylated conveniently using the common pET/*E. coli* BL21 (DE3) expression system (Studier, Rosenberg et al., 1990). Soluble active mCNTF can be produced in *E. coli* (Cognet, Guilhot et al., 2004;Lin, Mismar et al., 1989;McDonald, Ko et al., 1991;Stockli, Lottspeich et al., 1989) and CNTF could therefore be isolated and purified by IMAC under non-denaturing conditions. The biological activity of the biotinylated mCNTF was almost undistinguishable from non-biotinylated mCNTF.

The biotinylated cytokine was validated for the detection of CNTFR α by flow cytometry using transfectants expressing human and mouse CNTFR and human CNTFR expressing cell lines. The protocol used for the detection of biotinylated CNTF bound on CNTFR was very simple, with APC-streptavidin as detection reagent.

Both human and rat CNTF have been shown to be able to bind to cytokine receptors not comprising the CNTFR α . Human CNTF activates tripartite receptors in which the membrane IL-6R α substitute for CNTFR α (i.e comprising IL-6R α , LIFR β and gp130) (Schuster, Kovaleva et al., 2003). This property of CNTF is specific for the human cytokine. It has been mapped to Gln-63 (Schuster, Kovaleva et al., 2003), which is replaced by an arginine in rat and mouse CNTF (Saotome, Winter et al., 1995; Stockli, Lottspeich et al., 1989). Therefore our derivative can not bind IL-6R α . Rat CNTF stimulates cells expressing only LIFR β and gp130 (Gearing, Ziegler et al., 1994). As rat and mouse CNTF are closely related, we tested in previous studies if mCNTF could stimulate cell expressing only LIFR β and gp130 (Cognet, Guilhot et al., 2004). No activation was detected (Cognet, Guilhot et al., 2004). Accordingly, no binding of biotinylated mCNTF on Ba/F3 cells expressing LIFR β and gp130 (Fig. 3) or on a cell line expressing these two chains (the glioblastoma cell line T98G, data not shown) was observed. The biotinylated mCNTF is therefore likely to be a flow cytometry reagent strictly specific for cells expressing CNTFR α , useful to further study CNTFR α expression by CNTF responsive cells. It should facilitate the study of CNTFR α expression during cell differentiation (such as oligodendrocyte) (Stankoff, Aigrot et al., 2002), during the progression of neurodegenerative diseases, obesity or aging and in mouse models in which CNTF is protective (Gloaguen, Costa et al., 1997; Lambert, Anderson et al., 2001; Linker, Maurer et al., 2002; Mitsumoto, Ikeda et al., 1994; Sendtner, Schmalbruch et al., 1992). This should help the preclinical validation of the CNTFR ligands family (CNTF, CLC and neuropoietin), avoiding secondary effects linked to receptor expression by non-targeted cells. The use of the

biotinylated cytokine for fluorescence activated cell sorting or the magnetic isolation of CNTFR expressing cells was also successfully tested (data not shown).

Whereas this study was restricted to the validation of biotinylated mCNTF for flow cytometry, the labelled cytokine has numerous other potential applications. Molecules coupled to antibodies directed against the transferrin receptor have been shown to be transported through the blood-brain barrier and biotin-streptavidin bridges have been used for such coupling (Qian, Li et al., 2002). Biotinylated mCNTF could therefore easily be modified to generate derivatives transported to the brain, which could be more efficient in neurodegenerative or neuroinflammatory diseases rodent models.

The AviTag modified mCNTF can also be biotinylated efficiently *in vitro* using commercially available recombinant biotin ligase (data not shown). Use of [³H]-biotin in the enzymatic reaction should allow the production of radiolabelled mCNTF. This, as well as the availability of biotinylated derivatives of mCNTF which can be isolated from fluids or lysates by chromatography with a very high affinity and detected by Western blot with high sensitivity (Wilchek and Bayer, 1990) should facilitate the evaluation of the bioavailability of the cytokine.

Labelled cytokines are extensively used for flow cytometric detection of receptors (Collins, 2000; Zola, Flego et al., 1992). The enzymatic labelling of tagged cytokines (Beckett, Kovaleva et al., 1999; Cull and Schatz, 2000) used here with CNTF represents an alternative and complementary method to chemical coupling of biotin, haptens or fluorescent molecules.

Acknowledgements

We are grateful to Dr K.J Kallen (Christian Albrechts Universität zu Kiel, Germany) for the kindly providing the stably transfected BaF/3 cells.

Financial support: this work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and the Multiple Sclerosis Scientific Research Foundation. J.F.G. is a Canada Research Chair recipient.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Production and purification of biotinylated mCNTF. *E.coli* BL21 (DE3) Star were transformed with the pACYC184 plasmid expressing the Bira biotin ligase (panel A). These bacteria were co-transformed either with a pET plasmid containing the mCNTF cDNA (pETmCNTFAviTag, panel B, lanes 2-4, 6-8) or an empty pETAviTagMycHis (panel B, lanes 1 and 5). Expression of the Bira biotin ligase and the mCNTF was induced by IPTG (panel B, lanes 1, 3-5, 7, 8) and the biotinylation was made possible by the addition of biotin in the culture medium (panel B, lanes 1-2, 4-6, 8). The expression of recombinant mCNTF expressed in *E.coli* BL21 (DE3) was analysed by Western blot using horseradish peroxidase-labelled streptavidin (panel B). The mCNTF in the soluble fraction was then purified by IMAC and analysed by SDS-PAGE (panels A and C). The biotinylated cytokine was further purified by affinity chromatography on monomeric avidin and analysed by SDS-PAGE (panels A and C) and Western blot (panel D). Lane C+: biotinylated IgG (50 ng) included as WB positive control. Lanes S: Soluble fraction. Lanes FT: Flow trough. Lanes W: Washes. Lanes P: IMAC purified mCNTF. Lanes M: molecular weight marker in kDa.

A Biotinylation *in vivo* with BirA biotin ligase Immobilized metal-ion affinity chromatography Affinity chromatography on monomeric avidin

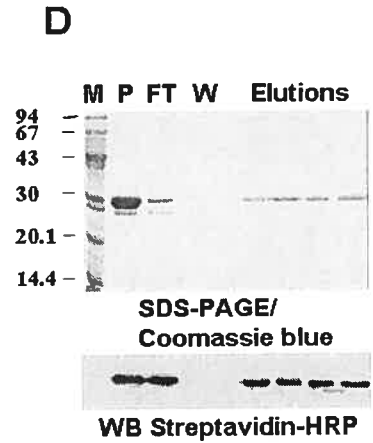
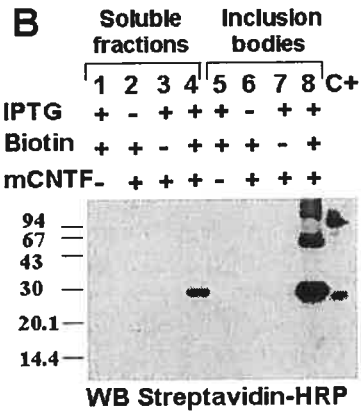
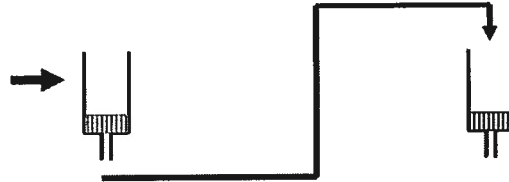
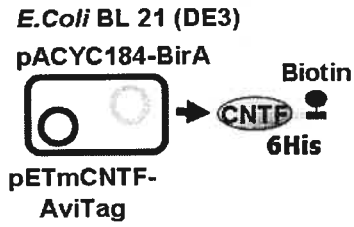


Fig. 2. mCNTF induces the proliferation of Ba/F3 cells transfected with hgp130, hLIFR and hCNTFR α . Ba/F3 cells were cultured in the presence of serial dilutions of the indicated cytokine. Proliferation was measured by [3 H] thymidine incorporation and experiments were performed in triplicate. Errors bars represent the standard errors of mean.

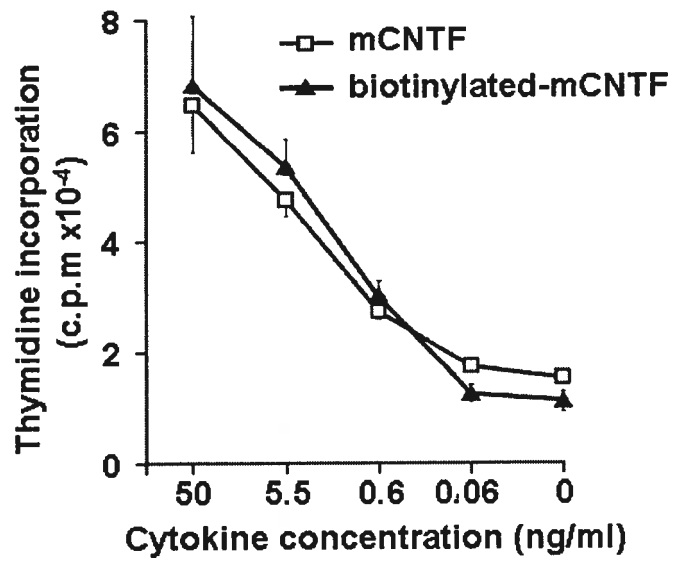


Fig. 3. The binding of biotinylated mCNTF can be detected by flow cytometry on Ba/F3 cells expressing the human tripartite receptor CNTFR. Ba/F3 cells were incubated with biotinylated mCNTF in the presence (bold line) or absence (dotted line) of a hundred times excess of mCNTF. The binding was then revealed with streptavidin-APC. Thin line indicates the background binding of streptavidin-APC alone. The filled histogram shows the binding of biotinylated mCNTF on Ba/F3 cells transfected with the two signalling subunits LIFR β and gp130 only.

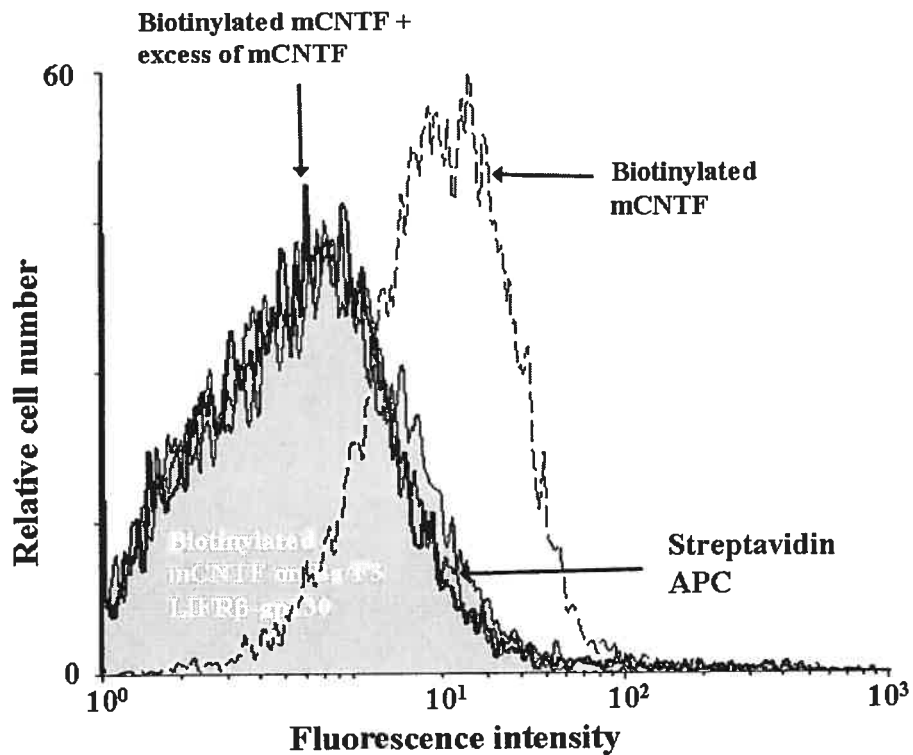


Fig.4. The biotinylated mCNTF allow the detection of Flp-inTM 293 transfectants expressing the mouse CNTFR α by flow cytometry. Transfectants expressing the mouse CNTFR α were incubated with biotinylated mCNTF in the presence (bold line) or absence (dotted line) of a hundred times excess of mCNTF (panel A) or mIL-4 (Panel B). The binding was then revealed with streptavidin-APC. Thin line indicates the background binding of streptavidin-APC alone. The filled histogram shows the binding of biotinylated mCNTF on Flp-inTM 293 transfected with empty vector.

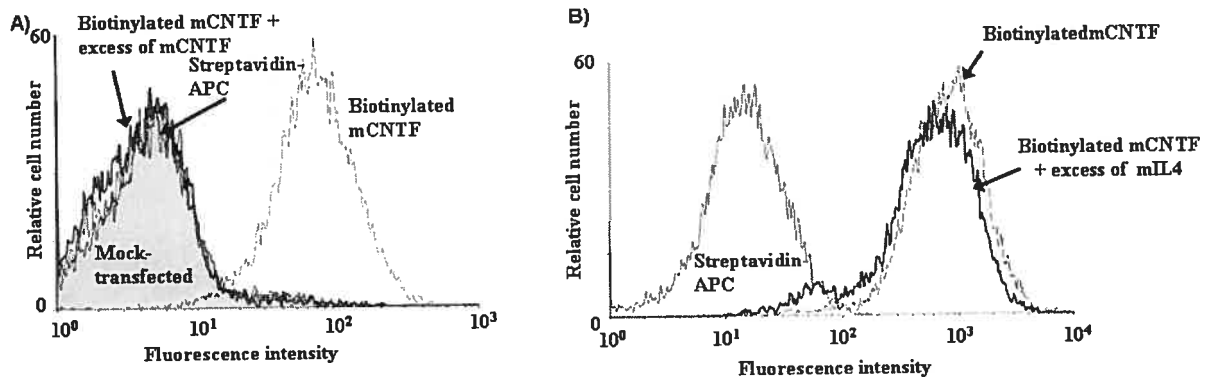
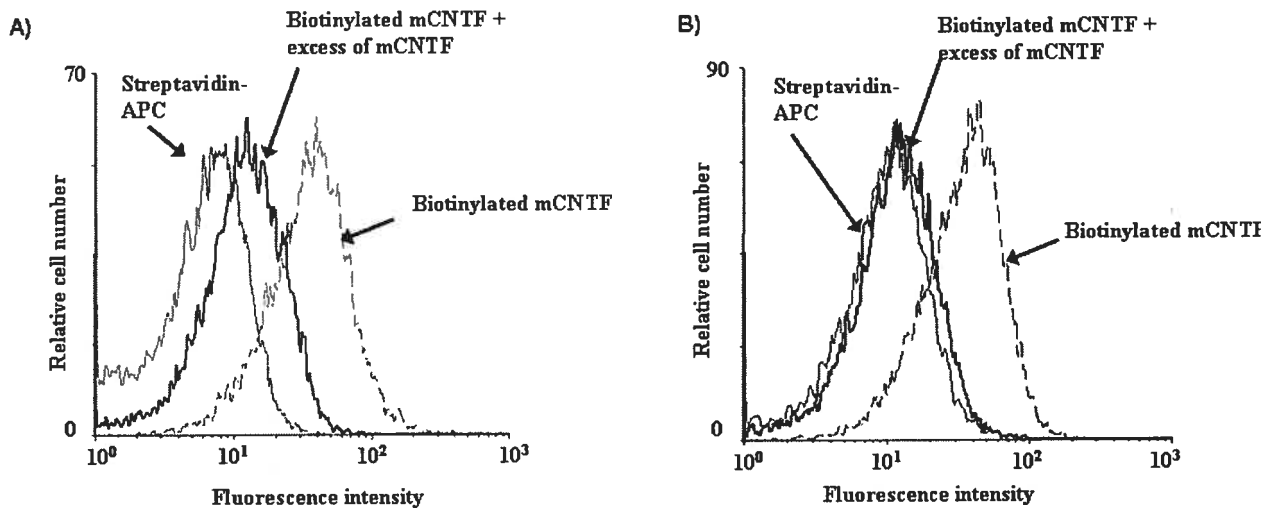


Fig.5. The biotinylated mCNTF can be used to detect the expression of mouse CNTFR α by flow cytometry on the neuroblastoma NGP (panel A) and the liver cell line HepG2 (panel B). These cell lines were incubated with mCNTF in the presence (bold line) or absence (dotted line) of a hundred times excess of mCNTF. The binding was then revealed with streptavidin-APC. Thin line indicates the background binding of streptavidin-APC alone.



Reference

- Aebischer P, Schlupe M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat. Med.*, 1996; 2: 696-9.
- Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996; 93: 7346-51.
- Beckett D, Kovaleva E, Schatz PJ. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.*, 1999; 8: 921-9.
- Bravo J, Heath JK. Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J.*, 2000; 19: 2399-411.
- Burger R, Bakker F, Guenther A, Baum W, Schmidt-Arras D, Hideshima T, Tai YT, Shringarpure R, Catley L, Senaldi G, Gramatzki M, Anderson KC. Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival. *Br J Haematol*, 2003; -78.
- Cognet I, de Coignac AB, Magistrelli G, Jeannin P, Aubry JP, Maisnier-Patin K, Caron G, Chevalier S, Humbert F, Nguyen T, Beck A, Velin D, Delneste Y, Malissard M, Gauchat JF. Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of *Escherichia coli* BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. *J. Immunol. Methods*, 2003; 272: 199-210.
- Cognet I, Guilhot F, Chevalier S, Guay-Giroux A, Bert A, Elson GC, Gascan H, Gauchat JF. Expression of biologically active mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) and soluble CNTFRalpha in *Escherichia coli* and characterization of their functional specificities. *Eur Cytokine Netw*, 2004; -62.

Cognet I, Guilhot F, Gabriac M, Chevalier S, Chouikh Y, Herman-Bert A, Guay-Giroux A, Corneau S, Magistrelli G, Elson GC, Gascan H, Gauchat JF. 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*, 2005; -2.

Collins DP. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. *J. Immunol. Methods*, 2000; 243: 125-45.

Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stuber D, Henco K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol. Biol.*, 1994; 31: 371-87.

Cull MG, Schatz PJ. Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags. *Methods Enzymol.*, 2000; 326: 430-40.

DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip NY, Yancopoulos GD. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell*, 1995; 83: 313-22.

Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F, Perret D, Diveu C, Guillet C, Preisser L, Dumont A, Barbado M, Morel A, Delapeyriere O, Gascan H, Chevalier S. Neuropeitin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; -32.

Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*, 2000; -72.

Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P, Baetge EE, Kordower JH. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature*, 1997; 386: 395-9.

Ettinger MP, Littlejohn TW, Schwartz SL, Weiss SR, McIlwain HH, Heymsfield SB, Bray GA, Roberts WG, Heyman ER, Stambler N, Heshka S, Vicary C, Guler HP. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA*, 2003; 289: 1826-32.

Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.*, 1985; 5: 3610-6.

Gearing DP, Ziegler SF, Comeau MR, Friend D, Thoma B, Cosman D, Park L, Mosley B. Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994; 91: 1119-23.

Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R, Paonessa G, Chen F, Rosenblum CI, Van der Ploeg LH, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997; 94: 6456-61.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990; 96: 23-8.

Kallen KJ, Grotzinger J, Lelievre E, Vollmer P, Aasland D, Renne C, Mullberg J, Myer zum Buschenfelde KH, Gascan H, Rose-John S. 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.*, 1999; 274: 11859-67.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.*, 2003; 149: 1-38.

Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hajarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001; 98: 4652-7.

Lelievre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, Froger J, Guillet C, Elson GC, Gauchat JF, Gascan H. 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*, 2001; -84.

Lin LF, Mismar D, Lile JD, Armes LG, Butler ET, III, Vannice JL, Collins F. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science*, 1989; 246: 1023-5.

Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med*, 2002; -4.

McDonald JR, Ko C, Mismar D, Smith DJ, Collins F. Expression and characterization of recombinant human ciliary neurotrophic factor from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991; 1090: 70-80.

McDonald NQ, Panayotatos N, Hendrickson WA. Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *EMBO J.*, 1995; 14: 2689-99.

Miller RG, Bryan WW, Dietz MA, Munsat TL, Petajan JH, Smith SA, Goodpasture JC. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 1996; 47: 1329-31.

Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, Hoagland RJ, Parry GJ, Ross MA, Stromatt SC. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann. Neurol.*, 1996; 39: 256-60.

Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science*, 1994; 265: 1107-10.

Mittoux V, Joseph JM, Conde F, Palfi S, Dautry C, Poyot T, Bloch J, Deglon N, Ouary S, Nimchinsky EA, Brouillet E, Hof PR, Peschanski M, Aebischer P, Hantraye P. Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum. Gene Ther.*, 2000; 11: 1177-87.

Panayotatos N, Radziejewska E, Acheson A, Pearsall D, Thadani A, Wong V. Exchange of a single amino acid interconverts the specific activity and gel mobility of human and rat ciliary neurotrophic factors. *J. Biol Chem.*, 1993; 268: 19000-3.

Penn RD, Kroin JS, York MM, Cedarbaum JM. Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery*, 1997; 40: 94-9.

Plun-Favreau H, Elson G, Chabbert M, Froger J, Delapeyriere O, Lelievre E, Guillet C, Hermann J, Gauchat JF, Gascan H, Chevalier S. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J*, 2001; -703.

Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.*, 2002; 54: 561-87.

Saotome Y, Winter CG, Hirsh D. A widely expressed novel C2H2 zinc-finger protein with multiple consensus phosphorylation sites is conserved in mouse and man. *Gene*, 1995; 152: 233-8.

Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grotzinger J, Rose-John S, Kallen KJ. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 9528-35.

Senaldi G, Stolina M, Guo J, Faggioni R, McCabe S, Kaufman SA, Van G, Xu W, Fletcher FA, Boone T, Chang MS, Sarmiento U, Cattley RC. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol*, 2002; -8.

Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, Simonet WS, Boone T, Chang MS. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96: 11458-63.

Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature*, 1992; 358: 502-4.

Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, Ruben S, Alderson RF. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; -8.

Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm. Acta Helv.*, 2000; 74: 265-72.

Stankoff B, Aigrot MS, Noel F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 9221-7.

Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R, Lindholm D, Thoenen H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature*, 1989; 342: 920-3.

Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 1990; 185: 60-89.

Uemura A, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Nakashima K, Taga T. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine*, 2002; -7.

Wilchek M, Bayer EA. Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol.*, 1990; 184: 5-13.

Zola H, Flego L, Sheldon A. Detection of cytokine receptors by high-sensitivity immunofluorescence/flow cytometry. *Immunobiology*, 1992; 185: 350-65.

Article 4 : Epstein-Barr virus induced gene 3 (EBI3) and cardiotrophin-like cytokine form a composite cytokine*

Publication envisagée : The Journal of Biological Chemistry.

Isabelle Cognet[§], Alexandra Bert[§], François Rousseau[¶], Florence Guilhot[§], Catherine Guillet[¶], Marie-Ève Poupart[§], Lydie Canier[§], Sandrine Crabe[§], Greg C.A. Elson[‡], Sylvie Chevalier[¶], Hugues Gascan[¶], and Jean-François Gauchat^{§#}

From the §Département of Pharmacology, INSERM U743, Université de Montréal, Montreal, Canada, the ¶INSERM U564, CHU Angers, Angers, France and ‡NovImmune, Geneva, Switzerland.

Running title : CLC and EBI3 form a secreted complex

To whom correspondence should be addressed: Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, C.P 6128, succursale Centre-ville, Montréal QC H3C 3J7, Canada. Fax : + 514 343 2291. E-mail :

The abbreviations used are: APC, allophycocyanin; CISS, cold induced sweating syndrome; CLC, Cardiotrophin-like cytokine; CLF, cytokine-like factor-1; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CNTFR, CNTF receptor; CNTFR α , CNTF receptor alpha chain; CT-1, cardiotrophin-1; Cy, Cytochrome; DC, dendritic cells; EBI3, Epstein Barr virus induced gene 3; EBV, Epstein-Barr virus; FITC, fluorescein isothiocyanate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; gp, glycoprotein; IL, interleukin; iNKT, invariant natural killer T cells; IP, immunoprecipitation; IRES, internal ribosome entry site; LIF, leukemia

inhibitory factor; LIFR β , LIF receptor β ; NP; neuropoietin ; OSM, oncostatin M; PE, phycoerythrin; ProtC, protein C epitope; sc : single chain; STATs, signal transducer and activator of transcription; WB, Western blot.

* This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (MOP-57832). F.G was supported by a grant from the International Council for Canadian Studies. J.F.G. is a Canada Research Chair recipient.

Abstract

Cardiotrophin-like cytokine (CLC)/cytokine-like factor 1 (CLF) is a composite cytokine built on the structural model of IL-12 with a complex formed by a four helix bundle type I cytokine. CLC (also named B cell stimulating factor-3, novel neurotrophin-1 and CLCF1) bound to a soluble receptor CLF (also referred to as NR6 or CRLF1). CLC/CLF acts on the ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor (CNTFR) composed of the CNTFR alpha chain (CNTFR α) and two signal transducing subunits gp130 and LIFR β (leukemia inhibitory factor receptor β) and therefore exhibits CNTF-like neurotrophic activities. Unlike CLF, CLC is strongly expressed in the immune system and has been reported to have B cell stimulating activities, suggesting that it could be involved in an alternative composite cytokine specific for immune cells. The Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) is a soluble receptor analogous to CLF expressed in immunocompetent cells. EBI3 has been shown to associate with two different subunits p35 and p28 and multiple immunoregulatory functions have been identified for one of these composite cytokines, IL-27 (p28/EBI3). Sequence comparison of CLC and p28 indicated a close similarity in the site I, predicted to be involved in p28-EBI3 binding. We therefore tested if CLC and EBI3 could associate. We observed that CLC and EBI3 could form complexes when co-expressed in transfectants. Association enhanced the release of both proteins. We compared the pattern of CLC and EBI3 mRNA expression and observed that they are co-expressed in secondary immune organs and

in immunocompetent cell subpopulations. Using a strategy similar to the one reported previously to study the functions of the composite cytokine IL-27 (p28/EBI3), we stabilized the complex with a linker for CLC/EBI3 expression and purification. We observed that this EBI3-CLC fusion protein (scEBI3-CLC) binds specifically LPS activated mouse B cell and promote their proliferation, indicating that this composite cytokine could contribute to the B cell stimulatory functions of CLC.

Keywords: cardiotrophin-like cytokine, Epstein-Barr virus induced gene 3, neurotrophic factor, interleukin-27.

INTRODUCTION

The cytokine CLC (1;2) belongs to the IL-6 family (3-5) comprising 8 other described members: IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF) (6-8), cardiotrophin-1 (CT-1), neuropoietin (NP) (9) and IL-27 (10). This cytokine family share a four-helix bundle structure and signals via receptors comprising the subunit gp130 (3-5). CLC binds and activates the CNTF receptor composed, besides gp130, of CNTFR α and LIFR β (11;12). Whereas CLC possesses a peptide signal, it is inefficiently secreted (12). To be released, CLC requires co-expression with the soluble cytokine receptor CLF, with which it forms a stable complex (12). This complex involves CLC site III, a site also known to recruit the LIFR β chain of the receptor (13). Alternatively, CLC can form a secreted complex with soluble forms of CNTFR α (14). Unlike CLC/CLF, the CLC/CNTFR α complex involves CLC site I (13). That the CLC/CLF complex is functionally important in man is indicated by the similarity of phenotypes observed in patients suffering from cold induced sweating syndrome (CISS) due to mutations in CLF or CLC (15-17).

The capacity of CLC/CLF to activates CNTFR, a receptor mainly expressed by neural tissues and skeletal muscle (18;19), points to neurotrophic and myotrophic functions, roles supported by the activities of the cytokine *in vitro*, the phenotypes of CLF^{-/-} mice and of the patients with mutations inactivating CLC or CLF (1;12;15;16;20-25). A role for CLC in the circadian control of locomotor function was also recently demonstrated (26).

CLC was cloned from T cells and shown to be strongly expressed in the immune system (1;2). Activities on B-cells *in vitro* and *in vivo* have been reported (1;27). As most immune cells does not appear to express either CLF or CNTFR α (18;24;28), we examined if CLC could form an alternative complex with another soluble receptor expressed by these cells. Sequence comparison and structure predictions, indicated that CLC shared critical site I residues with the p28 subunit of the composite cytokine IL-27. IL-27 is a complex formed by p28 and the soluble cytokine receptor EBI3 (10). EBI3 was identified as a gene induced in B cells by Epstein-Barr virus (EBV) infection, expressed in tonsils, spleen and placenta (29). Besides p28, EBI3 can also form a complex with the p35 subunit of the IL12 but no physiological activities have been reported for p35/EBI3 yet (30). It was proposed that EBI3 might be involved in other composite cytokines (31). EBI3 is homologous to CLF and CNTFR α (30% identity). In IL-27, EBI3 is not only involved in the secretion of p28 but also required for the activation of the receptor composed of WSX-1 and gp130 (32-34). IL-27 has many different functions on the development of an immune response: notably, it was shown to induce proliferation and interferon- γ production of activated naïve CD4⁺ T cells, to modulate immunoglobulin class switching in B cells and production of IFN- γ by activated NK cells (35-40). Inactivation of the genes coding for WSX-1 or EBI-3 has been used to gain information on the roles of IL-27 *in vivo* (41-48). Observations with WSX^{-/-} mice indicate that IL-27 has an important role in limiting the intensity and duration of both adaptive (either Th1 or Th2) and innate immune response during infection. This mechanism seems important in the control of inflammation and development of auto-

immune inflammatory disorders. (41-46). The role of IL-27 in the control of Th1 and Th2 functions *in vivo* is further supported by studies of EBI3^{-/-} mice, which also indicate a role on the control of invariant natural killer T cells (iNKT) functions (47;48). Recently new insight in the multiple roles of IL-27 has been gained by demonstrating that IL-27 can repress the development of IL-17-producing effector T cells (Th-17) (49;50).

In this report, we show that CLC can, like p28 form a secreted complex with EBI3. Whereas this complex retains CLC/CLF neurotrophic properties, it comprises also activities on immune cells: in line with those previously demonstrated using bacterial recombinant CLC and CLC transgenic mice (1;27), suggesting that this complex could contribute to the immune functions of CLC.

MATERIALS AND METHODS

Sequence alignment and molecular modelling-The secondary structure of human CLC (NP_037378.1), mouse CLC (NP_064336), human IL-27p28 (NP_663634) and mouse IL-27 (NP_663611) were predicted with the predict protein server (<http://cubic.bioc.columbia.edu/pp/>). The multiple sequence alignment was obtained using the program T-COFFEE (51). Manual adjustment of this alignment was done by carefully aligning the secondary structural elements.

CLC and IL-27p28 were modeled by using MODELLER (52). Structural coordinates of human CNTF [Protein DataBank (PDB) entry 1CNT] and LIF (PDB entry 1PVH) were selected as molecular templates for the modeling of CLC and IL-27p28; the coordinates of an additional α -helix predicted in the AB loop were computed with the Biopolymer module of INSIGHT II (Accelrys, San Diego, CA) and integrated during the structure-calculation process. All of the models were energy minimized and quality-verified by using the programs VERIFY_3D (53) and PROCHECK (54).

Plasmid construction-The plasmids pcDNA5 mCLCprotC and pETmCLC have been described elsewhere (55).

For stable expression of a derivative of mouse EBI3 tagged at the carboxy end with a c-myc epitope and six histidines, the full length EBI3 cDNA in the vector pCMV-SPORT 6 (IRAVp968C0116D; RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin, Germany) was first modified in 5' by cloning the sequence CGAGCTCGCCACCATGGCCGCGGTGTCCAAGCTGCTGTTCC between the *EcoRI* and *SapI* restriction site of the vector and the cDNA, respectively. The cDNA was further modified in 3' by cloning the synthetic DNA fragment CTGGAGCCTCCCTGGGCAAGTAGAAAGCGCTCCCCATAAGCCCGAGTAC ATGCCCATGGAGTAGGATCCCCCT between the cDNA and vector *BstXI* restriction sites, leading to a derivative named pCMVmEBI3GluGlu. To introduce a sequence coding for the c-myc and six his tags, pCMVmEBI3GluGlu was digested by *AvaI* and ligated to the phosphorylated, annealed oligonucleotides CCGAAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGCACCACCACCA CCACTGA (Tag-myc-his 1) and TCGATCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTT TGTCT (Tag-myc-his 2). The resulting plasmid (pCMVmEBI3c-myc) was checked by DNA sequencing using an ABI-PRISM 3100 AVANT genetic analyser (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada). The modified EBI3 cDNA was re-cloned in the vector pcDNA5/FRT (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) using the restriction enzymes *ApaI* and *KpnI*. The insert of the resulting plasmid, named pcDNAmEBI3c-myc was fully sequenced using an ABI-PRISM 3100 AVANT genetic analyser (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada).

To generate a bicistronic vector encoding for mCLC and mEBI3, the CLF cDNA of the bicistronic expression vector pcDNA5mCLCprotCAvitagmCLF (55) was replaced by the modified mouse EBI3 cDNA using the restriction sites *SacII* and *BamHI*. To introduce the sequence coding for the c-myc epitope tag, this construct was digested with the restriction enzyme *AvaI* and ligated to the phosphorylated and annealed oligonucleotides Tag-myc-his 1 and Tag-myc-his 2. The insert of the resulting plasmid (pcDNA5mCLCprotCIRESSEBI3c-myc) was fully sequenced.

To generate a control pcDNA5 derivative encoding for the green fluorescent protein (GFP), the 816 bp *NheI-NotI* restriction fragment coding for EGFP of the plasmid pEBS-EGFP (56) was re-cloned in pcDNA5-FRT.

For the expression of a single chain (sc) mouse EBI3-CLC fusion, the polylinker of pcDNA5/FRT was first modified by introducing the annealed oligonucleotides

CTAGGGTACCATTCCCGAGGGATCCTATATAAAGCTTGCTAGCTTAACCG
GTCand

TCGACGACCGGTTAAGCTAGCAAGCTTTATATAGGATCCCTCGGGAATGG
TACC between the restriction sites *NheI* and *XhoI*. The 716 bp *KpnI-AvaI* restriction fragment of pCMVmEBI3GluGlu was introduced between the corresponding sites of

the modified pcDNA5/FRT. A synthetic DNA fragment coding for a flexible linker (57) generated by annealing the oligonucleotides
GATCCGGCGGAGGCGGGAGCGGGCGGGGGCGGAAGCGGAGGCGGGGGAA
GCA and

AGCTTGCTTCCCCCGCCTCCGCTTCCGCCCCCGCCGCTCCCGCCTCCGCCG

was then inserted between the *BamHI* and *HindIII* restrictions sites of the pcDNA5/FRT derivative. A 711 bp *NheI-AgeI* restriction fragment of the plasmid pETmCLC (55) coding for a mature form of mouse CLC cDNA was ligated with the

2007 bp *NheI-XmnI* and 3767bp *AgeI-XmnI* fragments of this derivative. The plasmid resulting from the triple ligation was then digested with the restriction enzymes *NsiI* and *PmeI* and ligated with the annealed oligonucleotides

AGAAGATCAGGTAGATCCACGGTTAATCGATGGTAAGTGA and
TCACTTACCATCGATTAACCGTGGATCTACCTGATCTTCTTGCA. The insert

of the resulting plasmid, named pcDNA5sc mEBI3-CLC was fully sequenced. It encodes for a fusion protein of mouse EBI3 and CLC connected with the SGGGSGGGSGGGGS linker (57) and tagged in carboxy terminus with protein C and c-myc epitopes.

To generate a pcDNA5/FRT derivatives encoding mouse WSX-1, the cDNA (IMAGp998H233132; RZPD) was amplified by PCR with the primers

ACGCTAGCCACCATGAACCGGCTCCGGGTT and
CGCTCGAGATCAGACTAGAAGGCCAG and cloned in pcDNA5/FRT using the
restriction enzymes *NheI* and *XhoI*. The insert was fully sequenced to exclude PCR
introduced mutations

CLC site directed mutagenesis-The plasmid pcDNA5mCLCprotCIRESEBI3c-myc
was subjected to site directed mutagenesis using a QuickChange™ Multiple Site-
Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's
instructions. The insert of the plasmid containing the mutated CLC cDNA was fully
sequenced.

Isolation of splenocytes sub-populations-Spleens isolated from 6-8 weeks female
C57BL/6 mice were disrupted by mechanical dislocation between two microscope
slides and filtered. Mononuclear cells were isolated by density gradient
centrifugation on Histopaque® (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Cells were
stained with Phycoerythrin (PE)-Cytochrome 5 (Cy5) labelled anti-B220, fluorescein
iothiocyanate (FITC)-labelled anti-Thy1-FITC, anti-CD11c-PE, allophycocyanin
(APC)-labelled anti-CD11b and single positive cells were isolated by flow cytometry
using a FACS Vantage™ cell sorter (BD Biosciences Mississauga, Ontario, Canada).
Labelled antibodies were purchased from BD Biosciences. Sorted cells were then
used for RNA extraction and RT-PCR.

RNA extraction and RT-PCR-Total RNA was isolated using Trizol™ (Invitrogen).
Random hexanucleotide-primed cDNA was synthesized with Superscript II
(Invitrogen) using 5 µg RNA aliquots as template, following manufacturer's
instructions. The cDNA was subjected to 30 cycles of PCR with primers specific for
mouse CNTFR α , CLC, CLF, EB13 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
(GAPDH; Table I). PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis and
ethidium bromide staining.

Cell culture and transfection-cDNAs re-cloned in pcDNA5/FRT were co-transfected with the Flp recombinase coding plasmid pOG44 (Invitrogen) in the Flp-InTM-293 cell line (Invitrogen) using Lipofectamine (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Transfected clones were selected using hygromycin (100 µg/ml) and individual clones were further characterised by immunoprecipitation and Western Blot analysis.

Protein purification-For the production of the CLC/EBI3 complex or scEBI3-CLC fusion protein, transfectants cells were expanded in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin and hygromycin (100 µg/ml) to confluence. Confluent cells were maintained for one week in DMEM supplemented with 1% FCS. Cell culture supernatants were pooled. Batches of supernatants (3L) were concentrated on centrifugal filtration units (Centricon-Plus-80, Millipore, Bedford, MA, USA) and the recombinant protein purified by affinity chromatography using a 0.5 ml anti-protein C agarose column (Roche Applied Sciences, Laval, QC, Canada).

Immunoprecipitations and Western Blotting-For the immunoprecipitation assays, pcDNA5mCLCprotC, pcDNA5mEBI3c-myc, pcDNA5mCLCprotCIRESEBI3c-myc, pcDNA5mCLCA60EprotCIRESEBI3c-myc or pcDNA5GFP transfectants were grown in 175 cm² culture flask (Sartsted, Montreal, QC, Canada) until reaching approximately 90% confluence. Cells were then maintained for 3 days in Opti-MEM I medium (Invitrogen) supplemented with 2mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin. Supernatants were cleared from cellular debris by centrifugation and concentrated 60 times on centrifugal filtration units before use. Cells were lysed by sonication in 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 1X complete EDTA free (Roche Applied Sciences, Laval, QC, Canada), incubated 1h at 4°C under agitation and centrifuged 10 min at 21 000 g

at 4°C to remove insoluble elements. Supernatants and cell lysates were then incubated overnight at 4°C under agitation with 20 µl anti-protein C agarose or anti-c-myc agarose (Sigma). All buffers used with anti-protein C were supplemented with 1 mM CaCl₂. Beads were washed successively with 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1M NaCl and 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1% NP40. Proteins eluted by boiling the beads in Tris-Glycine-SDS sample buffer under reducing conditions were analysed by Western blot using HRP-labelled anti-protein C (HPC4; Roche), anti-c-myc (Roche), or a monoclonal mouse Ig anti-α tubuline (Sigma) and anti-mouse HRP (Medicorp, Montreal, QC, Canada). Signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Pierce, Biolynx, ON, Canada).

Proliferation assay-Ba/FIII (Ba/F3 cells transfected with the tripartite CNTFR i.e. hgp130, hLIFRβ and hCNTFRα) or Ba/FII [Ba/F3 cells transfected with the two CNTFR transducing signalling subunits gp130 and LIFRβ (A kind gift from Dr. K. J. Kallen, Christian Albrechts Universität zu Kiel, Germany)] (58) were maintained as described (12) The cells (5.10³ 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. [³H] thymidine (0.5 µCi; Perkin Elmer, ON, Canada) was added for 6h and the incorporated radioactivity measured by scintillation counting. Mouse CNTF and CLC/CLF were purified as described elsewhere (Cognet, 2004 5 /id;Cognet, 2005 1 /id) and used as controls for the proliferation assay.

Spleens were isolated from female C57BL/6 mice (6-8 weeks). Spleens were disrupted by mechanical dislocation between two microscope slides. Cells were filtered and mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation on Histopaque®. B cells were purified from spleen using anti-B220 magnetic Microbeads (Miltenyl Biotech Inc. Auburn, CA, USA). The purity was checked by FACS analysis using FITC-labeled anti-mouse B220 mAb (Becton Dickinson). Mouse B cells were incubated in triplicates at 10⁴ cells/well in a 96 wells plate with

scEBI3-CLC fusion protein and either LPS (20 ng/ml, Sigma), CD40L (5µg/ml, home made) or IgM (1 to 10µg/ml, Jackson ImmunoResearch, Mediacorp, Montreal, QC, Canada) for 5 days in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. [³H] thymidine (0.5 µCi) was added for 6h and the incorporated radioactivity measured by scintillation counting.

Binding assays-Ba/FIII, Ba/FII or mWSX-1 expressing Flp-inTM-293 cells were incubated for 1 h on ice with concentrated supernatants from cells expressing either CLC/EBI3 or scEBI3-CLC fusion protein. The binding was then revealed with mouse anti-ProtC (5µg/ml) and goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 633 (1/500, Molecular Probes, Invitrogen). Dead cells were excluded by propidium iodide staining (1µg/ml). Fluorescence was measured by flow cytometry using a FACSCaliburTM cytofluorometer (BD Biosciences).

Spleen, thymus and bone marrow were isolated from female C57BL/6 mice (6-8 weeks). Thymus and spleen were disrupted by mechanical dislocation between two microscope slides. Cells were filtered and mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation on Histopaque®. Unstimulated cells or cells activated with 10µg/ml LPS from *E. coli* isotype O55:B5 (Sigma) were incubated for 36h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin (all from Sigma) and 50 µM 2-mercaptoethanol. For the binding assay, cells were then incubated for 1 h on ice with scEBI3-CLC fusion protein. Bound composite cytokine was revealed with Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Invitrogen) labelled anti-Prot C HPC4 Ab (5 µg/ml) alone or in combination with FITC-labelled anti-B220 FITC (BD Biosciences). Dead cells were excluded by propidium iodide staining (1 µg/ml). Fluorescence was measured by flow cytometry using a FACSCaliburTM cytofluorometer.

Measurement of STAT 1 and 3 activations by FACS and Western Blot-Ba/FII or Ba/FIII cells were cultured overnight at 5x10⁶ cells per ml in unsupplemented RPMI

1640. Cells were then left unstimulated or activated 15 min at 37C° with CLC/EBI3, scEBI3-CLC fusion protein or CNTF at 150 ng/ml, and processed for FACS or Western Blot analysis.

For FACS analysis, cells were washed twice in ice-cold PBS and resuspended in PBS (final concentration: 5×10^6 cells per ml). Cells were fixed by adding 1 volume of cytofix (BD Bioscience) for 10 min at 37C°, centrifuged, resuspended in ice-cold Perm-III (1 ml per 10^6 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 anti-phospho-STAT1 (Y701) Alexa Fluor 647 or anti-phospho STAT3 (Y705) PE for 30 min at room temperature, washed and fluorescence was analysed by flow cytometry.

For Western Blot analysis, cells were resuspended in lyses buffer [50mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 40 mM β -glycerophosphate, 5 mM EDTA, 1% Triton supplemented with specific protease and phosphatase inhibitor (0.1mM PMSF, 1 μ M Pepstatin, 1 μ M Leupeptin and 1mM Vanadate)] and incubated 30 min at 4C°. Cellular lysates were cleared from cellular debris by centrifugation (21,000 g; 10 min). Protein content was measured using a bicinchroninic acid assay (BCA, Pierce) and 40 μ g total protein aliquots were analysed by Western blot with anti-STAT1, anti-STAT3, anti-phospho-STAT1 (Tyr701) and anti-Phospho-STAT3 (Tyr705) antibody (all from Cell signalling, Beverly, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Western blot signal was revealed with an HRP-conjugated anti-rabbit Ig (Biosource) and ECL.

RESULTS

Molecular modeling of CLC-EBI3 interaction-IL-27 is a composite cytokine constructed on the model of IL-12 (10;59). The p28 subunit of IL-27 and CLC have been shown to be evolutionary related (10). To determine if the site I of CLC had the potential to bind EBI3, we compared CLC and p28 using a structure based multiple

alignments (Fig. 1A). CLC binding site I is composed of residues of α D-helix and α A'-helix which is an additional α -helix located in the N-terminal part of the AB-loop. This site is centred on residues Trp⁶⁷, Arg¹⁷⁰ and Asp¹⁷⁴ (13). The sequence alignment shows that CLC and p28 share conserved residues in the AB loop and in the N-terminal part of their α D-helix (Fig. 1A). The amino acids Trp⁶⁷, Arg¹⁷⁰ and Asp¹⁷⁴ were identified as the "Hot spot" of interaction of CLC site I and their roles in the binding to CNTFR α demonstrated by mutagenesis (13). The alignment shows that these residues are all conserved or type conserved in p28 (Trp⁶⁹, Arg¹⁸⁸ and Glu¹⁹²). To confirm CLC-p28 site I analogy, we compared the molecular models of the two cytokines (Fig. 1B). The model of p28 indicates that the site I of CLC and p28 shares the same structural organization; notably the α A'-helix is also present in the AB loop of this cytokine (Fig. 1B).

CLC and EBI3 form a new composite cytokine-The molecular modelling predicts a possible interaction between CLC and EBI3 involving CLC site I. We tested this hypothesis using co-immunoprecipitation experiments. The human fibroblast cell line HEK-293 derivative Flp-InTM-293 was transfected with expression vectors coding for mouse CLC or EBI3. To allow CLC and EBI3 detection and isolation, the two proteins were tagged with either protein C or c-myc epitopes. For CLC and EBI3 co-expression, a bicistronic construct was generated by introducing an internal ribosome entry site (IRES) between the two cDNAs. The Flp-InTM/pcDNA5/FRT expression system was used for these experiments as transfectants with identical integration sites are generated by Flp recombinase catalysed exchanges between the pcDNA5/FRT plasmid derivatives and a stably integrated target in Flp-InTM-293 cells. A plasmid with green fluorescent protein (GFP) cDNA was used for negative control transfectants.

Expression of EBI3 and CLC was confirmed by Western blot analysis of transfectants lysates or cell culture medium using mAbs directed against their specific epitope tags (Fig 2B left panels). Unexpectedly, when expressed alone CLC

could be detected in cell culture medium (Fig. 2B). This indicates that, unlike human CLC (12) but like mouse p28 (10), mouse CLC can be released by transfected human cells in the absence of a soluble receptor partner. The interaction between mouse CLC and EBI3 was analysed by co-immunoprecipitation. (Fig. 2A). When CLC and EBI3 were co-expressed, both CLC and EBI3 could be isolated from the transfectants cell lysates or culture medium using mAbs directed against the tags of their respective candidate partners (Fig. 2B). Co-expression with EBI3 markedly increased the amount of CLC which could be detected in (Fig. 2C right panel) or immunoprecipitated from (Fig. 2C left panel) CLC cDNA transfectants. This suggests that interaction with EBI3 might stabilize CLC. As expected, no co-immunoprecipitation was detected when CLC and EBI3 were expressed alone or in control transfectants expressing GFP (Fig. 2B).

*A site I CLC mutation previously shown to prevent CNTFR α binding does not abolish the formation of the CLC/EBI3 complex-*The sequence alignment and the molecular modelling analyses predict that CLC and EBI3 interact via the site I of the cytokine (Fig. 1). To test this hypothesis, we generated a mutant of mouse CLC site I with a single amino-acid substitution at the position 60 (A60E). The A60E substitution has been shown to suppress the interaction between CLC and sCNTFR α (13) and this residue is type conserved in p28. Using the strategy described in the previous section, we generated a stable transfectant with a bicistronic construct coding for mouse EBI3 and the CLCA60E mutant. Western blot analysis indicates that this transfectant express both EBI3 and the mutated form of CLC (Fig. 2B). Unexpectedly, CLCA60E and EBI3 could be co-immunoprecipitated as efficiently as wild type CLC/EBI3 complex from the transfectant cell lysate or culture medium (Fig. 2B). These results indicate that the residues crucial for CLC binding to CNTFR α and EBI3 are not identical and points CLCA60E mutant as a tool to discriminate between the function of CLC linked to the ability of this cytokine to

form a complex with EBI3 and those related its capacity to bind and activate CNTFR.

CLC and EBI3 mRNA are co-expressed in secondary immune organs and in different subpopulations of the spleen-CLC can form a complex with EBI3 when co-expressed in transfectants. We therefore investigated if the mRNA encoding for these two proteins were expressed in the same organs by RT-PCR. As CLC was previously shown to form secreted complexes with CLF and CNTFR α (12;14), we also analysed the expression of these mRNA (Fig. 3A). The mRNA coding for CLC and EBI3 were expressed together in brain, thymus, spleen, lymph nodes, lung, intestine, uterus and testis (Fig. 3A). In spleen and lymph nodes, CLC and EBI3 mRNA were observed in the absence of detectable CLF mRNA expression. We further investigated the profile of expression of the mRNA coding for CLC and EBI3 in splenocytes subpopulations. Splenocytes were fractionated in B cells, T cells, dendritic cells (DC) and monocytes/macrophages by flow cytometry using mAbs directed against B220, CD11c, CD11b and Thy1. Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis for CLC, EBI3, CLF and CNTFR α expression (Fig. 3B). Interestingly, neither CLF nor CNTFR α mRNA could be detected in unfractionated splenocytes or any of the purified subpopulations (Fig. 3B), whereas both could readily be amplified from brain RNA, used as positive control (Fig. 3B). The semiquantitative RT-PCR results suggest that the level of EBI3 and CLC mRNA are higher in B cells than in other splenocyte subpopulation (Fig. 3B).

Binding properties of CLC/EBI3 and scEBI3-CLC fusion proteins-As CLC is a ligand for CNTFR (Elson, 2000), we analysed the binding capacity of CLC/EBI3 on Ba/FIII cells expressing this receptor. CLC/EBI3 efficiently binds to Ba/FIII cells (Fig. 4A) but no signal could be detected on Ba/F3 cells expressing only the two signalling subunits of CNTFR, LIFR β and gp130 (Ba/FII; Fig. 4A) included as control. The molecular model of CLC/EBI3 complex predicts an interaction through

the site I of CLC. This site is also involved in CNTFR α binding (13). We therefore analysed the effect of the stabilisation of the CLC/EBI3 complex through a synthetic linker, using the strategy used for the stabilisation of the p28/EBI3 complex in IL-27 (10). To avoid confusion with the complex generated by co-expression, the stabilised complex was named scEBI3-CLC. This fusion protein did not detectably bind to either Ba/FIII or Ba/FII cells (Fig. 4B and data not shown), suggesting that an exchange between EBI3 and CNTFR α is necessary for the binding of CLC to cells expressing the tripartite CNTFR.

IL-27 binds to WSX-1 and signals through a receptor comprising WSX-1 and gp130 (33). As CLC and p28 present sequence and structure similarities and EBI3 is known to be involved in the binding of the composite cytokine to its receptor, we analysed binding of CLC/EBI3 and scEBI3-CLC to HEK-293 stably transfected with mouse or human WSX-1. No binding could be detected (Fig. 5 and data not shown), indicating that IL-27 and CLC/EBI3 have different receptors.

CLC has been shown previously to have B-cell stimulating activities at high concentration *in vitro*, *in vivo* or in transgenic mice (1;27). In an attempt to identify cells expressing receptors specific for the CLC/EBI3 complex, we performed binding studies on immunocompetent cells. As stabilisation of the CLC/EBI3 complex with a linker prevents binding to CNTFR (Fig. 4A), we used scEBI3-CLC for these experiments to avoid any background with CNTFR. The use of scEBI3-CLC also excludes binding involving dissociated partners of the composite cytokine. No binding could be detected on resting thymocytes, bone marrow cells or splenocytes (Fig. 6 and data not shown). When cells were activated for 36 hours with LPS, a specific binding was reproducibly detected on a small fraction of bone marrow cells and on a larger fraction of spleen cells (illustrated by the results shown in Fig. 6 A to D and data not shown), suggesting that these cells express a CLC/EBI3 receptor. The dot blot representation of the flow cytometry analysis indicates that the binding is mostly on the larger blast cells (Table II, Fig.6 B and C and data not shown),

suggesting that scEBI3-CLC binds to activated B cells. This was confirmed by double staining with scEBI3-CLC and anti-B220 FITC (Fig.6 E and F).

Biological activities of CLC/EBI3 and scEBI3-CLC-To assess the biological outcome of the binding of CLC/EBI3 on Ba/FIII cells, we analysed the proliferative response of these cells to the cytokine (Fig. 4C). This response was indistinguishable from the one induced by mouse CLC/CLF. Proliferation was prevented when the interaction between CLC and EBI3 was stabilized by fusing the two partners with a synthetic linker (Fig. 4D). As expected, no proliferation response was detected when Ba/FII cells were incubated with any of the analysed cytokines (data not shown). As both CLC/CLF and CNTF induce the phosphorylation of STAT1 and STAT3 (1;18;21), we further evaluated the activation of these STATs on Ba/FIII cells by CLC/EBI3 and scEBI3-CLC using Ab specific for the phosphorylated forms of the STATs and flow cytometry or Western blot analysis (Fig. 7). Incubation with CLC/EBI3 induced a small increase of STAT1 and a large increase of STAT3 phosphorylation (Fig. 7A and B). As expected from the binding and proliferation experiments, we did not detect activation of STAT1 or STAT3 in response to scEBI3-CLC. No STATs activation could be seen in response to any of the cytokines on Ba/FII cells, indicating that the responses observed were mediated through the tripartite CNTFR. The activation of STAT3 could be confirmed by Western blot analysis (Fig. 7C).

As scEBI3-CLC binds specifically to LPS activated B220-positive splenocytes (Fig. 6 A to C) and CLC is known to have B cell stimulating activities, we investigated the effect of scEBI3-CLC on the proliferation of purified spleen B cells activated through the B cell receptor, CD40 or by LPS (Fig. 8). We reproducibly observed a marked increase in proliferation when B cells were activated by sub-optimal concentration of LPS (Fig. 8).

DISCUSSION

CLC was identified as a cytokine expressed in immune cells with B cell growth factor activities and was therefore named B cell-stimulating factor 3 (1;2;27). We reported previously that CLC is a subunit of a composite cytokine CLC/CLF which is a ligand for the CNTFR (12;21). This functional relevance of the CLC/CLF complex during development is supported by the phenotype of CLF^{-/-} mice and of CISS patients with mutation in CLC or CLF (15;16;24;25). However, the expression profile of CLF and the CNTF-like properties of CLC/CLF are at odd with the prevalent expression of CLC in adult mouse immune system and its B cell growth factor activities (1;2;27). This discrepancy could be explained by the formation of an alternative composite cytokine with a soluble cytokine receptor expressed by immune cells. Using sequence alignment and molecular modelling, we predicted that the site I of CLC and p28 were related. As p28 forms a composite cytokine with the soluble cytokine receptor EBI3 (10), we tested if CLC could, like p28, interact with EBI3. We generated stable transfectants co-expressing EBI3 and CLC. Isolation of EBI3 from the culture medium of such transfectants led to co-purification of CLC whereas isolation of CLC resulted in co-purification of EBI3, indicating that the two proteins could form secreted complexes. This new heterodimeric complex brings to seven the number of composite cytokines formed by the association of a soluble receptor and a four-helix bundle cytokine. Four of them, IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/EBI3) and p35/EBI3, are part of the IL-12 family and three (CLC/CLF, CLC/sCNTFR α and IL-27) could be considered members of the IL-6 family (10;12;60-63). These two families are closely related since there is homology between their soluble receptor (p40, EBI3, CLF, sCNTFR α) and cytokine subunits (p35, p19, p28 and CLC). Moreover, IL-27 could be considered to belong to both families as it signals via gp130, the main characteristic of the IL-6 family (5;33;64). The interrelation between the two cytokine families is further reinforced by the

present observation that CLC, a cytokine of the IL-6 family forms a complex with EBI3 a soluble receptor of the IL-12 family.

Comparison of EBI3 and CLC mRNA expression patterns suggests that the new complex is produced by immune cells. Notably, both RNA are expressed by mouse spleen B cells. We attempted to set-up an ELISA specific for CLC/EBI3 to demonstrate that B cells actually secrete CLC/EBI3. Unfortunately, preliminary experiments with recombinant CLC/EBI3 or scEBI3-CLC using commercial or home made anti-EBI3 and anti-CLC mAbs failed to results in a sensitive test for CLC/EBI3 (data not shown). Direct demonstration of CLC/EBI3 production by primary immune cells might therefore require the generation of new anti-EBI3 and anti-CLC antibodies.

In the course of this study, we observed that the mouse CLC, unlike its human counterpart, does not require forming a composite cytokine with a soluble cytokine receptor to be released by transfected cells. Interestingly, an analogous difference between mouse and human IL-27 p28 subunits was reported previously: mouse p28 can be secreted while the human p28 requires interaction with EBI3 to be released (10). The molecular basis for the discrepancies between the human and mouse CLC (or p28) remains to be elucidated. It could reflect the use of a human cell line (HEK-293) for our experiments, if the protein(s) involved in the retention have species specificities. Human and mouse CLC are strongly conserved (1;2) and mutagenesis of residues differing between the two species should allow the identification of the amino acids crucial for the retention of human CLC in the absence of an interacting partner.

CLC secreted as a complex with EBI3 retains the capacity to bind and activate CNTFR. Activation of the CNTFR most likely involves an exchange between EBI3 and CNTFR α , as both receptor chains are predicted to binds CLC site I and stabilisation of the CLC-EBI3 complex using a flexible polypeptide linker prevents CNTFR binding and activation. This indicates that CLC/EBI3 is a candidate member to the growing number of neurotrophic factors produced by immune cell

(65;66). These factors have been shown to play an important role in the complex interrelation between immune and nervous system known to regulate inflammation, hyperalgesia and neurogenesis (65-67).

An obvious candidate receptor chain for CLC/EBI3 was WSX-1, which forms with gp130 the IL-27 receptor but does not bind any of the two IL-27 subunits, EBI3 or p28 individually (33). No binding of CLC/EBI3 or scEBI3-CLC could however be detected using transfectants expressing mouse or human WSX-1 and the receptor specific for the composite cytokine CLC/EBI3 remains to be identified. We used scEBI3-CLC to find immune cells expressing a receptor specific for the new composite cytokine. We detected binding on LPS stimulated mouse splenocytes, bone marrow cells or B cells from splenocytes, pointing to a receptor specific for the new complex on activated B cells. That this receptor is functional is supported by experiments with purified B cells which show that scEBI3-CLC increases the proliferation induced by sub-optimal concentration of LPS.

We observed that the CLC/EBI3 complex was less stable than CLC/CLF during batch purification (data not shown), which lead us to use scEBI3-CLC for experiments in which we wanted to exclude unbound CLC. A similar strategy has been widely used for IL-27 which is mostly studied using a scEBI3-p28 fusion(68). This could suggest that two related CLC/EBI3 and IL-27 composite cytokines might be designed to act very locally as autocrine factors or in immunological synapses with a quick dissociation of the complex partners upon release which would prevent bystander effects on nearby receptor expressing cells. Such hypothesis would be attractive for composite cytokine like IL-27 with a broadly distributed receptor, pleiotropic activities and numerous cellular targets such as T, B, NK and mast cells populations (44;68;69).

To further analyse CLC-EBI3 interaction, we generated a mouse CLC derivative mutated in site I (A60E) and analysed its ability to associate with EBI3. Unexpectedly, this substitution, which prevents CNTFR α binding (13) did not detectably affect formation of CLC/EBI3 complex, indicating that alanine 60 is not a

crucial site I residue for CLC-EBI3 binding. Together with scEBI3-CLC, this mutant might represent a potent tool to discriminate between the biological activities of CLC linked to the formation of a complex with EBI3 and the one due to the activation of CNTFR. It might lead to therapeutic CLC derivative with immune application in the absence of side effects due to CNTFR activation. Such side effects like loss of appetite and weight loss were observed during clinical trials with CNTF systemic administration (70;71).

FIGURE LEGENDS

Table I : Pairs of primers used for the amplification of mouse CNTFR α , CLF, CLC, EB13 and GAPDH and the length of the amplification product obtained.

Primers name	Sequence	length of PCR product in base pair
CNTFR α a CNTFR α b	tctggtgtgagatgccgagggtt cattcggtacatgcacctgttc	440
CLFa CLFb	ggctggctcctgcctctatggt gcggtagcggatctggtacttg	459
CLCa CLCb	ccttcagcagccagaagtca gccagctcttaatgcacag	493
EB13a EB13b	aacagctctcgtggctctaa gtagcggagtcggtactga	438
GAPDH a GAPDH b	ccacagtccatgccatcactgc gccatgtaggccatgagggtcca	468

**Table II : Percentages of cells positive for the binding of scEB13-CLC on unstimulated or LPS stimulated splenocytes, thymocytes and bone marrow cells.
neg : negative.**

	Unstimulated	LPS stimulated
Bone marrow	> 1%	9%
Spleen	> 1%	34.1%
Thymus	> 1%	1%

FIG. 1. EBI3, a potential interaction partner for CLC. (A) Multiple sequence alignment of human and mouse CLC and IL-27p28. Strictly conserved or type conserved residues are highlighted in red. Residues conserved in 3 out of the 4 proteins are highlighted in blue. The locations of the predicted α A-helix (blue), α A'-helix (cyan), α B-helix (green), α C-helix (grey), and the α D-helix (orange) are indicated. Residues implicated in the binding site I are boxed in black. Asterisks indicate the Hot spot of interaction described for CLC (13). N-terminal amino acids constituting the predicted signal peptide are boxed in dotted line. The +1 amino acid is the first amino acid following the peptide signal. Alignment was performed using predicted mature protein sequences.

(B) Molecular modeling of human CLC and IL-27p28. Ribbon representation of the models of CLC (left) and IL-27p28 (right); the binding site I of these cytokines is circled. The conserved residues implicated in this site are indicated. Aromatic residues are colored in green, positively charged residues in blue and negatively charged residues in red.

Figure 1A

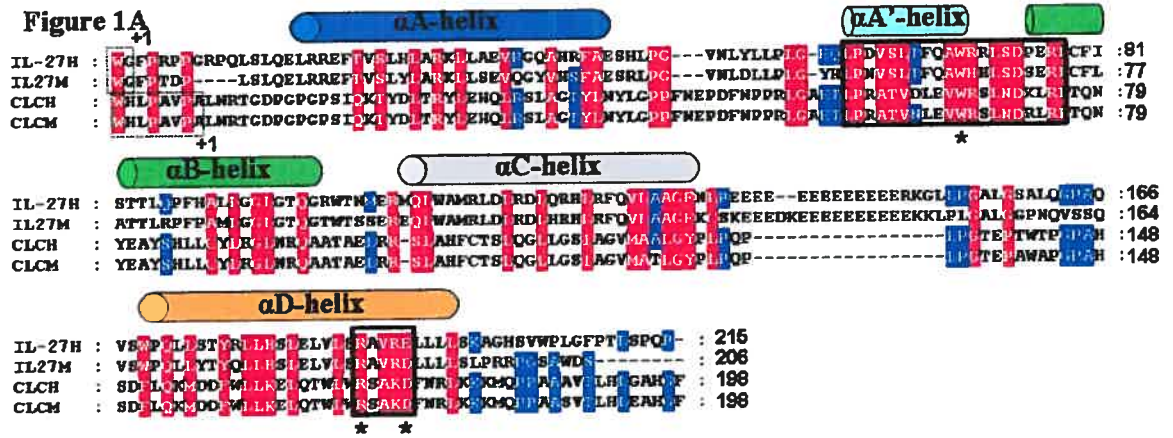


Figure 1B

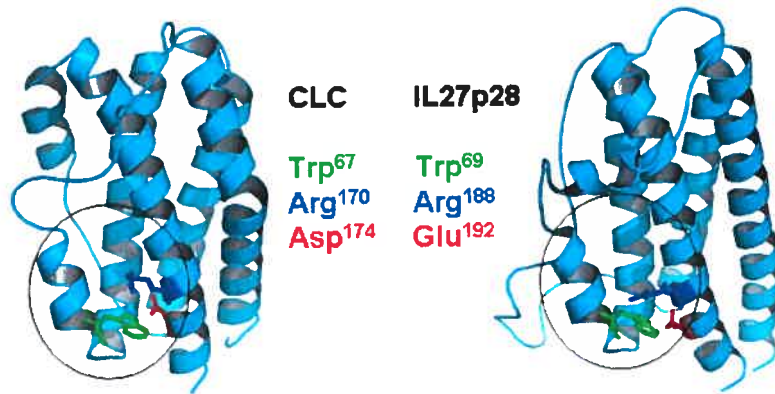


FIG. 2. CLC and EBI3 form a new complex. HEK 293-FlpIn cells were stably transfected with expression vectors coding for mouse CLC, EBI3, GFP, CLC or CLC A60E mutant and EBI3. CLC and EBI3 were tagged with the protein C (ProtC) and c-myc epitopes, respectively. Cell lysate or supernatant (*B*) of each transfectants was incubated with anti-protein C agarose or anti-c-myc agarose (*A*). Immunoprecipitated proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blot using HRP conjugated antibodies specific for the c-myc or ProtC epitope tags, as schematically depicted in (*A*). *WB*, Western Blot; *IP*, immunoprecipitation.

Figure 2A

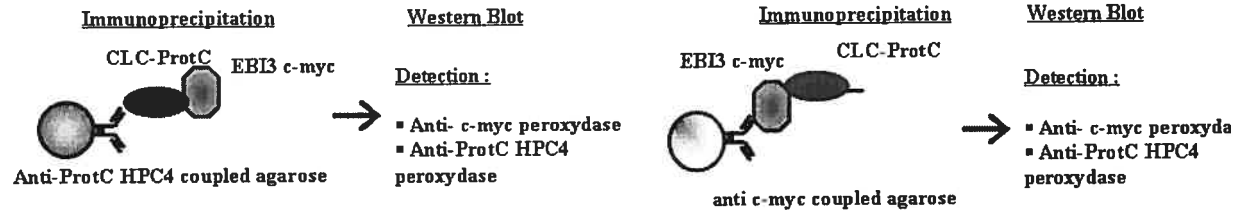


Figure 2B

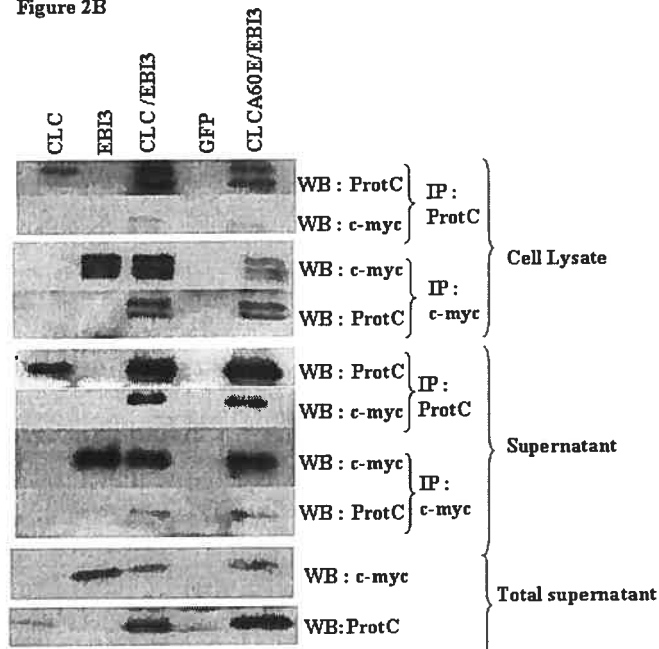


FIG. 3. EBI3 and CLC mRNA are co-expressed in immune organs (A) and cells (B). Expression of CLF, EBI3, CLC and CNTFR α was analysed by RT-PCR using RNA isolated from the indicated organs (A) or splenocyte subpopulations (B). PCR product were analysed by agarose gel electrophoresis and revealed by ethidium bromide staining. Spleen B cells, T cells, dendritic cells (DC), monocytes (Mo)/macrophages (M \emptyset) were isolated by flow cytometry using antibodies directed against B220, Thy-1, CD11b and CD11c.

Figure 3A

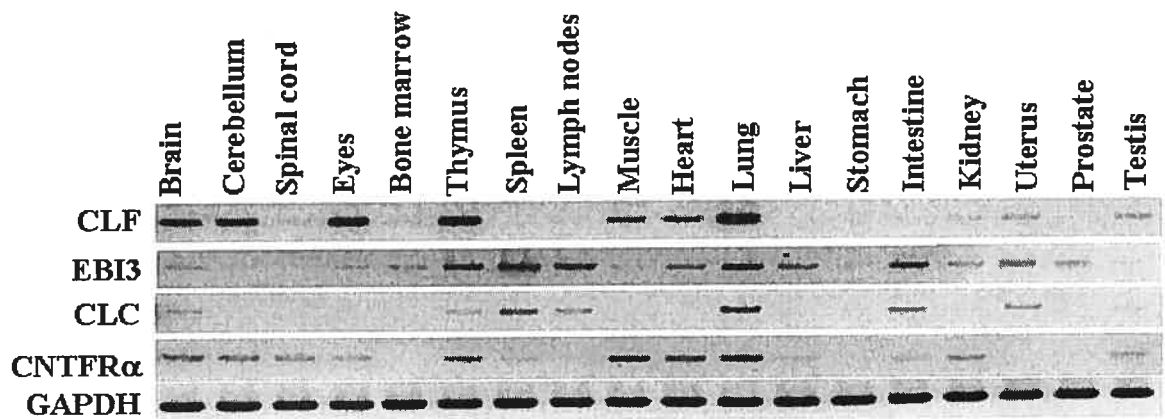


Figure 3B

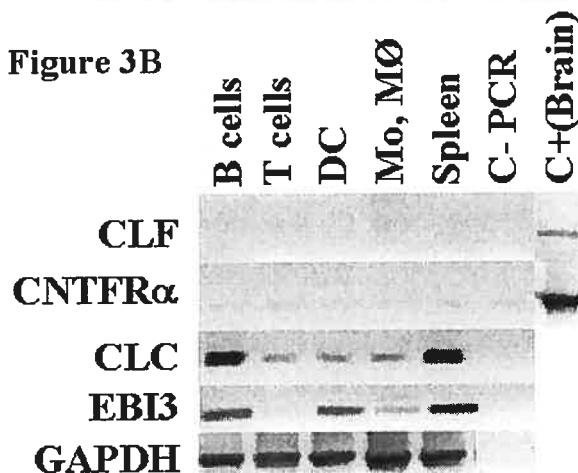


FIG. 4. The CLC/EBI3 complex, unlike scEBI3-CLC fusion protein, binds to Ba/F3 cells expressing the tripartite CNTFR and induces their proliferation. (A) Co-expressed CLC/EBI3 binds to Ba/FIII cells (Ba/F3 transfected with gp130, LIFR β and CNTFR α ; thin line) but not to Ba/FII (Ba/F3 transfected with gp130, LIFR β only, grey histogram). Cells were incubated for 1h at 4°C with concentrated supernatants of cells expressing the indicated cytokines. Cytokine binding was then revealed by successive incubation with the anti-protein C epitope tag mAb HPC4 and Fluor 633-labelled anti-mouse IgG. The bold line represents the binding of the anti-protein C epitope tag mAb HPC4 and Fluor 633-labelled anti-mouse IgG mAb alone (control mAb) on Ba/FIII cells. (B) The binding of CLC/EBI3 (thin line) is lost when the complex is stabilized by a linker (scEBI3-CLC, bold line). Grey histogram represents the binding of control mAb. (C) CLC/EBI3 but not scEBI3-CLC (D) induces the proliferation of Ba/FIII. Mouse CNTF was used as a positive control for proliferation of Ba/FIII cells. Ba/FIII cells were cultured in the presence of serial dilutions of the indicated cytokine. Proliferation was measured in triplicates by monitoring the incorporation of [3 H] thymidine. Errors bars represent standard deviation.

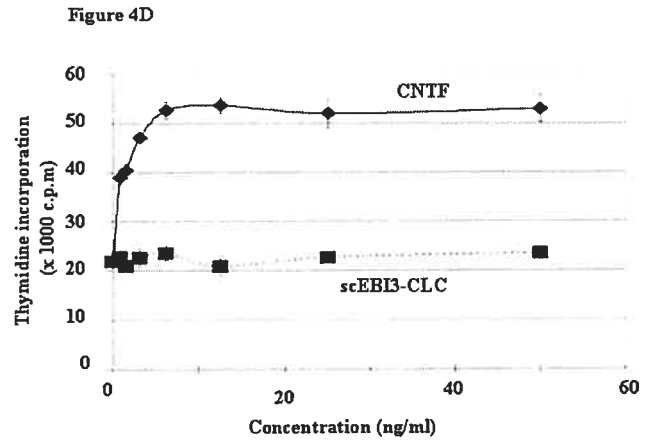
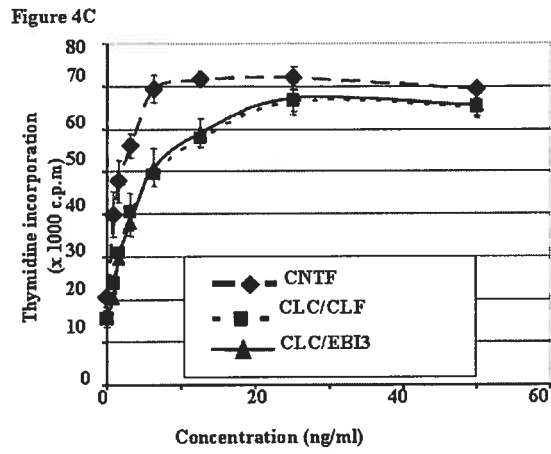
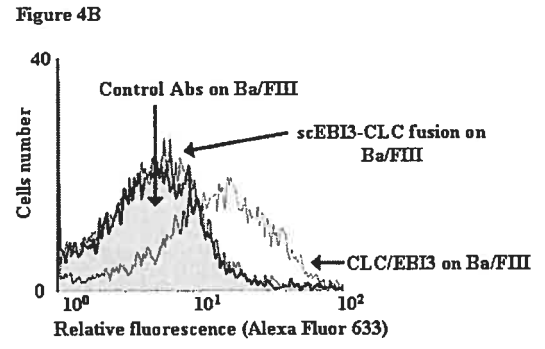
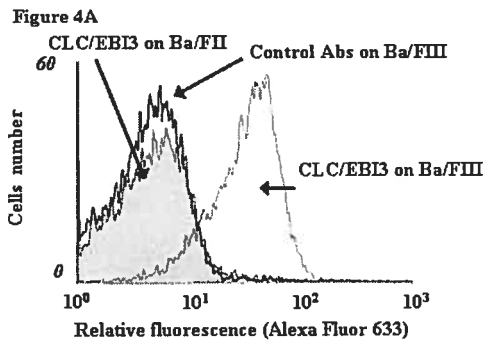


FIG. 5. The scEBI3-CLC fusion protein does not bind to mWSX-1 expressing Flp-inTM-293 cells. mWSX-1 expressing Flp-inTM-293 cells were incubated for 1h at 4°C with supernatants of cells expressing the scEBI3-CLC fusion protein. Cytokine binding was then revealed by successive incubation with the anti-protein C epitope tag mAb HPC4 and Fluor 633-labelled anti-mouse IgG. The grey histogram represents the binding of the anti-protein C epitope tag mAb HPC4 and Fluor 633-labelled anti-mouse IgG alone.

Figure 5

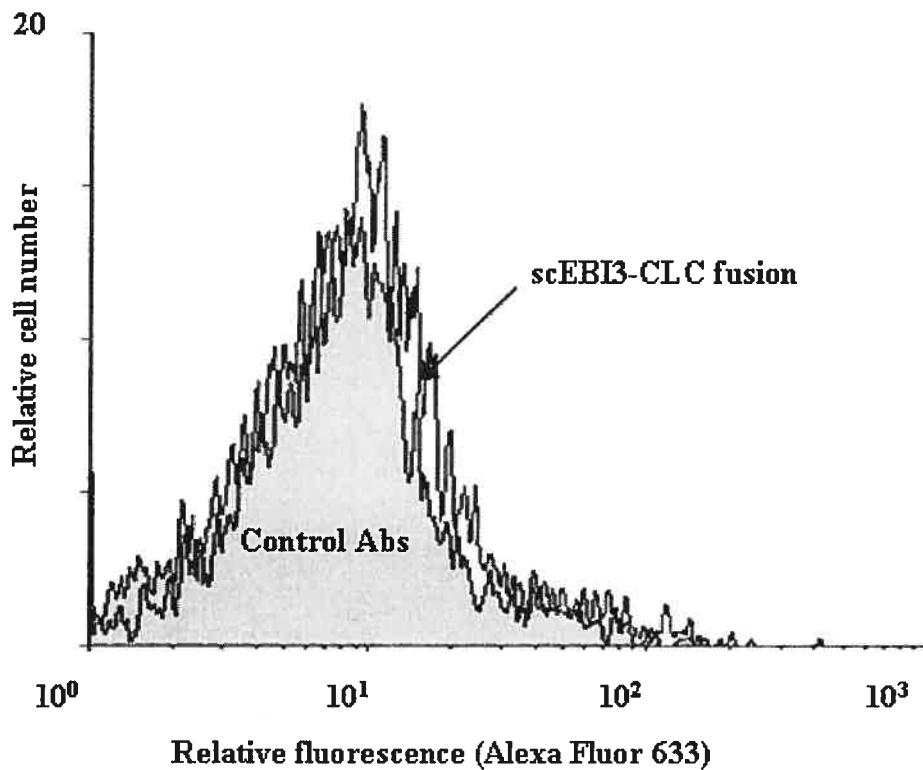


FIG. 6. The scEBI3-CLC fusion protein binds to LPS activated splenocytes and bone marrow cells. Splenocytes, thymocytes or bone marrow cells were left unstimulated or stimulated for 36h with 10 μ g/ml LPS. Cells were then incubated for 1h at 4°C with the indicated cytokines. Cytokine binding was then revealed by incubation with the Alexa Fluor 647 labelled anti-HPC4 mAb. The cells were then analysed by FACS for the binding of scEBI3-CLC. scEBI3-CLC (thin line) binds to LPS activated splenocytes (panel 6A to C) or bone marrow cells (panel 6D). The grey histogram represents the binding of the Alexa Fluor 647 labelled anti-HPC4 mAb alone (control mAb). The dot blot (panel B and C) show that scEBI3-CLC binds to a specific population (high in SSC) in the spleen (34.1%) or in bone marrow (9%). This population was shown to be the B cells as scEBI3-CLC binds to B220 positive cells in splenocytes (Fig.6E and F). No binding could be observed with scmEBI3-CLC on non stimulated thymocytes, splenocytes or bone marrow cells and on LPS stimulated thymocytes.

Figure 6A

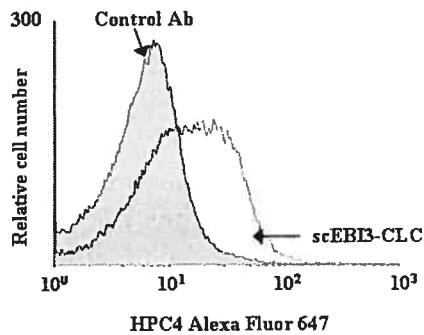


Figure 6B

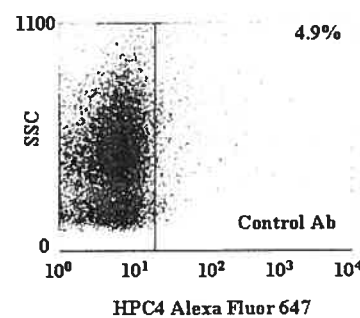


Figure 6C

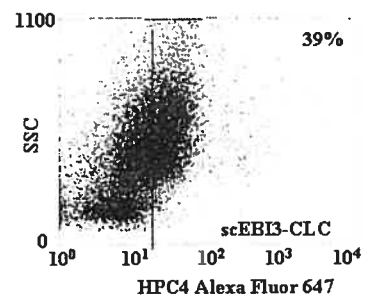


Figure 6D

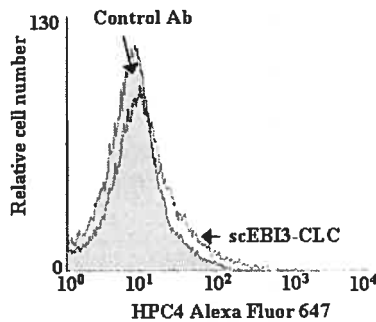


Figure 6E

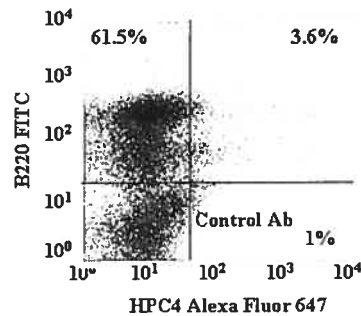


Figure 6F

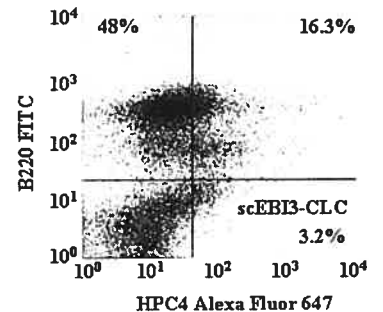


FIG. 7. CLC/EBI3 but not scEBI3-CLC fusion protein induces the phosphorylation of STAT1 and STAT3 in Ba/FIII cells. Ba/FIII cells were serum and cytokine starved overnight and then stimulated for 15 min with the indicated cytokines. For FACS analysis of STAT phosphorylation, cells were fixed, permeabilised and stained with anti-phospho STAT1 (A) and STAT3 (B). The phosphorylation of STAT3 by CLC/EBI3 or scEBI3-CLC fusion protein was further assessed by Western Blot analysis (C): stimulated cells were lysed and aliquots containing 40 µg of proteins were subjected to SDS-PAGE and transfer on PVDF membranes. Membranes were probed with anti-STAT1, anti-STAT3, anti-phospho-STAT1 (Tyr701) and anti-phospho-STAT3 (Tyr705) antibody and the signal revealed with using anti-rabbit HRP-labelled Ig and ECL. In each experiment, CNTF at 150 ng/ml was used as a positive control.

Figure 7A

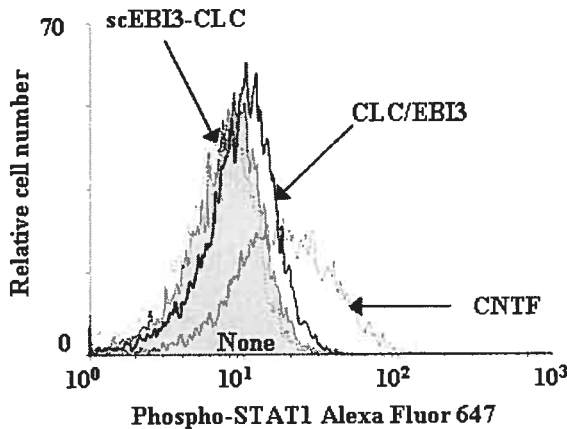


Figure 7B

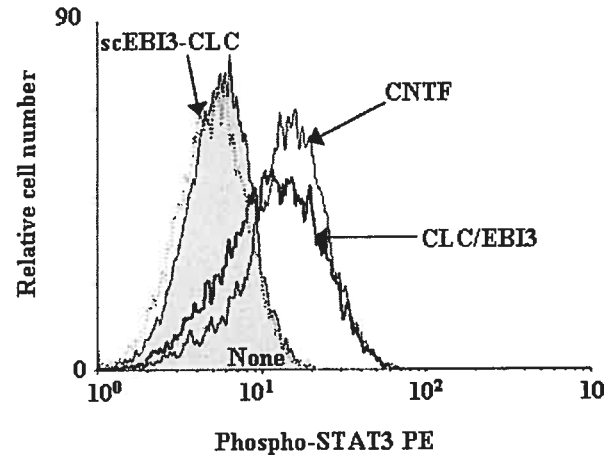


Figure 7C

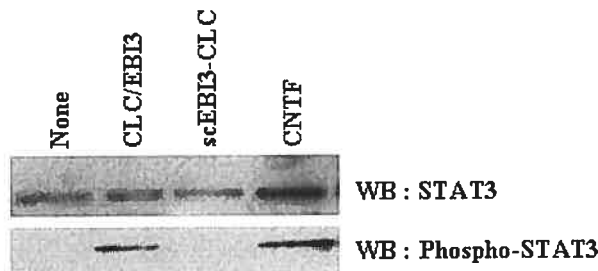
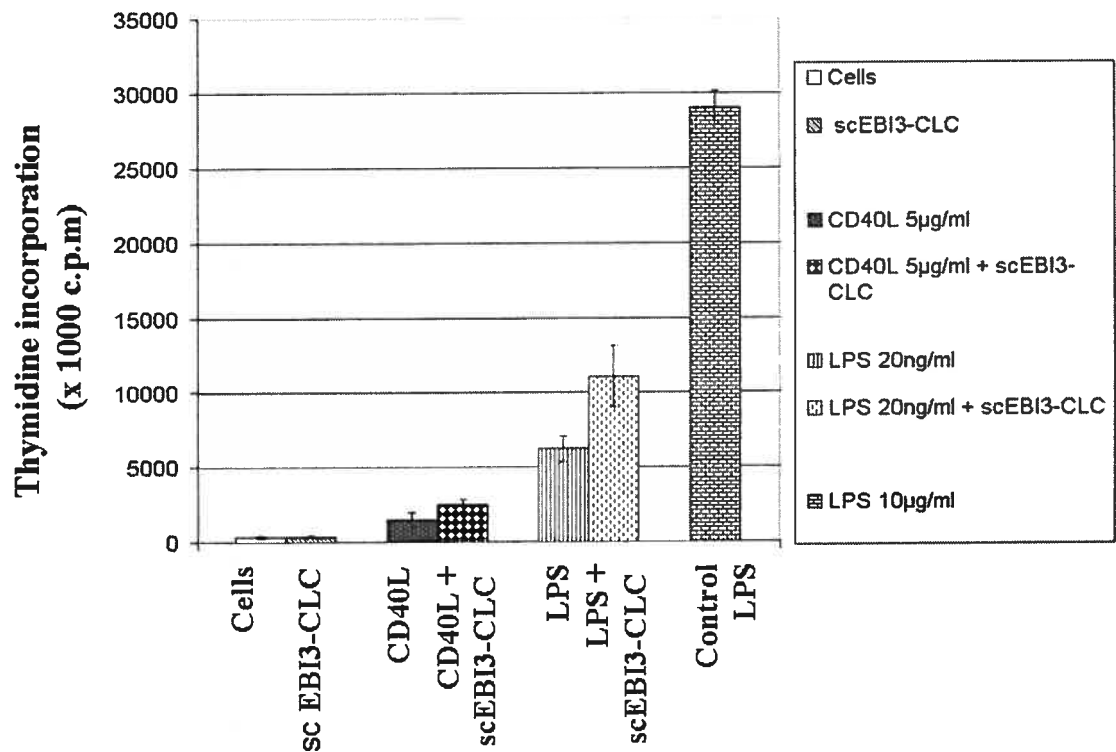


FIG. 8. The scEBI3-CLC fusion protein induces the proliferation of LPS activated B cells. B cells were purified from splenocytes by positive magnetic cells sorting. B cells were then incubated in triplicates with the indicated B cell activators and cytokines for 5 days in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. [³H] thymidine (0,5 µCi) was added for 6h and the incorporated radioactivity measured by scintillation counting. LPS at 10µg/ml was included as a positive control. Results are expressed in c.p.m. +/- S.D. as one representative of two independent experiments.

Figure 8



Acknowledgments-We are grateful to Dr K.J Kallen (Christian Albrechts Universität zu Kiel, Germany) for kindly providing the stably transfected Ba/F3 derivatives.

Reference List

1. 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) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11458-11463
2. Shi, Y., Wang, W., Yourey, P. A., Gohari, S., Zukauskas, D., Zhang, J., Ruben, S., and Alderson, R. F. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* -8
3. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998) *Biochem. J.* **334 (Pt 2)**, 297-314
4. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) *Biochem J* -20
5. Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2004) *Growth Factors* -7
6. Lin, L. F., Mismar, D., Lile, J. D., Armes, L. G., Butler, E. T., III, Vannice, J. L., and Collins, F. (1989) *Science* **246**, 1023-1025
7. Lin, L. F., Armes, L. G., Sommer, A., Smith, D. J., and Collins, F. (1990) *J. Biol Chem.* **265**, 8942-8947
8. Stockli, K. A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D., and Thoenen, H. (1989) *Nature* **342**, 920-923
9. Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., Delapeyriere, O., Gascan, H., and Chevalier, S. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* -32

10. 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) *Immunity* -90
11. Davis, S., Aldrich, T. H., Valenzuela, D. M., Wong, V. V., Furth, M. E., Squinto, S. P., and Yancopoulos, G. D. (1991) *Science* **253**, 59-63
12. 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., and Gascan, H. (2000) *Nat Neurosci* -72
13. Perret, D., Guillet, C., Elson, G., Froger, J., Plun-Favreau, H., Rousseau, F., Chabbert, M., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2004) *J Biol Chem* -70
14. 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) *EMBO J* -703
15. Knappskog, P. M., Majewski, J., Livneh, A., Nilsen, P. T., Bringsli, J. S., Ott, J., and Boman, H. (2003) *Am J Hum. Genet.* **72**, 375-383
16. 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) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 10068-10073
17. Sohar, E., Shoenfeld, Y., Udassin, R., Magazanik, A., and Revach, M. (1978) *Lancet* **2**, 1073-1074
18. Sleeman, M. W., Anderson, K. D., Lambert, P. D., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. (2000) *Pharm. Acta Helv.* **74**, 265-272
19. Vergara, C. and Ramirez, B. (2004) *Brain Res. Brain Res. Rev.* **47**, 161-173

20. Auernhammer, C. J., Isele, N. B., Kopp, F. B., Spoetl, G., Cengic, N., Weber, M. M., Senaldi, G., and Engelhardt, D. (2003) *Endocrinology* -10
21. Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G. C., Gauchat, J. F., and Gascan, H. (2001) *J Biol Chem* -84
22. Schuettauf, F., Zurakowski, D., Quinto, K., Varde, M. A., Besch, D., Laties, A., Anderson, R., and Wen, R. (2005) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* -42
23. Uemura, A., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Nakashima, K., and Taga, T. (2002) *Cytokine* -7
24. 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., and Hilton, D. J. (1999) *Curr Biol* -8
25. Forger, N. G., Pevette, D., Delapeyriere, O., de Bovis, B., Wang, S., Bartlett, P., and Oppenheim, R. W. (2003) *J Neurosci* -8
26. Kraves, S. and Weitz, C. J. (2006) *Nat. Neurosci.* **9**, 212-219
27. 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., and Cattle, R. C. (2002) *J Immunol* -8
28. Elson, G. C., Graber, P., Losberger, C., Herren, S., Gretener, D., Menoud, L. N., Wells, T. N., Kosco-Vilbois, M. H., and Gauchat, J. F. (1998) *J Immunol* -9
29. Devergne, O., Hummel, M., Koeppen, H., Le Beau, M. M., Nathanson, E. C., Kieff, E., and Birkenbach, M. (1996) *J Virol* -53
30. Devergne, O., Cahir McFarland, E. D., Mosialos, G., Izumi, K. M., Ware, C. F., and Kieff, E. (1998) *J Virol* -8

31. Brombacher, F., Kastelein, R. A., and Alber, G. (2003) *Trends Immunol* -12
32. Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M. H., Gurney, A., Grewal, I. S., and de Sauvage, F. J. (2000) *Nature* **407**, 916-920
33. 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) *J Immunol* -31
34. Sprecher, C. A., 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) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 82-90
35. Artis, D., Johnson, L. M., Joyce, K., Saris, C., Villarino, A., Hunter, C. A., and Scott, P. (2004) *J Immunol* -5
36. Kamiya, S., Owaki, T., Morishima, N., Fukai, F., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2004) *J Immunol* -7
37. Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J., and de Sauvage, F. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* -52
38. Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Hata, K., Fukai, F., Matsui, M., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2005) *J Immunol* -200
39. Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T. W., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2003) *J Immunol* -90
40. 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) *Immunity*. **15**, 569-578
41. 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) *J Immunol* -34

42. 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) *Immunity*. **19**, 657-667

43. Villarino, A., Hibbert, L., Lieberman, L., Wilson, E., Mak, T., Yoshida, H., Kastelein, R. A., Saris, C., and Hunter, C. A. (2003) *Immunity*. **19**, 645-655

44. Villarino, A. V., Huang, E., and Hunter, C. A. (2004) *J Immunol* -20

45. Villarino, A. V., Larkin, J., III, Saris, C. J., Caton, A. J., Lucas, S., Wong, T., de Sauvage, F. J., and Hunter, C. A. (2005) *J Immunol* -91

46. Yamanaka, A., Hamano, S., Miyazaki, Y., Ishii, K., Takeda, A., Mak, T. W., Himeno, K., Yoshimura, A., and Yoshida, H. (2004) *J. Immunol.* **172**, 3590-3596

47. Nieuwenhuis, E. E., 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) *Proc Natl Acad Sci U S A* -6

48. Zahn, S., Wirtz, S., Birkenbach, M., Blumberg, R. S., Neurath, M. F., and von Stebut, E. (2005) *Eur J Immunol* -12

49. Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N. M., Danilenko, D. M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F. J., and Ghilardi, N. (2006) *Nat. Immunol.* **7**, 929-936

50. 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., and Hunter, C. A. (2006) *Nat. Immunol.* **7**, 937-945

51. Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217
52. Sali, A. and Blundell, T. L. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815
53. Luthy, R., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (1992) *Nature* **356**, 83-85
54. Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S, and Thornton J M (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291
55. 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) *J Immunol Methods* -2
56. Bontron, S., Ucla, C., Mach, B., and Steimle, V. (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 4249-4258
57. Guillet, C., Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Froger, J., Chabbert, M., Hermann, J., Benoit, d. C., Bonnefoy, J. Y., Gascan, H., Gauchat, J. F., and Elson, G. (2002) *Eur J Biochem* -41
58. Kallen, K. J., Grotzinger, J., Lelievre, E., Vollmer, P., Aasland, D., Renne, C., Mullberg, J., Myer zum Buschenfelde, K. H., Gascan, H., and Rose-John, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11859-11867
59. Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R. A. (2003) *Immunity.* **19**, 641-644
60. Devergne, O., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* -6
61. Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 827-845

62. 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., Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A. (2000) *Immunity*. **13**, 715-725
63. Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M., and . (1991) *J. Immunol.* **146**, 3074-3081
64. Bravo, J. and Heath, J. K. (2000) *EMBO J.* **19**, 2399-2411
65. Kerschensteiner, M., Stadelmann, C., Dechant, G., Wekerle, H., and Hohlfeld, R. (2003) *Ann. Neurol.* **53**, 292-304
66. Tabakman, R., Lecht, S., Sephanova, S., rien-Zakay, H., and Lazarovici, P. (2004) *Prog. Brain Res.* **146**, 387-401
67. Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., and Schwartz, M. (2006) *Nat. Neurosci.* **9**, 268-275
68. Hunter, C. A. (2005) *Nat Rev Immunol* -31
69. Cordoba-Rodriguez, R. and Frucht, D. M. (2003) *Expert Opin Biol Ther* -23
70. Bongioanni, P., Reali, C., and Sogos, V. (2004) *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD004302
71. Miller, R. G., Petajan, J. H., Bryan, W. W., Armon, C., Barohn, R. J., Goodpasture, J. C., Hoagland, R. J., Parry, G. J., Ross, M. A., and Stromatt, S. C. (1996) *Ann. Neurol.* **39**, 256-260

Discussion

Les objectifs principaux du projet de thèse visaient à mieux caractériser les ligands du récepteur au CNTF avec comme but futur leur utilisation en essai clinique pour le traitement de maladies neurodégénératives. Parmi les trois ligands du CNTFR, nous ne nous sommes intéressés qu'à deux, le CNTF¹¹ et CLC/CLF^{5,84,85}, et non à la neuropoïétine car le gène codant pour cette protéine est un pseudogène chez l'humain⁹⁵.

I. Les ligands du récepteur au CNTF comme agent thérapeutique dans le traitement de la sclérose en plaques

Le CNTF a été découvert en 1979 comme facteur induisant la survie des neurones parasympathiques du ganglion ciliaire dans des embryons de poulet¹¹. Par la suite, l'activité neurotrophique du CNTF a été démontrée pour de multiples sortes de neurones comme les neurones parasympathiques, sympathiques, moteurs et cholinergiques. Grâce à ses propriétés neuroprotectrices, le CNTF a été évalué dans le traitement de maladies neurodégénératives. Dans des modèles souris de dysfonctionnement neuromusculaire, le CNTF améliore le déficit de cette maladie^{42,43}. Ces résultats prometteurs ont laissé présager son utilisation dans le traitement des maladies neurodégénératives comme la SLA ou la maladie de Huntington.

La SLA est une maladie neuromusculaire mortelle caractérisée par un affaiblissement musculaire progressif amenant à la paralysie. Cependant, l'administration systémique du CNTF par voie sous-cutanée à des patients atteints de SLA s'est révélée être inefficace. Aux fortes doses de CNTF, des effets secondaires indésirables ont été observés comme de la toux, des nausées, de la fatigue et une perte de poids⁷⁶⁻⁷⁸. Ce peu d'efficacité du CNTF et ses effets secondaires ont été imputés à son mode

d'administration systémique. En effet, il est possible que la demi-vie courte de la cytokine, son élimination rapide et son incapacité à traverser la barrière hémato-encéphalique soit en partie responsable de son manque d'efficacité. De même, les effets secondaires pourraient être dus à l'action du CNTF en périphérie. Le CNTF se lie principalement au CNTFR composé du CNTFR α , du LIFR β et de gp130. C'est le CNTFR α qui confère la spécificité d'action du CNTF car ce dernier a un profil d'expression plus restreint (notamment au niveau du système nerveux et des muscles) que LIFR β et gp130. Cependant, nous avons vu que le CNTF possède aussi une voie de signalisation atypique. Notamment, le CNTF de rat à forte dose peut agir sur des cellules exprimant seulement gp130 et LIFR β en absence de la chaîne CNTFR α ³⁴ et que le CNTF humain peut se lier et activer le récepteur tripartite comprenant l'IL6R α , LIFR β et gp130 (Figure 9)³⁵. Cette caractéristique de liaison de CNTF humain à l'IL6R α est due à la présence de la glutamine 63 chez l'humain (substituée par l'arginine 63 chez le rat)²². De plus, quelque soit son espèce, le CNTF peut se lier au sCNTFR α et agir sur des cellules exprimant gp130 et LIFR β . Le CNTF peut donc agir sur un plus grand nombre de cellules que ce que laissait supposer les études initiales. La possibilité de liaison du CNTF à plusieurs récepteurs doit être prise en compte dans les prochaines évaluations pré-cliniques et cliniques du CNTF car cela pourrait être la cause de certains des effets secondaires observés. Afin de pallier à certains de ces effets secondaires, un dérivé du CNTF humain, l'Axokine, a été mis au point. La glutamine en position 63 a été substituée en arginine ce qui permet d'inhiber la liaison du CNTF humain à l'IL6R α et d'augmenter l'activité spécifique de la protéine²². De plus, d'autres modifications (la substitution de la cystéine en arginine et la troncation des derniers acides aminés) permettent de rendre cette cytokine plus stable¹⁵⁷. De nouvelles voies d'administration du CNTF ont été envisagées comme notamment l'administration par voie intrathécale, l'injection de virus exprimant le CNTF ou de cellules encapsulées et génétiquement modifiées pour la production du CNTF au niveau intrathécal⁸⁰. Pour cette dernière méthode, des cellules xénogéniques sont entourées

d'une membrane perméable permettant la diffusion du CNTF qu'elles produisent au niveau des cellules environnantes. Cette membrane protège aussi d'une réponse immunitaire de l'hôte contre ces cellules xénogéniques. Cette nouvelle voie d'administration a permis l'élimination des effets secondaires observés lors de l'administration systémique du CNTF. De plus, les premiers tests cliniques ont prouvé que son utilisation était sécuritaire, permettait une diffusion continue de la cytokine, et que la chirurgie nécessaire à l'implantation de cet appareillage était simple ⁸⁰. Cependant, depuis, aucun essai clinique n'a pu prouver un effet bénéfique de l'administration du CNTF pour le traitement de la SLA.

Le CNTF a aussi été testé dans le traitement de la maladie de Huntington. La maladie de Huntington est une maladie génétique caractérisée par des déficits moteurs et cognitifs associés à une démence progressive résultant de la dégénération des neurones striataux. L'injection par voie intracérébrale de CNTF par une pompe protège les neurones striataux dans un modèle rat de cette maladie ⁴⁷. De même, l'administration intrastriatale de lentivirus exprimant le CNTF permet de diminuer les symptômes de la maladie dans un modèle animal ⁵¹. Dans un modèle primate de la maladie de Huntington, l'implantation intrastriatale de cellules encapsulées produisant du CNTF a été réalisée avec succès. Le CNTF a eu des effets neuroprotecteurs au niveau de différents types de neurones et notamment des neurones striataux ⁴⁸. En plus de cet effet neuroprotecteur, le CNTF a permis une récupération de certaines fonctions motrices et cognitives ⁵⁰. Peu d'effets secondaires ont été observés au niveau de ces études ce qui est probablement dû au mode d'administration de la cytokine et aux leçons tirées des essais cliniques du CNTF au niveau de la SLA. Suite à ces résultats prometteurs, des essais cliniques de phase I ont prouvé sa faisabilité, sa tolérance et sa sûreté chez l'humain même si la technique reste à être améliorée au niveau de la reproductibilité de production du CNTF au niveau des cellules et de l'efficacité du traitement ⁸¹.

Ces différentes études du CNTF dans le traitement de maladies neurodégénératives nous ont montré que malgré les difficultés observées au cours de ces essais, les mises au point au niveau des techniques d'administration et de la cytokine elle-même avait

permis la diminution des effets secondaires et en faisait une molécule potentiellement utilisable en clinique. Nous nous sommes donc intéressés à la poursuite de l'évaluation de CNTF dans le traitement de ces maladies et plus précisément dans la sclérose en plaques. La sclérose en plaques est la maladie neurodégénérative la plus courante chez les jeunes adultes. C'est une maladie caractérisée par une forte inflammation au niveau de zones de démyélinisation ce qui laisse suggérer une étiologie auto-immune ⁵⁴. Cette démyélinisation résulte d'une perte en oligodendrocytes éventuellement causée par une attaque de ces cellules par des lymphocytes T cytotoxiques. La perte axonale observée peut être la conséquence de la démyélinisation des neurones et donc leur fragilisation ou bien peut être causée par une attaque du système immunitaire ⁵⁵. La sclérose en plaques est aussi caractérisée par une dissociation de la barrière hémato-encéphalique induisant un échange facilité entre le sang et le système nerveux de cellules (comme des cellules du système immunitaire) et de petites molécules. Il existe différentes formes de sclérose en plaques. La majorité des patients présentent une forme cyclique de la maladie avec alternance de phases d'attaque et de repos qui évoluera à terme en forme progressive. Les autres patients peuvent développer dès le départ une forme progressive de la maladie plus handicapante. Actuellement, les médicaments (INF γ , acétate de Glatiramer, corticostéroïdes, anti-intégrine $\alpha 4\beta 1$) sont utilisés dans le traitement de la sclérose en plaques cyclique et ont majoritairement un rôle immunomodulateur. À ce jour, aucun traitement ne permet une guérison complète de cette maladie. L'évaluation de molécules neuroprotectrices est donc une voie d'étude prometteuse et attrayante pour le traitement de la sclérose en plaques.

Plusieurs études suggèrent que le CNTF pourrait être bénéfique dans le traitement de la sclérose en plaques. Certains travaux montrent que la mutation non sens du CNTF chez l'homme n'est pas impliquée dans la susceptibilité de développement de maladies neurodégénératives ³⁷ comme la sclérose en plaques ⁴⁰. Cependant, d'autres études ont associé cette mutation à l'apparition précoce de la sclérose en plaques ³⁹. De plus, le CNTF a été retrouvé au niveau du liquide céphalo-rachidien de patients

atteints de sclérose en plaques ⁶⁵. Le CNTF permet aussi la survie des oligodendrocytes d'une mort induite par apoptose ^{62,63} et induit la production de myéline par ces oligodendrocytes ⁶⁴. Les souris CNTF^{-/-}, bien que ne présentant aucun défaut au niveau du développement neuronal, subissent à un âge plus avancé, une atrophie des neurones moteurs de la moelle épinière conduisant à une dégénérescence axonale ³⁶. Enfin, les symptômes de l'EAE, le modèle murin de la sclérose en plaques, apparaissent plus tôt et sont exacerbés chez les souris CNTF^{-/-} avec notamment une diminution du nombre d'oligodendrocytes en prolifération, une augmentation du nombre d'oligodendrocytes en apoptose, une sévérité de la dystrophie vacuolaire de la myéline et des dommages axonaux ⁵². Dans ce même modèle d'EAE, nous avons souhaité déterminer le rôle thérapeutique de l'administration de CNTF. Pour cela, nous avons cloné, produit en bactérie et purifié le CNTF de souris en vue de l'injection dans des souris. Nous avons de même produit le CNTFR α de souris afin de déterminer la spécificité d'action du CNTF de souris pour son récepteur. Bien que les molécules CNTF et CNTFR α humaines et de souris soient très proches, nous avons tout de même remarqué une plus forte affinité du CNTF de souris avec son récepteur souris par rapport au CNTFR humain. À l'inverse, le CNTF humain se lie indépendamment de la même manière au CNTFR α humain ou de souris. Cette caractéristique a déjà été répertoriée pour d'autres cytokines et serait le résultat de l'évolution entre la souris et l'homme. De manière plus pertinente pour nos recherches, nous avons montré que le CNTF de souris à l'inverse du CNTF de rat ne se liait pas de manière détectable au LIFR (hétérodimère de LIFR β et gp130) humain ou murin (Article 1) ¹⁵⁴. De plus, le CNTF de souris possède comme le CNTF de rat l'arginine 63 ce qui l'empêche comme nous l'avons vu précédemment de se lier à l'IL6R α ^{22,35}. Ces résultats indiquent une spécificité du CNTF de souris pour le CNTFR. Le CNTF de souris n'induit donc pas d'action de type LIF ou IL6 comme le CNTF de rat et humain respectivement. À moins d'une signalisation du CNTF par un autre récepteur, l'injection du CNTF de souris à des souris ne devrait pas causer d'effets secondaires tels que rapportés avec

l'administration de LIF ou d'IL6. Sa stricte signalisation via le CNTFR nous permet de conclure que les effets observés chez les souris CNTF^{-/-} dans le modèle EAE sont dus à une action de type CNTF seulement.

Nous avons par la suite évalué le rôle thérapeutique du CNTF dans l'EAE ¹⁵⁵ (Article 5, Annexe). Afin de mettre au point le protocole expérimental, nous nous sommes basés sur la méthode employée dans l'article relatant les effets bénéfiques du LIF dans ce même modèle ¹⁵⁸. Nous avons choisi d'utiliser le modèle chronique de l'EAE en immunisant les souris C57BL/6 avec le peptide MOG 35-55. Le peptide MOG est un composant mineur présent au niveau de la membrane externe de la myéline. Il est très immunogénique et son injection avec un adjuvant dans les souris C57BL/6 induit une forme chronique sévère d'EAE à composante démyélinisante et inflammatoire. Dans ce modèle, le CNTF a été injecté par voie intrapéritonéale à trois doses différentes (60 µg, 180 µg et 1,2 mg/jour/kg) du 8^{ème} au 24^{ème} jours, donc après l'immunisation au peptide MOG et avant l'apparition des symptômes de la maladie ainsi que durant la phase aiguë de la maladie. De manière dose dépendante, le CNTF permet de diminuer la sévérité des symptômes de l'EAE durant toute la durée du traitement lors de la phase aiguë de la maladie. À la cessation du traitement et lors de la phase chronique, les souris prétraitées avec un tampon salin ou avec du CNTF vont tendre vers une même sévérité des symptômes. À la dose la plus forte, nous avons observé une diminution drastique des symptômes de l'EAE lors de la phase aiguë mais cela a été corrélé chez certaines souris avec une grosse perte de poids limitant donc l'utilisation de forte dose de CNTF. Chez l'humain, les doses sécuritaires lors d'injection systémique sont de l'ordre de 1 à 5 µg/kg/jour. Les nouvelles techniques d'administration en continue via des cellules encapsulées ou des virus ainsi que l'utilisation de cytokines pégylées plus stables pourraient permettre d'atteindre des doses thérapeutiques aux sites d'actions visés soit au niveau du système nerveux.

Nous avons ensuite caractérisé l'action du CNTF au niveau de la réponse immunitaire et au niveau du système nerveux. Le CNTF n'induit pas de diminution de prolifération des lymphocytes T ni une altération de la production de cytokines au

niveau des organes lymphoïdes. Par contre, au niveau de la moelle épinière durant la phase aiguë de la maladie, on observe une faible diminution de l'ARNm codant pour l'IL10 et l'INF γ , une baisse (pour 180 μ g/kg/jour) ou une absence (pour 1,2 mg/kg/jour) d'infiltration périvasculaire de lymphocytes T et de macrophages/microglies, une diminution des lymphocytes T au niveau de la matière blanche non affectée, une diminution (pour 180 μ g/kg/jour) ou un arrêt (pour 1,2 mg/kg/jour) de passage à travers la barrière hémato-encéphalique. Ces résultats indiquent donc un rôle anti-inflammatoire inattendu du CNTF au niveau de la moelle épinière. Après cessation du traitement par le CNTF lors de la phase chronique de la maladie, le niveau d'inflammation devient identique entre les souris prétraitées avec du CNTF et du tampon salin. Au niveau du système nerveux, lors de la phase aiguë de la maladie, nous avons observé une diminution de la démyélinisation des neurones pour les souris traitées au CNTF. Par contre, il n'y avait pas de différences statistiquement significatives entre les souris traitées au CNTF et au tampon salin pour la perte et les dommages axonaux et le nombre d'oligodendrocytes en apoptose. Lors de la phase chronique, l'administration de fortes doses de CNTF (1,2 mg/kg/jour) a permis la diminution de la perte neuronale et des dommages axonaux, l'augmentation du nombre de précurseurs des oligodendrocytes et une protection des oligodendrocytes matures contre l'apoptose. Cependant, ces changements morphologiques observés lors de la phase chronique de la maladie ne sont pas corrélés avec une amélioration clinique. La question se pose de savoir si ces changements sont dus à une action directe neuroprotectrice du CNTF ou à son effet anti-inflammatoire observé lors de la phase aiguë.

Notre étude montre donc un rôle thérapeutique nouveau du CNTF pour le traitement de la sclérose en plaques qui diffère des effets bénéfiques observés pour le LIF dans ce même modèle ¹⁵⁸. En effet, le CNTF agirait majoritairement comme anti-inflammatoire au niveau du système nerveux central et non en périphérie, et son effet neuroprotecteur direct ne semble jouer qu'un rôle secondaire dans la protection contre l'EAE. Les mécanismes sous-jacents de cet effet anti-inflammatoire au niveau

central sont encore inconnus. Peu d'étude relate une activité anti-inflammatoire du CNTF. Une action directe au niveau des cellules du système immunitaire semble peu probable car ces cellules ne possèdent pas le CNTFR α . Cependant, le CNTF peut toujours s'associer au CNTFR α soluble et agir sur les cellules exprimant uniquement LIFR β et gp130. Il a été en effet démontré que de fortes doses de CNTF (équivalent à celles utilisées dans notre étude) en combinaison avec du sCNTFR α pouvait produire des effets anti-inflammatoires de type IL6 au niveau des cellules mononucléaires du sang périphérique et au niveau de fibroblastes notamment un inhibant la production de cytokines comme l'IL1, l'IL8 et de prostaglandin E₂ (PGE₂)¹⁵⁹. PGE₂ aurait un effet anti-prolifératif; son inhibition par le CNTF pourrait faciliter la prolifération des oligodendrocytes par exemple et permettre une remyélination des neurones et donc une récupération de la transmission de l'influx nerveux. En combinaison avec le sCNTFR α , le CNTF peut aussi inhiber l'infiltration pulmonaire des neutrophiles polymorphonucléaires et la production de NO induite par le LPS et protéger contre la mort induite par le LPS¹⁶⁰. Seul, le CNTF peut aussi inhiber la production de TNF α au niveau central et périphérique, protéger contre la toxicité du LPS via le TNF α , et induire l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien et la production de glucocorticoïdes¹⁶¹. Dans un modèle murin d'inflammation par injection de carragène dans une poche d'air, l'administration intracérébroventriculaire de CNTF inhibe l'inflammation notamment en diminuant la production de TNF α , d'IL6 et le recrutement de cellules au niveau de l'œdème. Ce mécanisme anti-inflammatoire du CNTF passerait par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien et la production de corticoïdes¹⁶². Dans notre étude, le CNTF n'a induit d'effet anti-inflammatoire qu'au niveau central mais non en périphérie. Il pourrait agir directement au niveau de la microglie du système nerveux. Son action neuroprotectrice aux niveaux des oligodendrocytes et des axones pourrait empêcher la production et la présentation d'antigènes de la myéline et donc le déclenchement d'une attaque immunitaire. Le CNTF peut-il agir au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien afin de diminuer

l'inflammation centrale et le recrutement des lymphocytes et macrophages aux zones d'inflammation du cerveau? Ceci reste à vérifier par exemple en utilisant des souris chez lesquelles la glande surrénale a été enlevée. Tous ces mécanismes laissent supposer un passage du CNTF à travers la barrière hémato-encéphalique. Or dans la sclérose en plaques ou l'EAE, la barrière hémato-encéphalique présente aux pics de la maladie une certaine perméabilité ce qui peut expliquer une diffusion du CNTF du sang vers le système nerveux central ⁵⁴. Le CNTF pourrait aussi agir associé au CNTFR α soluble sur les cellules n'exprimant que le LIFR β et gp130. Par exemple, le CNTF pourrait prévenir le recrutement des cellules inflammatoires au niveau du système nerveux central en agissant sur les cellules endothéliales du cerveau. D'autres hypothèses pourraient être émises en plus d'une action du CNTF sur l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires et du recrutement des cellules inflammatoires comme un effet au niveau de la production de métalloprotéases. Ces protéases pourraient jouer un rôle au niveau de la déstructuration de la barrière hémato-encéphalique. Le CNTF pourrait donc diminuer leur production ou induire l'expression de leurs inhibiteurs. Il est à noter que dans les études démontrant un rôle anti-inflammatoire du CNTF comme dans la nôtre, les doses employées sont relativement fortes. Est-ce que l'effet anti-inflammatoire du CNTF ne pourrait pas être dose dépendant? Dans ce cas là, il est à envisager, comme c'est le cas pour le CNTF de rat qui à fortes doses se lie au LIFR, une signalisation du CNTF par un autre récepteur spécifique de la dose et des effets anti-inflammatoires.

Nous avons montré que le CNTF avait un effet thérapeutique lorsqu'il était injecté avant l'apparition des symptômes de la maladie. Il pourrait donc se révéler efficace dans la cas de sclérose en plaques de forme cyclique après le diagnostic suivant la première attaque. Par la suite, il serait aussi intéressant de démontrer un effet thérapeutique du CNTF en débutant l'injection après l'apparition des premiers symptômes. En effet, aucun traitement n'a été validé pour les formes progressives de

la sclérose en plaques : il existe donc un besoin urgent de médicament pour les patients atteints de la forme progressive de la maladie.

L'injection systémique du CNTF pouvant poser des problèmes chez l'humain, nous souhaiterions valider l'utilisation d'adénovirus exprimant le CNTF dans le traitement de l'EAE. Ces adénovirus seraient injectés au niveau du liquide céphalorachidien et les analyses seraient faites selon le même protocole qu'utilisé dans cette étude. Nous aurions souhaité aussi évaluer le rôle thérapeutique de CLC, autre ligand du CNTFR. Cependant, la production de cette cytokine est plus délicate. Dans les bactéries, il est difficile de produire une cytokine active, et en système eucaryote, nous avons été limités par la quantité de cytokine pouvant être purifiée. Il nous est donc à ce jour impossible d'obtenir une quantité suffisante de CLC active pour l'injection dans des souris afin d'observer son effet dans l'EAE. Si nous arrivons à valider l'utilisation des adénovirus exprimant le CNTF comme vecteur thérapeutique dans l'EAE avec des résultats proches de ceux obtenus lors de l'injection en intrapéritonéal, nous souhaitons utiliser cette même approche pour évaluer le rôle thérapeutique de CLC dans l'EAE.

II. Utilisation de cytokines biotinylées

Les cytokines biotinylées sont utilisées depuis longtemps comme outils de détection de la liaison cytokine/récepteur ¹⁶³. C'est une méthode de détection très puissante puisque la liaison biotine/avidine est une liaison de très haute affinité, encore plus grande qu'une liaison antigène/anticorps. Cette technique a permis d'outrepasser l'utilisation du marquage radioactif qui est plus contraignant et plus dangereux. Les premières méthodes de biotinylation utilisaient des couplages chimiques de la biotine à la cytokine pouvant conduire selon les techniques employées et les sites de couplages à une forte diminution d'activité des cytokines voire à leur inactivation ¹⁶³⁻¹⁶⁶. Cette technique a même été utilisée pour la caractérisation des résidus importants au niveau de la structure et de la fonction de la cytokine ¹⁶⁶. Après biotinylation de la

cytokine au niveau de résidus particuliers, ces dérivés étaient analysés pour leur capacité de liaison à leur récepteur ou leur aptitude à induire leur signalisation. Si ces dérivés n'étaient plus actifs, il était fort probable que le résidu biotinylé soit important dans la structure de la cytokine et la liaison à son récepteur. Ces cytokines biotinylées permettent aussi de définir l'interaction de la cytokine et de son récepteur notamment au niveau de la spécificité, de la saturabilité, de l'affinité et de l'internalisation. Son utilisation en cytométrie en flux en a fait une méthode précise pour l'étude de l'expression des récepteurs au niveau cellulaire ^{167,168}. Plus récemment, cette technologie a été utilisée afin de mieux diriger une cytokine biotinylée au niveau de cellules cibles couplées à l'avidine. Par exemple, l'utilisation du TNF α comme agent anti-cancérigène a été difficile à cause de sa toxicité suite à une injection systémique. Une technique basée sur le couplage biotine/avidine permet de cibler spécifiquement le TNF α biotinylé au niveau des cellules tumorales ¹⁶⁹. L'injection chez la souris d'anticorps biotinylé spécifique d'un antigène tumoral suivi d'avidine amène à l'avidination des cellules tumorales *in vivo* ¹⁶⁹. Cette technique permet de mieux cibler le TNF α biotinylé à son site d'action et d'augmenter son activité anti-tumorale sans accroître sa toxicité. Cela a permis d'utiliser des doses plus faibles de TNF α pour obtenir un même effet thérapeutique ^{169,170}.

Afin d'étudier le profil d'expression des récepteurs de CNTF et CLC, nous avons décidé de biotinyler les cytokines CLC et CNTF. Comme technique de biotinylation, nous avons choisi d'utiliser la technologie AviTag qui est une méthode de couplage plus douce et plus facile que le couplage chimique. Cette technologie est basée sur l'utilisation d'une enzyme d'*Escherichia coli* (*E. coli*), l'holoenzyme biotine synthétase ou BirA ¹⁷¹⁻¹⁷³. Elle catalyse l'ajout de la biotine (ou vitamine H) par une liaison amide au niveau du résidu lysine de son seul substrat naturel, le BCCP (« biotin carboxyl carrier protein »). Les protéines biotinylées sont rares (il en existe une seule chez *E. coli*) et participent notamment à des réactions métaboliques de type carboxylation ou décarboxylation ¹⁷². Par criblage de banques de peptides, une

séquence minimale consensus de biotinylation a été identifiée^{171,173}. Cette séquence de 14 acides aminés (DLNDIFEAQKIEWH), beaucoup plus courte que la séquence originale du substrat de 75 résidus, peut être ajoutée en fusion à n'importe quelle protéine en N ou C terminal^{171,173}. L'ajout de ce motif permet la biotinylation au niveau du seul résidu lysine. Cette étiquette étant relativement petite, cela minimise les risques d'inactivation de la protéine à cause d'un encombrement stérique. De plus, les conditions de biotinylation sont relativement douces puisque les protéines peuvent être biotinylées directement *in vivo* dans les bactéries ou les cellules ou *in vitro* dans un tampon non dénaturant à pH 8,3¹⁷⁴. Cela limite les risques d'inactivation de la cytokine. Cette technique de biotinylation est utilisée couramment pour différentes applications comme la purification de protéines, la détection ou encore la génération de tétramères¹⁷⁵.

Comme nos cytokines peuvent être étiquetées en région carboxy terminal sans diminution de leur activité, nous avons ajouté en 3' des ADNc codant pour CNTF et CLC de souris une étiquette représentant ce motif minimal essentiel comme site de biotinylation^{171,173}.

Le CNTF pouvant être produit en bactérie en grande quantité tout en gardant son activité biologique, nous avons décidé de le biotinyler *in vivo* directement dans les bactéries (Article 1¹⁵⁴ et Article 3)¹⁷⁴. Pour cela, l'ADNc codant pour le CNTF a été cloné dans le vecteur pET24d(+). Comme le CNTF peut être étiqueté en région carboxy terminal sans diminution de son activité, nous avons ajouté en 3' de son ADNc une étiquette représentant le motif minimal essentiel comme site de biotinylation ainsi qu'une étiquette codant pour six histidines. L'expression du CNTF dans le vecteur pET24d(+) est sous le contrôle du promoteur T7. La protéine CNTF obtenue possède donc une étiquette 6 histidines permettant sa purification par chromatographie d'affinité et l'étiquette de biotinylation permettant sa biotinylation *in vivo*^{171,173,174}. La biotine ligase BirA a été clonée dans le vecteur pACYC184 et son expression est stimulée par l'IPTG. Ces deux vecteurs exprimant la biotine ligase BirA et le mCNTF ont été transformés dans les bactéries BL21(DE3) Star. Ces bactéries possèdent, intégré dans leur génome, le gène codant pour la T7 RNA

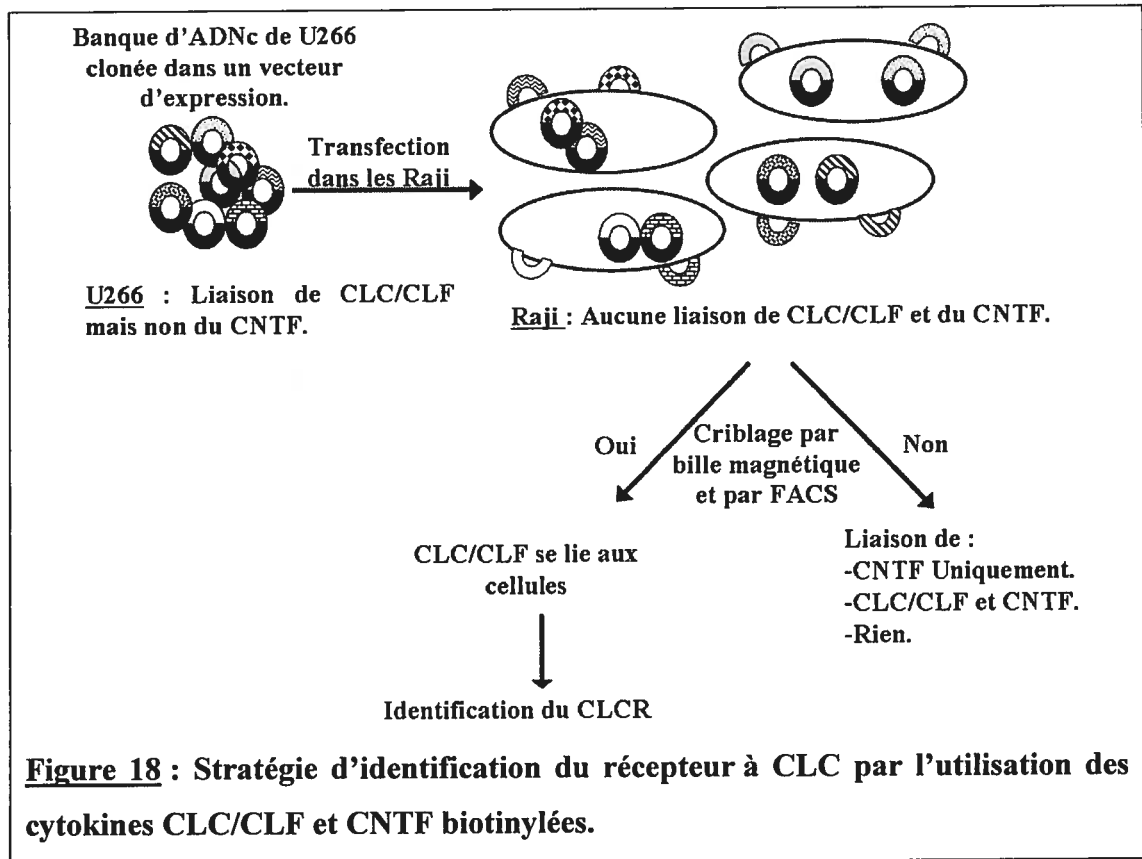
polymérase dont l'expression est sous le contrôle du promoteur LacUV5. L'expression de cette polymérase est induite par l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) et permet donc à son tour l'expression du CNTF cloné dans le vecteur pET24d(+). Les bactéries BL21(DE3) Star ont aussi une mutation dans le gène codant pour la RNaseE. La RNaseE est une enzyme responsable de la dégradation de l'ARNm et cette mutation permet d'améliorer la stabilité de l'ARNm produit dans les BL21(DE3) Star et donc d'augmenter le taux de production de protéine recombinante. L'expression des protéines BirA et mCNTF dans les BL21 (DE3) Star est donc induite par l'ajout d'IPTG. La présence de biotine dans le milieu de culture permet la biotinylation du résidu lysine de l'étiquette AviTag du CNTF par la biotine ligase BirA. Après la lyse des bactéries, le CNTF a été obtenu par double purification par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions puis sur une colonne d'avidine monomérique. Le CNTF ainsi obtenu est biotinylé et autant actif que la cytokine non biotinylée (Article 3).

La cytokine dimérique CLC/CLF de souris est quant à elle produite en système eucaryote. En effet, exprimée en bactérie, elle se retrouve sous forme insoluble dans des corps d'inclusion et nécessite donc des étapes de solubilisation et de renaturation qui conduisent à la production d'une protéine peu active. Les ADNc codant pour CLC et CLF de souris ont été clonés dans le vecteur d'expression pcDNA5/FRT (Article 2¹⁵⁶). CLC peut aussi être étiqueté en région carboxy terminal sans perte de son activité. À la suite de l'ADNc codant pour CLC et dans le même cadre de lecture, nous avons donc ajouté l'étiquette AviTag permettant la biotinylation^{171,173} et une étiquette Protéine C (ProtC) permettant sa purification et sa détection. Un IRES (« Internal Ribosome Entry Site ») a été ajouté entre les ADNc de CLC et CLF afin de permettre la co-expression des deux protéines au sein de la même cellule. Le plasmide pcDNA5/FRT possède des sites de recombinaison FRT qui permettent l'intégration par recombinaison homologue de ce plasmide au niveau de site accepteur dans une partie du génome des cellules 293 Flp-In transcriptionnellement active. Cette réaction est catalysée par une recombinase exprimée au niveau du

vecteur pOG44. La co-transfection des 293 Flp-In par pOG44 et le plasmide pcDNA5mCLCprotCAviTagmCLF permet donc l'obtention de transfectant stable exprimant le complexe CLC/CLF. Ce complexe est ensuite purifié à partir des surnageants de cellules transfectantes par chromatographie d'affinité sur colonne anti-ProtC. Bien que la biotinylation *in vivo* en système eucaryote soit possible, nous avons décidé pour des raisons de commodité de biotinyler ce complexe *in vitro* après cette étape de purification ¹⁷⁴. Cela consiste en une réaction enzymatique dans laquelle la protéine est mélangée à l'enzyme biotine ligase BirA, à de la biotine, de l'ATP (adénosine triphosphate) et un tampon adéquat ¹⁷⁴. La protéine biotinylée est ensuite purifiée sur colonne d'avidine monomérique. Ce complexe CLC/CLF biotinylé conserve une activité biologique identique à la cytokine non biotinylée ¹⁵⁶. Ces deux cytokines biotinylées CNTF et CLC/CLF de souris ont été validées pour la détection par cytométrie en flux de cellules transfectées exprimant le CNTFR humain ou murin mais aussi des lignées cellulaires (pour CNTF) ou des cellules primaires (pour CLC/CLF) exprimant de manière endogène le CNTFR (Article 2 et 3) ¹⁵⁶. Elles peuvent également être utilisées pour isoler les cellules exprimant le CNTFR par tri sur billes magnétiques.

Ces cytokines biotinylées ont été utilisées pour l'identification du récepteur spécifique à CLC/CLF. En effet, CLC est un facteur de prolifération des lymphocytes B ^{85,99} mais le CNTFR α n'a pas été retrouvé sur ces cellules ^{30,156}. Nous avons montré en utilisant ces cytokines biotinylées que CLC/CLF mais non CNTF pouvait se lier sur des lymphocytes B activés au LPS (Article 2) ¹⁵⁶. Cela laisse donc supposer l'existence d'un nouveau récepteur de CLC (CLCR) au niveau des lymphocytes B. Afin d'identifier ce nouveau récepteur, nous avons utilisé une stratégie basée sur le clonage par expression (Figure 18). CLC/CLF mais non le CNTF se lie sur la lignée de myélome humain U266 ce qui laisse supposer que ces cellules expriment exclusivement le récepteur de CLC/CLF mais non le CNTFR. La banque d'ADNc de cette lignée peut donc contenir l'ADNc codant pour ce nouveau récepteur. La lignée de lymphomes humain Raji est négative pour la liaison de

CLC/CLF ou du CNTF et est donc une lignée candidate pour la transfection de la banque d'ADNc de la lignée U266 contenant l'ADNc de CLCR. La banque d'ADNc des cellules U266 utilisée contenait plus de 50 millions d'ADNc indépendants ce qui augmente la probabilité de présence de l'ADNc complet du CLCR. Nous avons donc transfectés cette banque d'expression dans les Raji. Par tri magnétique, nous avons enrichi cette population pour les cellules liant CLC/CLF et exprimant donc potentiellement le CLCR que nous souhaitons identifier. Par tri cellulaire en cytométrie en flux, nous avons ensuite isolé les cellules positives pour la liaison de CLC/CLF. Après expansion des clones de cellules Raji obtenus par tri cellulaire, nous avons vérifié la capacité de liaison de CLC/CLF ou du CNTF à ces cellules. À cette étape, nous aurions souhaité obtenir au moins un clone positif pour la liaison à CLC/CLF mais non au CNTF. Dans ce cas, ce clone aurait pu contenir un vecteur d'expression possédant un ADNc du CLCR recherché. Après encore quelques cycles d'enrichissement, nous aurions pu obtenir l'ADNc du CLCR, ce qui nous aurait permis d'identifier ce nouveau récepteur recherché. Malheureusement, parmi les multiples clones criblés pour la liaison de CLC/CLF ou du CNTF, nous n'avons obtenu aucun résultat positif.



Cette technique ne nous a pas permis d'identifier le CLCR mais il nous sera possible de la réappliquer à partir d'une banque d'ADNc obtenue de lymphocytes B activés au LPS. En effet, ces cellules ne lient que le CLC/CLF et non le CNTF et expriment donc seulement le CLCR mais pas le CNTFR α . Nous pourrions aussi utiliser ces cytokines biotinylées afin de cribler par test de liaison de CLC et CNTF en cytométrie en flux des cellules transfectées avec des récepteurs candidats.

Ces deux cytokines biotinylées sont donc de nouveaux outils permettant une meilleure caractérisation des cellules exprimant le CNTF et le CLCR ainsi que l'identification de ce nouveau récepteur CLCR. Cela pourra permettre de cibler les cellules répondant soit à CLC soit au CNTF soit aux deux et ainsi de mieux prévoir leurs éventuels effets secondaires dus à une liaison sur des cellules non ciblées lors de leurs évaluations en essais pré-cliniques et cliniques. D'autres applications de ces dérivés sont aussi envisageables comme leur ciblage aux niveaux de cellules

envisagées (comme dans l'exemple du $\text{TNF}\alpha$), leur couplage au transporteur de la transferrine permettant leur passage de la membrane hémato-encéphalique ¹⁷⁶ et l'étude de leur biodisponibilité.

III. CLC/EBI3, une cytokine charnière entre les familles de l'IL6 et de l'IL12

Comme nous venons de le voir, CLC est produite et joue un rôle au niveau des lymphocytes B mais ses partenaires d'interaction nécessaires à sa sécrétion et à sa signalisation sont encore inconnus. Dans notre recherche des molécules pouvant interagir avec CLC, nous avons analysé les ressemblances structurales des cytokines les plus proches de CLC donc de la famille de l'IL6 et de l'IL12. Ces alignements multiples ont permis de démontrer que les résidus importants dans l'interaction via le site I ⁹³ sont conservés entre p28 et CLC. Or p28 se lie à EBI3 par son site I (Dr François Rousseau, communication personnelle). Nous avons donc émis l'hypothèse que CLC puisse interagir avec EBI3 pour induire sa sécrétion dans les cellules n'exprimant ni CLF ni $\text{CNTFR}\alpha$. De même, la modélisation de CLC et p28 a montré que l'organisation structurale du site I est conservée entre ces deux cytokines confirmant les résultats obtenus par alignement de séquences.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitations entre CLC et EBI3 de souris. CLC et EBI3 ont été exprimés de manière stable dans les cellules 293 Flp-In comme indiqué précédemment soit seul soit en co-expression. Dans ce système, CLC et EBI3 de souris peuvent être co-immunoprécipités à partir du lysat cellulaire ou du surnageant de cellules (Article 4). De plus, bien que le CLC de souris puisse être légèrement sécrétée seule, la co-expression avec EBI3 permet de fortement augmenter sa sécrétion. EBI3, à l'image de CLF et de $\text{CNTFR}\alpha$ dont il est homologue, permet donc de potentialiser la sécrétion de CLC dans ce système. Il semble aussi que l'expression de CLC soit fortement augmentée lorsque exprimée avec EBI3. La formation du complexe

CLC/EBI3 pourrait donc induire une meilleure expression ou stabilisation des protéines en jouant potentiellement un rôle protecteur au niveau de la dégradation par le protéasome.

À l'inverse du CLC humain qui n'est pas sécrétée seule dans un système de transfectant, le CLC de souris est légèrement sécrétée. Ce phénomène a également été rapporté pour une autre cytokine hétérodimérique, l'IL27⁹². En effet, la partie cytokine de ce complexe, p28 humaine, est totalement retenue dans le compartiment cellulaire alors que p28 de souris est sécrétée mais de manière inefficace. Ces différences de capacité de sécrétion entre l'humain et la souris au niveau de p28 et de CLC ne sont pas expliquées à ce jour. Il faut rappeler que CLC comme p28 possède un peptide signal mais que leur forme humaine n'est pas du tout sécrétée. Cependant, aucun motif de rétention connu n'a été retrouvé lors de l'analyse de leur séquence et aucun mécanisme permettant d'expliquer cette rétention n'a été identifié à ce jour. Il est possible que CLC comme p28 puisse interagir avec une autre molécule et que ce complexe soit retenu dans les organelles. Les différences au niveau des mécanismes de rétention et de sécrétion de CLC ou p28 entre l'humain et la souris pourraient donc provenir de variations d'affinité des cytokines avec un tel partenaire de rétention. Cependant, CLC humaine et murine sont fortement homologues à 96% et varient donc peu au niveau de leur séquence en acides aminés. Cela restreint donc le nombre de résidus potentiellement impliqués dans ces phénomènes de rétention/sécrétion. Par mutagenèse de ces résidus entre CLC humain et murin et analyse des mutants pour leur capacité de sécrétion/rétention, il devrait être possible de cartographier les acides aminés importants dans ce phénomène. Ainsi en interchangeant les résidus essentiels dans ce mécanisme entre la souris et l'humain, nous devrions être capables d'obtenir un mutant de CLC de souris totalement retenu en intracellulaire et un mutant de CLC humain ayant une faible capacité de sécrétion. L'identification de ce phénomène de rétention, soit comme supposé ici passant par la formation d'un complexe de la cytokine avec une molécule inhibitrice soit selon un autre mécanisme, permettrait de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de CLC et possiblement.

Afin de mieux caractériser l'interaction entre CLC et EBI3, nous avons décidé d'analyser l'effet de mutations de CLC au niveau d'acides aminés important dans sa liaison aux récepteurs par le site I. CLC se lie par son site I à CNTFR α et les résidus impliqués dans cette interaction ont été caractérisés⁹³. La substitution de l'alanine 60 de CLC en acide glutamique inhibe l'interaction de CLC et du CNTFR α , en particulier cela induit une suppression de sécrétion de CLC avec le CNTFR α et de liaison de CLC aux cellules exprimant le CNTFR α . Cette alanine de CLC correspond à une valine dans p28, mais ces deux acides aminés sont des résidus non polaires et donc fortement homologues. À l'opposé de ce que nous attendions, cette mutation A60E de CLC n'abolit ni l'interaction de CLC et EBI3 ni la potentialisation de sécrétion de CLC par EBI3. Ce résidu n'est donc pas essentiel pour la liaison de CLC et EBI3. Cependant, d'autres acides aminés sont importants dans l'interaction de CLC et du CNTFR α au niveau du site I. En effet, le tryptophane 67, l'arginine 170 et l'acide aspartique 174 jouent un rôle crucial dans cette association⁹³. Il est donc plus probable que ces acides aminés puissent eux avoir un rôle prépondérant dans la liaison de CLC et de EBI3 à l'inverse de l'arginine 60. La génération de ces mutants et leur caractérisation est actuellement en cours dans notre laboratoire. Cependant, EBI3 et CLF sont aussi homologues. Il est donc possible qu'à l'inverse de ce qui a été prédit par modélisation moléculaire, CLC puisse interagir avec EBI3 au niveau du site III qui est le site de liaison de CLC à CLF. Les résidus important dans la liaison de CLC à CLF par le site III ont également été cartographiés⁹³. Nous souhaitons donc aussi analyser l'influence de telles mutations au niveau de l'interaction de CLC et de EBI3. Une meilleure compréhension des sites de liaison de CLC et EBI3 pourrait nous aider à mieux comprendre la dynamique d'association de CLC avec ses divers partenaires d'interaction.

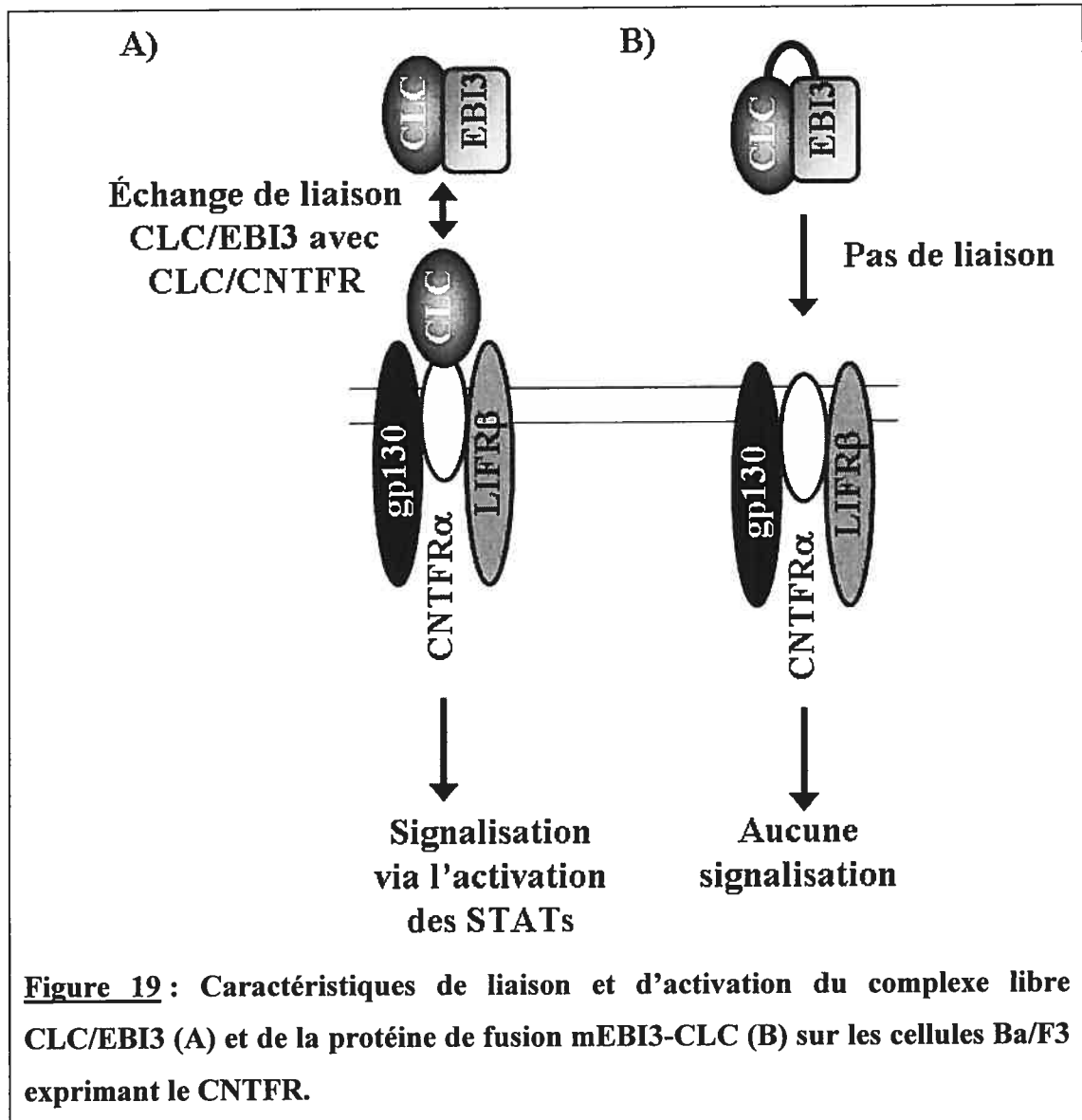
EBI3 et CLC peuvent s'associer ensemble et ce complexe permet la sécrétion active de CLC. Mais quel est le rôle biologique de ce complexe? Nous avons montré que les ARNm codant pour CLC et EBI3 sont co-localisés au niveau de différents organes comme le cerveau, le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques, le poumon,

l'intestin, l'utérus et les testicules. Dans la plupart de ces organes, CLF ou CNTFR α sont aussi retrouvés et peuvent donc former un complexe stable sécrété avec CLC. Par contre, au niveau de la rate CLC et EBI3 semble être exprimés seuls, notamment au niveau des lymphocytes B, des monocytes, des macrophages et des DCs. Ce complexe pourrait permettre la sécrétion de CLC au niveau de ces cellules. De plus, CLC est un facteur de prolifération de cellules B et nous avons montré que CLC/CLF comme la protéine de fusion scEBI3-CLC se lie sur les lymphocytes B activés au LPS. Cela laisse donc suggérer que notre protéine de fusion scEBI3-CLC est active et se lie spécifiquement sur un récepteur présent au niveau des cellules de rate et de moelle osseuse activées au LPS. Il est probable que CLC seule puisse se lier à ce récepteur puisque CLC/CLF comme CLC/EBI3 peuvent interagir avec ce récepteur. Cependant, l'expression de EBI3 est fortement activée par le LPS et l'activation des TLR¹²⁶. De plus, EBI3, bien que n'ayant pas de motif d'ancrage à la membrane, a été retrouvé à la membrane plasmique de transfectants surexprimant cette protéine laissant supposer sa liaison à une protéine intramembranaire¹²³. Il est donc possible d'envisager que la liaison que nous avons observée de CLC/CLF au niveau de lymphocytes B activés au LPS puisse être due à une interaction de CLC avec EBI3. Malheureusement, le manque d'outils de détection pour EBI3 ne nous a pas permis de prouver la présence de EBI3 à la membrane plasmique des lymphocytes B activés. En effet, les rares anticorps anti-EBI3 existants ont été retirés du marché pour manque d'efficacité. Nous pouvons cependant imaginer une sécrétion active de CLC/EBI3 au niveau des cellules susmentionnées et une liaison de ce complexe sur un récepteur membranaire non encore identifié responsable des activités biologiques de ce complexe.

Nous avons pu démontré que la sécrétion du complexe CLC/EBI3 pouvait amener à des activités de type CLC. En effet, le surnageant de cellules exprimant CLC/EBI3 ou la protéine purifiée de ce complexe permet la liaison, la prolifération et la phosphorylation des STATs de cellules Ba/F3 exprimant le CNTFR mais non de cellules exprimant juste le LIFR (Figure 19A). Afin de stabiliser ce complexe, nous

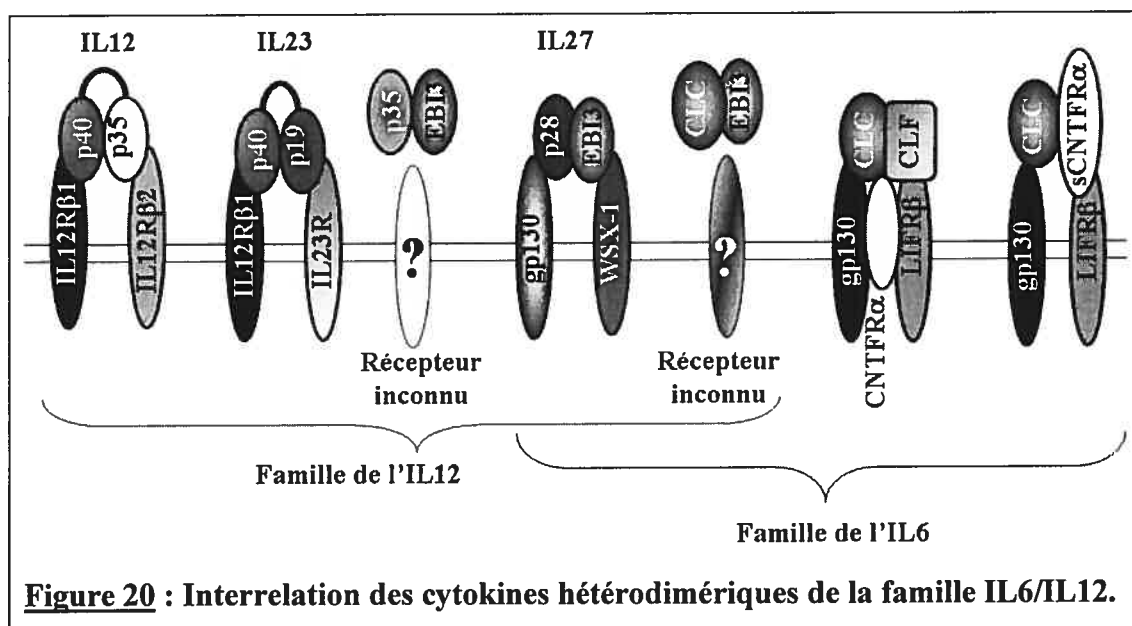
avons créé une protéine de fusion entre EBI3 et CLC (scEBI3-CLC) relié entre elles par une liaison flexible comme cela a été montré pour l'IL27 ou CLC/CNTFR α ^{92,96}. Cette protéine de fusion est incapable de se lier et d'activer les cellules Ba/F3 exprimant le CNTFR ou le LIFR (Figure 19B). Les différences de liaison et d'activation du complexe libre CLC/EBI3 et de la protéine de fusion peuvent être expliquées de plusieurs façons. Tout d'abord, il est possible que la protéine de fusion ne soit plus active à cause d'un mauvais repliement ou d'un encombrement stérique différent empêchant la liaison au récepteur. Malheureusement, aucun test fonctionnel ne peut démontrer l'activité ou l'inactivation de cette protéine de fusion. Une autre possibilité serait que seul CLC s'associe au CNTFR et que dans le complexe CLC/EBI3, il y ait déplacement de la liaison de CLC avec EBI3 vers une association de CLC à CNTFR (Figure 19A). Dans ce cas-là, le renforcement de la liaison de CLC à EBI3 dans la protéine de fusion peut bloquer le site I impliqué dans la liaison avec le CNTFR. Cette dernière hypothèse laisse donc suggérer que la voie de signalisation de CLC/EBI3 n'implique pas sa liaison au CNTFR mais passe à travers l'activation d'un autre récepteur à identifier.

À ce jour, nos efforts pour déterminer le récepteur à CLC/EBI3 ainsi que ses effets physiologiques n'ont pas porté leurs fruits. Nous avons cependant observé une augmentation de prolifération des lymphocytes B pré-activés par une faible quantité de LPS laissant suggérer un rôle au niveau du système immunitaire et notamment au niveau des lymphocytes B. Afin de mieux caractériser le rôle de cette cytokine composite, nous sommes en train de générer au laboratoire des souris transgéniques exprimant CLC/EBI3 soit en complexe individuel soit en fusion sous le contrôle du promoteur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de régions régulatrices des immunoglobulines. Ces cytokines seront donc exprimées principalement au niveau des lymphocytes T et B, des DC, des macrophages et des microglies. Nous espérons que l'analyse de ces souris transgéniques nous permettra de mieux définir un rôle spécifique au complexe CLC/EBI3.



La découverte de cette nouvelle cytokine hétérodimérique monte à sept le nombre de cytokines existant sur ce modèle : l'IL12 (p35/p40), l'IL23 (p19/p40), l'IL27 (p28/EBI3), p35/EBI3, CLC/CLF, CLC/sCNTFR α et CLC/EBI3. Dans tous les cas, la partie cytokine (p35, p19, p28, CLC) doit interagir avec un récepteur soluble de type 1 (p40, EBI3, CLF, sCNTFR α) afin d'être sécrétée activement. Ces cytokines hétérodimériques sont classées dans deux familles différentes : les familles de l'IL6 et de l'IL12. Les parties cytokines et les parties récepteurs solubles respectivement

possèdent de fortes homologies entre elles. Ces deux familles de cytokines sont donc intimement liées. L'IL27 et CLC/EBI3 sont à la frontière entre ces deux familles (Figure 20). En effet, l'IL27 se lie à un récepteur composé de gp130 ce qui est la caractéristique des cytokines de la famille de l'IL6 et CLC/EBI3 forme un complexe dimérique entre une cytokine de la famille de l'IL6 et un récepteur soluble de la famille de l'IL27.



Le nombre de cytokines hétérodimériques de cette famille ne fait qu'augmenter. Existe-t-il encore d'autres possibilités d'association potentielle de sous-unité cytokine avec une sous-unité récepteur soluble pouvant agir sur un récepteur membranaire? Et quels sont les rôles biologiques exacts de tels complexes? Lorsque nous comparons attentivement ces complexes, nous pouvons observer quelques différences au niveau de leur fonction et mode d'action. Tout d'abord, pour l'IL12, l'IL23, l'IL27 et CLC/sCNTFRα, le récepteur soluble (p40, EBI3 et sCNTFRα) est nécessaire non seulement à la sécrétion de la partie cytokine (p35, p19, p28 et CLC) mais aussi à son association au récepteur membranaire (IL12R, IL23R, IL27R et LIFR) afin d'induire la signalisation cellulaire. De plus, ces récepteurs membranaires

ne sont composés que de deux chaînes transductrices du signal. Pour CLC/CLF, la situation se complique car à la place de quatre unités comme pour les autres cytokines précédemment citées, ce complexe en possède cinq. Cependant, alors que CLF est indispensable à la sécrétion de CLC, ce dernier n'est pas strictement essentiel à sa liaison au CNTFR. CLF potentialise l'association de CLC au CNTFR mais il se peut qu'un échange se fasse entre le complexe CLC/CLF et CLC/CNTFR. Enfin, pour p35/EBI3 et le complexe CLC/EBI3 que nous avons découvert, le récepteur soluble EBI3 est obligatoire pour la sécrétion de la partie cytokine p35 ou CLC. Cependant, à ce jour aucun récepteur membranaire ni aucune activité biologique n'ont été identifiés pour p35/EBI3. Est-ce que un tel complexe ne pourrait pas jouer un rôle dans la modération des actions de p35 et de EBI3 par leur séquestration dans un complexe inactif lorsque ces sous-unités sont exprimées en trop forte quantité? De telles hypothèses ont aussi été émises pour les éventuels homodimères composés des parties cytokines ou récepteur solubles seuls.

Enfin, nous pouvons remarquer qu'il existe deux catégories de cytokine composite : des complexes stabilisés par des ponts disulfures (l'IL12 et l'IL23) ou des complexes plus libres et non stabilisés par ces ponts disulfures (l'IL27, CLC/CLF, CLC/sCNTFR α , CLC/EBI3, p35/EBI3). Il serait possible que les cytokines stabilisées puissent jouer un rôle non seulement au niveau local entre la cellule sécrétrice et effectrice mais aussi de manière plus systémique sur des cellules cibles éloignées. À l'opposé, les cytokines composites moins stables pourraient induire leur action uniquement de manière locale au niveau de la synapse neurologique, immunologique ou neuro-immunologique par exemple.

Les cytokines de cette superfamille IL6/IL12 forment donc un groupe hétérogène avec une imbrication de différentes sous-unités dans plusieurs complexes amenant à un schéma compliqué de leur expression, régulation et activité. Comme ces cytokines sont des cibles potentielles dans les traitements thérapeutiques de différentes maladies, il est primordial d'arriver à démêler les interactions de chaque partenaire ainsi que les effets biologiques afin de mieux apprécier les effets cliniques désirables

des effets secondaires envisageables. Cela permettra une utilisation plus sécuritaire et mieux cibler des ces cytokines en clinique.

Conclusion

Ces études nous ont donc permis d'obtenir une meilleure caractérisation de deux cytokines de la famille de l'IL6 : le CNTF et CLC.

Nous avons tout d'abord analysé la spécificité de liaison du CNTF de souris pour son récepteur. Le CNTF de souris possède donc une plus forte affinité pour le CNTFR α de souris que le CNTFR α humain alors que le CNTF humain ne montre pas de différence d'affinité entre le récepteur humain et murin. De plus, à l'inverse du CNTF de rat, le CNTF de souris ne se lie pas de manière détectable aux cellules n'exprimant que LIFR β et gp130 (Article 1 ¹⁵⁴). Enfin, la présence de la glutamine 63 l'empêche de se lier à l'IL6R α à l'inverse du CNTF humain. Ces caractéristiques confèrent donc une spécificité d'action du CNTF de souris au CNTFR α et pourrait permettre d'éviter le développement de certains effets secondaires observés chez l'Homme avec le CNTF humain. Comme le CNTF possède des activités neuroprotectrices, nous avons évalué son effet thérapeutique dans un modèle murin de sclérose en plaques. L'administration journalière du CNTF de souris avant l'apparition des symptômes de la maladie permet d'améliorer l'état clinique des animaux dans ce modèle de sclérose en plaques ¹⁵⁵ (Annexe, Article 5). Contre toutes attentes, les effets thérapeutiques du CNTF semblent être principalement dus à une forte diminution de l'inflammation au niveau de la moelle épinière. Les mécanismes inhibiteurs de l'inflammation du CNTF dans ce modèle restent encore à être élucidés. CLC et CNTF agissent tout deux sur le récepteur au CNTF. Cependant, plusieurs hypothèses laissent suggérer l'existence d'un récepteur spécifique à CLC : CLCR. Afin de pouvoir différencier les cellules répondant au CNTF, à CLC ou aux deux, nous avons générés des cytokines biotinylées permettant entre autre la détection par cytométrie en flux de cellules exprimant leurs récepteurs (Articles 2 ¹⁵⁶ et 3). Ces outils ont été utilisés dans notre laboratoire en vue de l'identification du CLCR. Nous avons entre autre montré que CLC et non le CNTF se liait à une contre structure présente sur les lymphocytes B activés (Article 2 ¹⁵⁶). Mais à ce jour, nous n'avons

pas encore réussi à identifier ce nouveau CLCR. Par contre, nous avons prouvé l'existence d'une nouvelle cytokine hétérodimérique composé de CLC et de EBI3 (Article 4). La formation de ce complexe est nécessaire à la sécrétion de CLC et pourrait être à l'origine des effets biologiques de CLC au niveau du système immunitaire.

Nous espérons que ces résultats permettront de mieux définir les cibles potentielles du CNTF et du CLC et qu'ils pourront conduire à des essais pré-cliniques et cliniques de ces cytokines avec une meilleure appréciation des effets bénéfiques potentiels et des réactions secondaires possibles.

Bibliographie

1. Bravo, J. & Heath, J. K. Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J.* **19**, 2399-2411 (2000).
2. Heinrich, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* -20 (2003).
3. Hinds, M. G., Maurer, T., Zhang, J. G., Nicola, N. A. & Norton, R. S. Solution structure of leukemia inhibitory factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 13738-13745 (1998).
4. Somers, W., Stahl, M. & Seehra, J. S. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.* **16**, 989-997 (1997).
5. Elson, G. C. *et al.* CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* -72 (2000).
6. Plun-Favreau, H. *et al.* The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J* -703 (2001).
7. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* **334** (Pt 2), 297-314 (1998).
8. Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E. & Garcia, K. C. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* **300**, 2101-2104 (2003).
9. Varghese, J. N. *et al.* Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 15959-15964 (2002).
10. O'Shea, J. J., Gadina, M. & Schreiber, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-S131 (2002).
11. Adler, R., Landa, K. B., Manthorpe, M. & Varon, S. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* **204**, 1434-1436 (1979).

12. Lin, L. F., Armes, L. G., Sommer, A., Smith, D. J. & Collins, F. Isolation and characterization of ciliary neurotrophic factor from rabbit sciatic nerves. *J. Biol Chem.* **265**, 8942-8947 (1990).
13. Lin, L. F. *et al.* Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* **246**, 1023-1025 (1989).
14. Stockli, K. A. *et al.* Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* **342**, 920-923 (1989).
15. Lam, A. *et al.* Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor. *Gene* **102**, 271-276 (1991).
16. Masiakowski, P. *et al.* Recombinant human and rat ciliary neurotrophic factors. *J. Neurochem.* **57**, 1003-1012 (1991).
17. Negro, A. *et al.* Cloning and expression of human ciliary neurotrophic factor. *Eur. J. Biochem.* **201**, 289-294 (1991).
18. Davis, S. *et al.* The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* **253**, 59-63 (1991).
19. McDonald, J. R., Ko, C., Mismer, D., Smith, D. J. & Collins, F. Expression and characterization of recombinant human ciliary neurotrophic factor from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1090**, 70-80 (1991).
20. Koh, S. W. Ciliary neurotrophic factor released by corneal endothelium surviving oxidative stress *ex vivo*. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2887-2896 (2002).
21. Reiness, C. G. *et al.* Chick ciliary neurotrophic factor is secreted via a nonclassical pathway. *Mol. Cell Neurosci.* **17**, 931-944 (2001).
22. Panayotatos, N. *et al.* Exchange of a single amino acid interconverts the specific activity and gel mobility of human and rat ciliary neurotrophic factors. *J. Biol Chem.* **268**, 19000-19003 (1993).
23. Donaldson, D. H., Britt, D. E., Jones, C., Jackson, C. L. & Patterson, D. Localization of the gene for the ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR) to human chromosome 9. *Genomics* **17**, 782-784 (1993).
24. Valenzuela, D. M. *et al.* Genomic organization and chromosomal localization of the human and mouse genes encoding the alpha receptor component for ciliary neurotrophic factor. *Genomics* **25**, 157-163 (1995).

25. Ip, F. C., Fu, A. K., Tsim, K. W. & Ip, N. Y. Cloning of the alpha component of the chick ciliary neurotrophic factor receptor: developmental expression and down-regulation in denervated skeletal muscle. *J. Neurochem.* **65**, 2393-2400 (1995).
26. Ip, N. Y. *et al.* 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 (1993).
27. Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., Hughes, R. A. & Thoenen, H. Ciliary neurotrophic factor. *J. Neurobiol.* **25**, 1436-1453 (1994).
28. Dallner, C., Woods, A. G., Deller, T., Kirsch, M. & Hofmann, H. D. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* **37**, 374-378 (2002).
29. Ip, N. Y. & Yancopoulos, G. D. The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 491-515 (1996).
30. Sleeman, M. W., Anderson, K. D., Lambert, P. D., Yancopoulos, G. D. & Wiegand, S. J. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm. Acta Helv.* **74**, 265-272 (2000).
31. Beltran, W. A. *et al.* Cloning, mapping, and retinal expression of the canine ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha). *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 3642-3649 (2003).
32. Davis, S. *et al.* LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* **260**, 1805-1808 (1993).
33. Panayotatos, N. *et al.* Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines. *J. Biol Chem.* **270**, 14007-14014 (1995).
34. Gearing, D. P. *et al.* Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 1119-1123 (1994).
35. Schuster, B. *et al.* Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J. Biol. Chem.* **278**, 9528-9535 (2003).
36. Masu, Y. *et al.* Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* **365**, 27-32 (1993).

37. Takahashi, R. *et al.* A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet.* **7**, 79-84 (1994).
38. Giess, R. *et al.* Potential implications of a ciliary neurotrophic factor gene mutation in a German population of patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve* -8 (1998).
39. Giess, R. *et al.* Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* **59**, 407-409 (2002).
40. Hoffmann, V., Pohlau, D., Przuntek, H., Epplen, J. T. & Hardt, C. A null mutation within the ciliary neurotrophic factor (CNTF)-gene: implications for susceptibility and disease severity in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun.* **3**, 53-55 (2002).
41. DeChiara, T. M. *et al.* Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* **83**, 313-322 (1995).
42. Sendtner, M., Kreutzberg, G. W. & Thoenen, H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* **345**, 440-441 (1990).
43. Sendtner, M. *et al.* Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* **358**, 502-504 (1992).
44. Arakawa, Y., Sendtner, M. & Thoenen, H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J. Neurosci.* **10**, 3507-3515 (1990).
45. Clatterbuck, R. E., Price, D. L. & Koliatsos, V. E. Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 2222-2226 (1993).
46. Murphy, M., Dutton, R., Koblar, S., Cheema, S. & Bartlett, P. Cytokines which signal through the LIF receptor and their actions in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **52**, 355-378 (1997).
47. Anderson, K. D., Panayotatos, N., Corcoran, T. L., Lindsay, R. M. & Wiegand, S. J. Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 7346-7351 (1996).
48. Emerich, D. F. *et al.* Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* **386**, 395-399 (1997).

49. Emerich, D. F. & Winn, S. R. Neuroprotective effects of encapsulated CNTF-producing cells in a rodent model of Huntington's disease are dependent on the proximity of the implant to the lesioned striatum. *Cell Transplant.* **13**, 253-259 (2004).
50. Mittoux, V. *et al.* Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1177-1187 (2000).
51. de Almeida, L. P., Zala, D., Aebischer, P. & Deglon, N. Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **8**, 433-446 (2001).
52. Linker, R. A. *et al.* CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* -4 (2002).
53. Linker, R. A., Sendtner, M. & Gold, R. Mechanisms of axonal degeneration in EAE--lessons from CNTF and MHC I knockout mice. *J. Neurol. Sci.* **233**, 167-172 (2005).
54. Keegan, B. M. & Noseworthy, J. H. Multiple sclerosis. *Annu. Rev. Med.* **53**, 285-302 (2002).
55. Owens, T. The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage. *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 259-265 (2003).
56. Aron, R. & Aharoni, R. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101 Suppl 2**, 14593-14598 (2004).
57. Farina, C., Weber, M. S., Meinl, E., Wekerle, H. & Hohlfeld, R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol.* **4**, 567-575 (2005).
58. Polman, C. H. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 899-910 (2006).
59. Ropper, A. H. Selective treatment of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 965-967 (2006).
60. Rudick, R. A. *et al.* Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 911-923 (2006).

61. Steinman, L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 510-518 (2005).
62. D'Souza, S. D., Alinauskas, K. A. & Antel, J. P. Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J. Neurosci. Res.* **43**, 289-298 (1996).
63. Louis, J. C., Magal, E., Takayama, S. & Varon, S. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* **259**, 689-692 (1993).
64. Stankoff, B. *et al.* Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J. Neurosci.* **22**, 9221-9227 (2002).
65. Massaro, A. R., Soranzo, C. & Carnevale, A. Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients. *Eur. Neurol.* **37**, 243-246 (1997).
66. A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group. *Neurology* **46**, 1244-1249 (1996).
67. Gloaguen, I. *et al.* Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 6456-6461 (1997).
68. Sleeman, M. W. *et al.* Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 14297-14302 (2003).
69. Lambert, P. D. *et al.* Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 4652-4657 (2001).
70. Watt, M. J. *et al.* CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat. Med.* (2006).
71. Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E. & Flier, J. S. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* **1**, 619-625 (1998).
72. Frederich, R. C. *et al.* Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* **1**, 1311-1314 (1995).

73. Howard, J. K. *et al.* Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat. Med.* **10**, 734-738 (2004).
74. Munzberg, H. *et al.* Screening for variability in the ciliary neurotrophic factor (CNTF) gene: no evidence for association with human obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **106**, 108-112 (1998).
75. Vergara, C. & Ramirez, B. CNTF, a pleiotropic cytokine: emphasis on its myotrophic role. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **47**, 161-173 (2004).
76. Bongioanni, P., Reali, C. & Sogos, V. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD004302 (2004).
77. Miller, R. G. *et al.* A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann. Neurol.* **39**, 256-260 (1996).
78. Miller, R. G. *et al.* Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **47**, 1329-1331 (1996).
79. Dittrich, F., Thoenen, H. & Sendtner, M. Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann. Neurol.* **35**, 151-163 (1994).
80. Aebischer, P. *et al.* Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat. Med.* **2**, 696-699 (1996).
81. Bloch, J. *et al.* Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum. Gene Ther.* **15**, 968-975 (2004).
82. Ettinger, M. P. *et al.* Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA* **289**, 1826-1832 (2003).
83. Sieving, P. A. *et al.* Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 3896-3901 (2006).
84. Shi, Y. *et al.* Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* -8 (1999).

85. Senaldi, G. *et al.* 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 (1999).
86. Vlotides, G., Zitzmann, K., Stalla, G. K. & Auernhammer, C. J. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine Growth Factor Rev* **36** (2004).
87. de Bovis, B. *et al.* clc is co-expressed with clf or cntfr in developing mouse muscles. *Cell Commun Signal* (2005).
88. Forger, N. G. *et al.* Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* **8** (2003).
89. Uemura, A. *et al.* Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* **7** (2002).
90. Alexander, W. S. *et al.* Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* **8** (1999).
91. Elson, G. C. *et al.* Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol* **9** (1998).
92. Pflanz, S. *et al.* IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* **90** (2002).
93. Perret, D. *et al.* 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** (2004).
94. Lelievre, E. *et al.* 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* **84** (2001).
95. Derouet, D. *et al.* Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **32** (2004).
96. Guillet, C. *et al.* Functionally active fusion protein of the novel composite cytokine CLC/soluble CNTF receptor. *Eur J Biochem* **41** (2002).
97. Auernhammer, C. J. *et al.* Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) stimulates corticotroph function via a signal transducer

and activator of transcription-dependent mechanism negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. *Endocrinology* -10 (2003).

98. Schuettauf, F. *et al.* Neuroprotective effects of cardiotrophin-like cytokine on retinal ganglion cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* -42 (2005).

99. Senaldi, G. *et al.* Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol* -8 (2002).

100. Vlotides, G. *et al.* Expression of novel neurotrophin-1/B-cell stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3) in murine pituitary folliculostellate TtT/GF cells: pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide-induced stimulation of NNT-1/BSF-3 is mediated by protein kinase A, protein kinase C, and extracellular-signal-regulated kinase1/2 pathways. *Endocrinology* **145**, 716-727 (2004).

101. Burger, R. *et al.* Functional significance of novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) for human myeloma cell growth and survival. *Br J Haematol* -78 (2003).

102. Schmidt-Ott, K. M. *et al.* Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol* -2002 (2005).

103. Kraves, S. & Weitz, C. J. A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat. Neurosci.* **9**, 212-219 (2006).

104. Knappskog, P. M. *et al.* Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum. Genet.* **72**, 375-383 (2003).

105. Sohar, E., Shoenfeld, Y., Udassin, R., Magazanik, A. & Revach, M. Cold-induced profuse sweating on back and chest. A new genetic entity? *Lancet* **2**, 1073-1074 (1978).

106. Rousseau, F. *et al.* 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 (2006).

107. Holscher, C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med Microbiol Immunol (Berl)* -17 (2004).

108. Kobayashi, M. *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**, 827-845 (1989).

109. Wolf, S. F. *et al.* Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**, 3074-3081 (1991).
110. Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* **19**, 641-644 (2003).
111. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133-146 (2003).
112. Presky, D. H. *et al.* A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14002-14007 (1996).
113. van, d., V, Lichtenauer-Kaligis, E. G., van Dissel, J. T. & Ottenhoff, T. H. Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics* **54**, 817-829 (2003).
114. Sprecher, C. A. *et al.* Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 82-90 (1998).
115. Brombacher, F., Kastelein, R. A. & Alber, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* -12 (2003).
116. Oppmann, B. *et al.* 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 (2000).
117. Vandebroeck, K., Alloza, I., Gadina, M. & Matthys, P. Inhibiting cytokines of the interleukin-12 family: recent advances and novel challenges. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 145-160 (2004).
118. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* **278**, 1910-1914 (2003).
119. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123-1132 (2005).
120. Iwakura, Y. & Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest* **116**, 1218-1222 (2006).

121. Dong, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 329-333 (2006).
122. Hunter, C. A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* -31 (2005).
123. Devergne, O. *et al.* A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. *J Virol* -53 (1996).
124. Devergne, O., Birkenbach, M. & Kieff, E. 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 (1997).
125. Maaser, C., Egan, L. J., Birkenbach, M. P., Eckmann, L. & Kagnoff, M. F. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3 and other interleukin-12-related molecules by human intestinal epithelium. *Immunology* -45 (2004).
126. Wirtz, S. *et al.* EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol* -24 (2005).
127. Nieuwenhuis, E. E. *et al.* Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* -6 (2002).
128. Zahn, S. *et al.* Impaired Th1 responses in mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 and challenged with physiological doses of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* -12 (2005).
129. Robinson, D. S. & O'Garra, A. Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* -8 (2002).
130. Pflanz, S. *et al.* WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* -31 (2004).
131. Chen, Q. *et al.* Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* **407**, 916-920 (2000).
132. Villarino, A. V. *et al.* Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol* -91 (2005).
133. Takeda, A. *et al.* Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* -90 (2003).

134. Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J. & de Sauvage, F. J. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* -52 (2003).
135. Kamiya, S. *et al.* An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* -7 (2004).
136. Morishima, N. *et al.* Augmentation of effector CD8+ T cell generation with enhanced granzyme B expression by IL-27. *J Immunol* -93 (2005).
137. Yoshida, H. *et al.* WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity*. **15**, 569-578 (2001).
138. Bancroft, A. J., Humphreys, N. E., Worthington, J. J., Yoshida, H. & Grencis, R. K. WSX-1: a key role in induction of chronic intestinal nematode infection. *J Immunol*. **172**, 7635-7641 (2004).
139. Hunter, C. A., Villarino, A., Artis, D. & Scott, P. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol Rev* -14 (2004).
140. Villarino, A. *et al.* The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*. **19**, 645-655 (2003).
141. Hamano, S. *et al.* WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity*. **19**, 657-667 (2003).
142. Holscher, C. *et al.* The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol*. **174**, 3534-3544 (2005).
143. Yamanaka, A. *et al.* Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol*. **172**, 3590-3596 (2004).
144. Artis, D. *et al.* The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* -34 (2004).
145. Artis, D. *et al.* 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* -5 (2004).
146. Hisada, M. *et al.* Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res*. **64**, 1152-1156 (2004).

147. Salcedo, R. *et al.* IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8+ T cells. *J. Immunol.* **173**, 7170-7182 (2004).
148. Yoshimoto, T. *et al.* Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *J Immunol* -85 (2004).
149. Li, J., Gran, B., Zhang, G. X., Rostami, A. & Kamoun, M. IL-27 subunits and its receptor (WSX-1) mRNAs are markedly up-regulated in inflammatory cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* -2 (2005).
150. Sonobe, Y. *et al.* Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations. *Brain Res* -2 (2005).
151. Goldberg, R. *et al.* Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* -71 (2004).
152. Goldberg, R., Wildbaum, G., Zohar, Y., Maor, G. & Karin, N. Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J Immunol* -8 (2004).
153. Devergne, O., Coulomb-L'Hermine, A., Capel, F., Moussa, M. & Capron, F. Expression of Epstein-Barr virus-induced gene 3, an interleukin-12 p40-related molecule, throughout human pregnancy: involvement of syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts. *Am J Pathol* -76 (2001).
154. Cognet, I. *et al.* 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 (2004).
155. Kuhlmann, T. *et al.* Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* **169**, 584-598 (2006).
156. Cognet, I. *et al.* 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 (2005).
157. Peterson, W. M., Wang, Q., Tzekova, R. & Wiegand, S. J. Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J. Neurosci.* **20**, 4081-4090 (2000).
158. Butzkueven, H. *et al.* LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat Med* **8**, 613-619 (2002).

159. Shapiro, L., Panayotatos, N., Meydani, S. N., Wu, D. & Dinarello, C. A. Ciliary neurotrophic factor combined with soluble receptor inhibits synthesis of proinflammatory cytokines and prostaglandin-E2 in vitro. *Exp. Cell Res.* **215**, 51-56 (1994).
160. Demitri, M. T. *et al.* Protective effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in a model of endotoxic shock: action mechanisms and role of CNTF receptor alpha. *J. Inflamm.* **48**, 47-55 (1998).
161. Benigni, F. *et al.* Ciliary neurotrophic factor inhibits brain and peripheral tumor necrosis factor production and, when coadministered with its soluble receptor, protects mice from lipopolysaccharide toxicity. *Mol. Med.* **1**, 568-575 (1995).
162. Meazza, C. *et al.* Centrally mediated inhibition of local inflammation by ciliary neurotrophic factor. *Neuroimmunomodulation.* **4**, 271-276 (1997).
163. Foxwell, B. M. *et al.* Biotinylated recombinant interleukin-2. A tool for research on the interleukin-2 receptor. *J. Immunol. Methods* **113**, 221-229 (1988).
164. Newman, W., Beall, L. D., Bertolini, D. R. & Cone, J. L. Modulation of TGF-beta type 1 receptor: flow cytometric detection with biotinylated TGF-beta. *J. Cell Physiol* **141**, 170-180 (1989).
165. Wojchowski, D. M. & Caslake, L. Biotinylated recombinant human erythropoietins: bioactivity and utility as receptor ligand. *Blood* **74**, 952-958 (1989).
166. Yem, A. W. *et al.* Biotinylation of reactive amino groups in native recombinant human interleukin-1 beta. *J. Biol. Chem.* **264**, 17691-17697 (1989).
167. Taki, S., Shimamura, T., Abe, M., Shirai, T. & Takahara, Y. Biotinylation of human interleukin-2 for flow cytometry analysis of interleukin-2 receptors. *J. Immunol. Methods* **122**, 33-41 (1989).
168. Wognum, A. W., Lansdorp, P. M., Humphries, R. K. & Krystal, G. Detection and isolation of the erythropoietin receptor using biotinylated erythropoietin. *Blood* **76**, 697-705 (1990).
169. Gasparri, A. *et al.* Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. *Cancer Res.* **59**, 2917-2923 (1999).
170. Zimmermann, V. S. *et al.* Characterisation of functional biotinylated TNF-alpha targeted to the membrane of apoptotic melanoma cells. *J. Immunol. Methods* **276**, 79-87 (2003).

171. Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P. J. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* **8**, 921-929 (1999).
172. Cronan, J. E., Jr. Biotinylation of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 10327-10333 (1990).
173. Schatz, P. J. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N. Y.)* **11**, 1138-1143 (1993).
174. Cull, M. G. & Schatz, P. J. Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags. *Methods Enzymol.* **326**, 430-440 (2000).
175. Altman, J. D. *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96 (1996).
176. Qian, Z. M., Li, H., Sun, H. & Ho, K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* **54**, 561-587 (2002).

Annexe

Article 5 : Continued administration of Ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Publication : The American Journal of Pathology, August 2006, Vol. 169, No 2, pages 584-98.

Tanja Kuhlmann,^{*} Leah Remington,[†] Isabelle Cognet,[‡] Lyne Bourbonniere,[†] Simone Zehntner,[†] Florence Guilhot,[‡] Alexandra Herman,³ Angélique Guay-Giroux,[‡] Jack P. Antel,[†] Trevor Owens,^{†§} and Jean-François Gauchat,[‡]

From the Department of Neuropathology,^{*} University of Göttingen, Germany; the Neuroimmunology Unit,[†] Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada; Pharmacology,[‡] INSERM U743, Université de Montréal, Montreal, Canada; and the Medical Biotechnology Center,[§] University of Southern Denmark, Odense, Denmark.

Supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (grant MOP-57832; and a neuroinflammation training program grant to L.R.), the Multiple Sclerosis Society of Canada (studentship to L.R.), the Wadsworth Foundation, and the research program from the Faculty of Medicine, Georg-August-University Göttingen.

T.K., L.R., and I.C. contributed equally to this study.

J.F.G is a Canada Research Chair recipient.

Address reprint request to Dr Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie, Pavillon Roger Gaudry, 2900 Édouard-Montpetit, Montreal QC H3T 1J4, Canada. E-mail: [REDACTED]

Abstract

Multiple sclerosis is an inflammatory disease of the central nervous system that leads to loss of myelin and oligodendrocytes, and axonal damage. We show that daily administration (days 8 to 24) of murine ciliary neurotrophic factor (CNTF), a neurotrophic factor that has been described as a survival and differentiation factor for neurons and oligodendrocytes, significantly ameliorates the clinical course of a mouse model of multiple sclerosis. In the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55, treatment with CNTF did not change the peripheral immune response, but reduced the number of perivascular infiltrates, T cells and diffuse microglial activation in spinal cord. Blood brain barrier permeability was significantly reduced in CNTF-treated animals. Beneficial effects of CNTF did not persist after it was withdrawn. After cessation of CNTF treatment, inflammation and symptoms returned to control levels. However, slight but significantly higher numbers of oligodendrocytes, NG2-positive cells, axons and neurons were observed in mice that had been treated with high concentrations of CNTF. Our results show that CNTF inhibits inflammation in the spinal cord resulting in amelioration of the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis during time of treatment.

Introduction

Multiple sclerosis (MS), a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS), is the most common cause of acquired disability in adulthood.^{1,2} The pathological hallmarks of MS are demyelination, inflammation, gliosis and axonal damage.^{3,4} In recent years the significance of axonal damage for the permanent clinical deficit has been highlighted.⁵⁻⁷ Immunomodulatory treatments with such as

interferon (INF)- β and glatiramer acetate have only limited success in progressive MS disease.^{8,9} Complementary neuroprotective approaches could therefore be beneficial.

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is a four α -helix bundle cytokine initially identified as a survival factor for chick ciliary neurons.¹⁰⁻¹² CNTF lacks a signal peptide, is localised in the cytoplasm and is therefore considered a lesion factor that is released from cells after tissue damage.^{12,13} CNTF binds and activates a tripartite receptor comprising a non-signalling GPI-anchored alpha chain (CNTFR α) and two signal transducing subunits, gp130 and leukemia inhibitory factor receptor β (LIFR β).¹³ Phospholipase C mediated cleavage of the CNTFR α alpha chain GPI anchor leads to soluble derivatives which can combine with CNTF to trigger activation of cells expressing only the two signalling subunits of the receptor, gp130 and LIFR β .¹⁴ The expression of CNTF is restricted to Schwann cells in the periphery and astrocytes in the central nervous system (CNS), whereas CNTFR α can be detected mainly in neural tissues and skeletal muscle, with lower expression in the adrenal gland, skin, liver, kidney and testis.^{13,15,16} In the nervous system, prominent expression in brain cortex and facial nucleus, motor-related brain and spinal cord areas has been reported, as well as in sympathetic, sensory and parasympathetic ganglia.^{13,17} CNTF is a potent survival and differentiation factor for a wide range of cell types of the nervous system *in vitro*, including neurons and oligodendrocytes.^{10-12,18-22} *In vivo*, it prevents degeneration of axotomized neurons, attenuates motor deficits in different strains of mice with neuromuscular deficiencies,²³⁻²⁷ and was tested successfully in animal models of Huntington's disease.²⁸⁻³⁰ CNTF was administered systemically to patients with amyotrophic lateral sclerosis, but no beneficial effect was detected.^{28,31,32} The lack of therapeutic efficiency could be linked to the poor ability of CNTF to pass the blood brain barrier (BBB).³³ More promising preclinical or clinical results have been obtained with CNTF targeted to the CNS by intrathecal injection or implantation of encapsulated transfected cells.^{34-37,37}

A mutation inactivating the CNTF gene has been identified in humans.³⁸ It does not appear to result in neurological abnormalities but was associated with early onset of amyotrophic lateral sclerosis (in patients with superoxide dismutase mutations).³⁹ Studies of the effect of CNTF gene mutation in MS patients led to conflicting results: some authors detected an association between CNTF inactivation and early MS initiation whereas others did not.^{39,40} In mice deficient for CNTF, earlier onset of symptoms and increased disability were observed in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) (35-55) peptide.

To further investigate the potential of CNTF in inflammatory diseases, we have tested the effects of daily injection of recombinant mouse CNTF in the MOG 35-55 EAE model. We observed a marked reduction of EAE symptoms associated with reduced numbers of inflammatory infiltrates in the acute disease phase and increased numbers of oligodendrocytes, neurons and axons in mice treated with high doses of CNTF in the chronic disease phase. Our results complement recent reports on the beneficial effect of intravitreal administration of CNTF in acute optic neuritis induced by MOG immunisation in rat, and of LIF injection in mouse EAE.^{41,42}

Materials and Methods

Production of Recombinant Mouse CNTF

Mouse CNTF cDNA was cloned, expressed as carboxyterminal six histidines-tagged protein and purified by immobilized metal-ion affinity chromatography as described.^{43,44} CNTF was analysed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. Biological activity was assessed using a derivative of the Ba/F3 cell line expressing the three subunits of the CNTF receptor, CNTFR α , gp130 and LIFR β .⁴⁴ Extract from bacteria transformed with empty vector were subjected to parallel immobilized metal-ion affinity chromatography, and the elution fractions corresponding to the one which would have contained CNTF were dialysed and used as injection control.

EAE Induction

All animal procedures were carried out in accordance with the guidelines set forth by the Canadian Council for Animal Care as approved by the McGill University animal care committee. Female C57BL/6 mice (6 to 8 weeks old) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were immunized on each side of the base of the tail with a subcutaneous injection of 100 µg of MOG peptide 35-55 (Sheldon Biotechnology Centre, Montreal, QC, Canada) emulsified in complete Freund's adjuvant (Fisher, Montreal, QC, Canada) containing 500µg of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco, Detroit, MI). Mice received intra-peritoneal injections of 300 ng of pertussis toxin (Sigma, Oakville, Canada) in Hanks' balanced salt solution (Invitrogen, Burlington, CA) on the day of the immunization as well as two days later. Mice were assessed daily for symptoms and weighed. The grading scheme was as follows: grade 1 (partial floppy tail), grade 2 (floppy tail), grade 3 (floppy tail and slow to right), grade 4 (partial hind limb paralysis), grade 5 (complete hind limb paralysis), and grade 6 (moribund or dead). Mice received intra-peritoneal injections of CNTF (60 µg/kg/day, 180 µg/kg/day, 1.2 mg/kg/day) in 200 µl sterile saline from day 8 to 24 post-immunization. The mice were treated daily and sacrificed either at the peak of disease or after 30 days post-immunization for histology. Control groups immunized at the same time as the CNTF-treated mice received 200 µl of sterile saline daily.

Proliferation Assay

Mice immunized with MOG in complete Freund's adjuvant and treated with either saline or CNTF were sacrificed 15 to 22 days post-immunization and lymph nodes were collected. Cells were plated with a density of 4×10^5 lymph node cells/well into a 96 well flat bottom plate. Cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Sigma), 100 µg/ml of streptomycin and 100 Units/ml penicillin (Invitrogen), 2 mM L- glutamine (Invitrogen) and 50 µM beta-mercaptoethanol (Sigma) and maintained at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified

atmosphere. For stimulation, 50 µg MOG(35-55) peptide, purified protein derivative (Cedarlane, Hornby, Canada) or ovalbumin (257-264) peptide (Sheldon Biotechnology Center, Montreal, Canada) were added to wells in triplicate for each. At 54 hours prior to the addition of the [³H] thymidine, 100 µl of the supernatants from each well was removed and replaced with 100 µl of fresh complete RPMI 1640 containing 0.5 µCi of [³H] thymidine (MP Biomedicals, Aurora, OH) and the cultures were harvested after 72 hours.

Multiplex Bead Immunoassay

Supernatants collected from the proliferation assay (see above) were examined for specific cytokine content using a multiplex bead immunoassay. A mouse TH1/TH2 six-plex Luminex kit (BioSource, Camarillo, CA) containing detection reagents for interleukin (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 and interferon (IFN)-γ was purchased from Mediatech (Montreal, Canada). Duplicate wells of proliferation assay supernatants from individual animals, stimulated with 50 µg of MOG, were run according to the manufacturer's instructions (BioSource). Data was collected using a Luminex-100 system (Luminex, Austin, TX). Data was analyzed using STarStation software version 2.0 (Applied Cytometry, Sacramento, CA) and a five-parameter curve analysis was applied to each standard curve in order to calculate the sample concentrations. The detection limit for each cytokine was set at the lowest standard.

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Methods

Lymph nodes, spleens and spinal cords were extracted from mice treated with CNTF or saline between days 15-17 post immunization. RNA was isolated using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and reverse transcribed into cDNA using myeloleukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Real time PCR was performed on cDNA from pooled lymph nodes, spleens and spinal cord and normalized to 18S rRNA message (18S primers and probes from Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers (Sigma) and probe (Applied Biosystems)

sequence for IL-10 were taken from ⁴⁵ and for IFN- γ from Shi and colleagues.⁴⁶ The cDNA for the 18s reaction was diluted 1/1000. Real time PCR was carried out using an ABI Prism 7000 as previously described.⁴⁷ Cycle conditions consisted of an initial period of 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C.

To determine the relative mRNA levels of IFN- γ and IL-10 within the samples standard curves were prepared by serial dilutions. Standard curves for cycle threshold (CT: the cycle at which the detected signal becomes significantly different from the background signal) versus arbitrary levels of input RNA were prepared, and relative levels of mRNA in each sample were calculated. CT values were verified to be in the linear amplification range on the appropriate standard curves.

Immunohistochemistry and in Situ hybridization

Mice were perfused under deep anaesthesia through the left cardiac ventricle with phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde. Brain, spinal cord, spleen and liver from EAE mice and five non-immunized control mice were embedded in paraffin. Cervical, thoracic and higher lumbar spinal cord was cut in 8 to 11 3-mm-thick transverse segments prior to embedding. Five- μ m-thick sections were stained for hematoxylin and eosin (H&E), Luxol-fast blue (LFB), periodic acid-Schiff (PAS), and Bielschowsky's silver impregnation.

Immunohistochemical staining was performed with an avidin-biotin technique. After deparaffinization intrinsic peroxidase activity was blocked by incubation with 5% H₂O₂ in PBS for 20 minutes. Non-specific antibody binding was inhibited with 10% fetal bovine serum in PBS for 25 minutes. The primary antibodies were anti-proteolipid protein (anti-PLP, Biozol, Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Germany), anti-2',3'-cyclic nucleotid 3'-phosphodiesterase (anti-CNPase, Sternberger Monoclonals, Baltimore, MD), anti-MAC-3 [similar or identical to CD107b ⁴⁸ (PharMingen, San Diego, Ca)], anti-CD3 (Serotec, Oxford, UK), anti-NG2 (PharMingen), anti-NeuN (Chemicon, Temecula, CA), anti-immunoglobulin (Ig)

(Vector Laboratories, Burlingon, CA), anti-claudin 5 (Abcam, Camebridge, UK), and anti-Amyloid Precursor Protein (Chemicon) .

Non-radioactive *in situ* hybridization for PLP mRNA was performed as described in detail previously⁴⁹ with an automated immunostainer (Discovery, Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ). Hybridization was performed using digoxigenin-labelled riboprobes detected by alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin Fab-fragments. Nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate were used as chromogens. For double staining after *in situ* hybridization, sections were incubated with anti-PLP antibody and processed as described above.

Terminal dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) Staining

Sections were deparaffinized and then incubated for 1 hour at 37 °C with a reaction mix containing 10 µl tailing buffer, 2 µl cobalt chloride, 1 µl digoxigenin labelling mixture, and 6 U of terminal deoxynucleotidyl transferase in a total volume of 50 µl. Sections were washed, followed by incubation with an alkaline phosphatase-labelled anti-digoxigenin antibody (dilution 1: 250) for 1 hour at room temperature. The colour reaction was performed with Nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate. All reagents, enzymes and antibodies were purchased from Roche Applied Systems (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Germany). The sections were counterstained with nuclear fast red.

Morphometric Analysis

To quantify the demyelinated area, all (8 to 11) transverse spinal cord cross-sections in each animal were analyzed. The demyelinated area was measured in sections stained for LFB/PAS, and expressed as percentage of total white matter. For statistical analysis the mean per animal was calculated. The permeability of the BBB was assessed in sections stained with anti-mouse Ig. To determine the extent of Ig leakage, the area of Ig leakage was measured in all spinal cord cross-section of each

animal and expressed as percentage of total spinal cord area. For statistical comparison the mean per animal was calculated.

Axonal density was determined in sections stained with Bielschowsky's silver impregnation using a 24-point eye-piece. The number of points crossing axons was counted in lesions of three transverse sections. The number of neurons was determined in sections stained with NeuN. Neurons were counted in the anterior horns of thoracic spinal cord transverse sections; one to three transverse sections per animal were counted.

To analyze the number of oligodendrocytes, T cells, macrophages and NG-2 positive cells within lesions, the three most severely affected cross sections were selected and the number of stained cells/mm² within the lesions was determined. The number of inflammatory cells in unaffected white matter was determined by counting T cells and macrophages/microglia in white matter areas without myelin pallor and perivascular infiltrates.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by using Prism Software (Graphpad) or the Instat statistics program. To analyse the clinical course a two-side analysis of variance test with Bonferroni's correction was used. Statistical analysis of the number of inflammatory cells, axons, neurons, oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitor cells as well as the extent of Ig leakage was performed by using an unpaired t-test. Statistical analysis of maximal and cumulative disease scores was done by using the Mann-Whitney-U test.

Results

Effects of CNTF on the Clinical Course of EAE

We examined the effect of recombinant mouse CNTF on EAE induced by MOG(35-55) peptide in C57Bl/6 mice. To allow the establishment of a peripheral immune response to MOG immunization and to compare our results with earlier studies in

which LIF was used to ameliorate MOG-EAE,⁴¹ we injected CNTF intraperitoneally from days 8 to 24. Daily administration (days 8 to 24) resulted in a significant amelioration of clinical symptoms. Most (87%, seven of eight) of the mice treated with saline reached a clinical score of 4 or more compared to only 57% (four of seven) or 37.5% (three of eight) of mice treated with 60 or 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF (Figure 1, A and E). The therapeutic effects of 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF were replicated in a second independent experiment in which mice were sacrificed at the peak of disease with similar results. In this experiment, 77.7% (seven of nine) of the mice treated with saline reached a clinical score of 3 or more. In contrast only 20% (2 of 10) of the mice treated with CNTF at 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ achieved a clinical score of 2 or more by the time of sacrifice. The disease course in mice treated with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ was statistically significantly different during treatment period compared to saline-injected mice ($p = 0.0138$). Although these treatment experiments were repeated several times with different doses of CNTF, the delay of disease onset shown in Figure 1A was observed only in one experiment. Intraperitoneal administration of a higher dose (1.2 mg/kg/day) of CNTF led to a further improvement of clinical symptoms (Figure 1B). Only 3 of 11 mice in the group treated with 1.2 mg/kg/day CNTF reached a maximal clinical score of 4 or greater, whereas 12 out of 13 of the saline injected group achieved such scores (Figure 1E), the clinical course was significantly different compared to saline-injected mice ($p < 0.0001$). Treatment with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and 1.2 mg/kg/day CNTF reduced significantly the cumulative clinical score during the treatment period compared to saline-injected mice (Figure 1F); treatment with 1.2 mg/kg/day CNTF led also to a significant reduction in maximal disease scores (Figure 1E). Termination of CNTF treatment after 16 days (equals day 24 after immunization with MOG) led to worsening of clinical symptoms resulting after a few days in clinical scores comparable to those of saline-injected mice (Figure 1, A and B).

CNTF has been reported to induce weight loss.⁵⁰ In our EAE experiments treatment with 60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ or 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF did not result in a significant higher maximal weight loss compared to saline-injected mice (Figure 1C). Saline-injected

mice had the lowest body weight on day 16 after immunization (95 +/- 3.1% of initial body weight) while animals treated with 60 or 180 µg/kg/day reached their minimal body weight on day 18 (92 +/- 2.3% of initial body weight) or day 19 after immunization (91 +/- 2.9% of initial weight), respectively (Figure 1C). Animals treated with 1.2 mg/kg/day CNTF had a maximal weight loss of 18% (82 +/- 3.5% of initial body weight, range 64 to 102%) on day 23 that was not statistically significantly higher compared to the maximal weight loss observed in saline-injected mice (91 +/- 5.1%, range 79 to 104 %) on day 17 (Figure 1D). However, 1 of 11 mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF died and 3 were sacrificed for ethical reasons due to severe weight loss on day 22 or 23. These four mice had only mild disease scores at time of death (Figure 1E). Three of the four mice were available for histological analysis. The extent of demyelination was determined by LFB-PAS staining and the number of perivascular infiltrates by MAC3 immunohistochemistry. These mice had very few infiltrates and no signs of demyelination in the spinal cords, and were excluded from further histological analysis. These experiments show that intraperitoneal administration of 180 µg/kg/day or 1.2 mg/kg/day CNTF before onset of symptoms has significant therapeutic effects on the clinical course of EAE and that, cessation of treatment is associated with worsening of clinical symptoms. Treatment with 1.2 mg/kg/day leads to severe weight loss which restricted use of higher dosages.

Effects on the Immune Parameters and Blood-Brain Barrier

Peripheral Immune Response

To investigate how CNTF exerts its therapeutic effect on the clinical course of EAE, we measured T cell responsiveness to antigens by proliferation assays in the acute disease phase. These experiments were performed with tissues from EAE mice either injected intraperitoneally with saline, 180 µg/kg/day CNTF, a dosage that ameliorated the clinical course of EAE without inducing significant weight loss or 1.2 mg/kg/day CNTF. Lymph node cell cultures derived from MOG-immunized

animals showed a marked MOG and purified protein derivative-dependent proliferation that was not significantly reduced by CNTF treatment compared to saline-injected mice that had severe EAE (SI = 35.4 +/- 15.8 in control animals versus 9.5 +/- 2.0 in 180 µg/kg/day and 21.1 +/- 6.9 in 1.2 mg/kg/day CNTF-treated mice) (Figure 2A). EAE is considered to be a Th1 mediated disease.⁵¹ To analyze whether CNTF treatment induces a change in the cytokine profile of EAE effector cells, we determined mRNA levels for IFN-γ and IL-10 from lymph nodes and spleen by real-time-PCR from mice which were sacrificed between days 15 to 17 after immunization. No significant differences were observed between CNTF and saline-injected mice in levels of the Th1 cytokine IFN-γ (Figure 2B). IL-10 mRNA levels did not differ significantly between mice injected with saline or 180 µg/kg/day CNTF. In mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF, slightly higher IL-10 mRNA levels were found compared to saline-injected mice, and these were significant (p = 0.0179) (Figure 2C). To further elucidate the effect of 1.2 mg/kg/day CNTF on T cells, we determined the protein levels of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 and IFN-γ in the supernatants of lymph node cell cultures derived from MOG immunized mice treated either with saline or 1.2 mg/kg/day CNTF. The protein levels of IL-2, IFN-γ, and IL-5 showed no significant differences as measured by ELISA (Figure 2, D-F). The levels of IL-4, IL-10 and IL-12 were below the level of detection (between 5 to 30 pg/ml).

Immune Response in the CNS and BBB

To investigate the consequences of treatment with 180 µg/kg/day CNTF on the immune response within the CNS, we measured mRNA levels for IL-10 and IFN-γ in spinal cord tissue (day 15 to 17 after immunization with MOG (33-55) peptide) and performed a histological analysis of spinal cord and brain tissue sections from mice which were sacrificed during the acute phase of disease (day 13 or 18 after immunization with MOG (33-55) peptide). The level of IFN-γ mRNA was significantly reduced in mice treated with 180 µg/kg/day CNTF compared to saline-

injected mice ($p = 0.0135$) (Figure 3B). Levels of IL-10 mRNA also showed a trend to lower levels in CNTF-treated mice ($p = 0.1513$) (Figure 3A). These results are consistent with a reduced immune response in the spinal cord. This interpretation was confirmed by histological analysis. At the acute phase of disease significantly fewer perivascular infiltrates per spinal cord cross-section were found in tissue sections stained with Mac3 of mice treated with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF (6.8 ± 1.1 infiltrates/cross-section in saline-injected mice, 1.9 ± 0.7 infiltrates/cross-section in 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF-treated mice, $p < 0.01$) (Figure 3, C and G). No perivascular infiltrates were observed in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF (Figure 3C). The cellular composition of the infiltrates was comparable in the control and the 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ group, consisting mostly of T cells (567 ± 67 in saline-injected mice versus 492 ± 37 cells/ mm^2 in 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF-treated mice) and macrophages/microglia (1856 ± 82 cells/ mm^2 in saline-injected mice versus 1545 ± 137 cells/ mm^2 in 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF-treated mice) and few B cells. In addition to their presence in perivascular infiltrates, sparse infiltration of T cells and diffuse microglial activation were observed in otherwise normal-appearing white matter parenchyma, and this was significantly less prominent in CNTF-treated animals (microglia: 212 ± 18 cells/ mm^2 in saline-injected mice, 88 ± 17 cells/ mm^2 in 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF-treated mice, $p < 0.001$, 25 ± 4 in 1.2 mg/kg/day CNTF-treated mice, $p < 0.001$; data not shown) (T cells: 41 ± 5 cells/ mm^2 in saline treated mice, 20 ± 6 cells/ mm^2 in 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF-treated mice, $p < 0.05$, 0 in 1.2 mg/kg/day CNTF-treated mice, $p < 0.001$, Figure 3E). The permeability of the BBB was assessed by measuring the spinal cord area that showed a positive staining for Ig (Figure 3G). In the saline group 3 of 16 mice showed no Ig staining, in contrast to 5 of 10 in the group treated with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF and 4 of 4 in the group treated with 1.2 mg/kg/day CNTF (Figure 3F). We also quantified the area of BBB leakage, expressed as percentage of total spinal cord cross section area (Figure 3F). In the saline group on average $38 \% \pm 7.7$ of the spinal cord tissue area displayed a positive staining for Ig, whereas $26.7 \% \pm 10.5$ of tissue area showed a staining signal in mice treated with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (ns, $p = 0.4$). In mice treated with 1.2

mg/kg/day CNTF no staining for Ig was detected ($p = 0.028$). To further address the effect of CNTF on the BBB, we investigated the expression of the tight junction protein claudin 5. However, no differences were observed between naïve mice and saline or CNTF-treated mice (data not shown). This is in line with recent studies demonstrating that BBB leakage can occur independent of tight junction protein expression.^{52 53}

After cessation of CNTF treatment, disease returned to control levels. We analyzed inflammatory pathology ~10 days after cessation of CNTF treatment. The number of perivascular infiltrates per spinal cord cross-section, as well as the numbers of macrophages/microglia or T cells within lesions did not differ significantly between CNTF and saline-injected mice (see Table 1). In summary, these results demonstrate that during the acute phase of EAE, daily treatment from day 8 onwards with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF or higher, inhibits spinal cord inflammation, seen as the recruitment or persistence of inflammatory cells into the CNS, the formation of perivascular infiltrates within the CNS, and activation to cytokine production, without affecting the T cell response in the periphery.

Effects on Oligodendrocytes, Oligodendrocyte Precursor Cells, Neurons, and Axons

To analyze the neurobiological consequences of CNTF treatment (60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and 1.2 mg/kg/day) on EAE, we studied its effects on oligodendrocytes, myelin, oligodendrocyte progenitor cells and axons during acute and chronic disease stages [day 28 to 36 after immunization with MOG (35-55) peptide]. In the acute disease phase, mild demyelination was observed in the saline-injected mice (Figure 3D). However, demyelination in CNTF-treated mice was significantly reduced compared to saline-injected mice (Figure 3D). We determined the amount of axonal loss, acute axonal damage (immunohistochemistry for APP) and numbers of apoptotic oligodendrocytes in areas with inflammatory infiltrates in CNTF-treated mice which showed an inflammatory response in the spinal cord and compared them

with saline-injected mice. No significant difference was observed for these parameters between the two groups (data not shown).

In the chronic disease phase marked infiltration of the CNS parenchyma by macrophages and T cells led to edema and loss of myelin staining. Although treatment with CNTF reduced the percentage of demyelinated white matter, this difference was not significant compared to saline-injected mice (9.8 +/- 1.6 % in saline-injected mice versus 5.0 +/- 2.5, 6.0 +/- 2.4 and 6.5 +/- 1.9 in mice treated with 60 µg/kg/day, 180 µg/kg/day and 1.2 mg/kg/day, respectively).

To determine the number of oligodendrocytes within lesions and normal appearing white matter *in situ* hybridization for PLP mRNA was performed. The number of PLP mRNA positive oligodendrocytes within the lesions was significantly reduced in all treatment and saline groups compared to unaffected, normal appearing white matter (Table 1, Figure 4B and 5A). A dose-response effect could be discerned, in that mice which had received higher dosages of CNTF (1.2 mg/kg/day) had a significantly higher number of oligodendrocytes within the lesion compared to saline-injected mice ($p = 0.012$) (Figure 4B) (Table 1). To test whether this higher number of oligodendrocytes was caused by a reduction of oligodendrocyte cell death, we counted the number of total (Figure 5C) and CNPase-positive cells (Figure 5D) which displayed morphological characteristics of apoptosis, such as condensed and/or fragmented nuclei and apoptotic bodies. Administration of high doses of CNTF was associated with reduced numbers of cells with apoptotic morphology [67 +/- 5 cells/mm² in saline-injected mice versus 43 +/- 10 cells/mm² in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF ($p = 0.022$) as well as reduced numbers of CNPase-positive apoptotic cells (33 +/- 4 cells/mm² in saline-injected mice versus 18 +/- 7 cells/mm² in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF ($p = 0.058$) (Table 1)].

Oligodendrocyte precursor cells were identified by immunohistochemistry for the chondroitin sulphate proteoglycan NG2. NG2 is a single-pass transmembrane protein which carries a variable number of glycol- and glycosamine chains according to cell type and developmental stage, and is expressed by oligodendrocyte progenitor cells in the mature CNS.^{54,55} The number of NG2-positive cells was significantly increased

within the lesions compared to normal appearing white matter independent of treatment with CNTF or saline (Table 1; Figure 4A; Figure 5, E and F). This observation is in agreement with previous studies that showed proliferating and increasing numbers of NG2-positive cells in inflammatory and toxic demyelinating CNS lesions.^{56,57} Treatment with 1.2 mg/kg/day CNTF was associated with a significant increase in the number of NG2-positive cells within the lesions compared to treatment with lower doses of CNTF or saline (173 +/- 9 cells/mm² in saline-injected mice versus 234 +/- 13 cells/mm² in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF, $p = 0.0002$) (Table 1, Figure 4A).

CNTF is known to promote neuronal survival and axonal regeneration. Therefore we investigated the effect of CNTF administration on the loss of axons in EAE lesions and the number of neurons in the grey matter of spinal cord. Axonal density was determined in sections stained with Bielschowsky's silver impregnation using a 24-point eye-piece. The number of points crossing axons was counted. In normal appearing spinal cord white matter, 18 points of the eye grid crossed axons whereas in EAE lesions this number was significantly reduced (Figures 4C and 5B, Table 1). A higher number of axons within lesions was observed in mice treated with CNTF and this difference was significant in mice treated with 1.2 mg/kg/day compared to saline-injected mice (relative number of axons: 2.87 +/- 0.18 in saline-injected mice versus 4.16 +/- 0.21 in 1.2 mg/kg/day CNTF-treated mice, $p < 0.0001$) (Table 1, Figure 4C). The number of neurons was counted in the ventral horns of the thoracic spinal cord on sections stained with the neuronal marker NeuN from MOG immunized animals treated with CNTF or saline as well as in mice without EAE (Figure 4D, Table 1). In saline-injected mice a significant reduction in the number of NeuN-positive neurons was observed compared to mice without EAE (788 +/- 25 cells/mm² in mice without EAE compared to 632 +/- 18 cells/mm² in saline-injected EAE mice, $p = 0.001$). No TUNEL positive neurons or neurons with apoptotic morphology were observed (Figure 5G). Instead, we found swollen, weakly eosinophilic neurons that lacked Nissl bodies with either no or large vesicular nuclei similar to changes observed in neurons as a reaction to axonal damage (Figure 5H).

Loss of NeuN-positive neurons was prevented completely by treatment with 1.2 mg/kg/day CNTF (774 ± 24 cells/mm², $p = 0.001$) as it is shown in Figure 4D and Table 1.

In summary, these findings indicate that administration of high doses of CNTF reduces loss of NeuN-positive neurons and axonal damage, increases number of oligodendrocyte precursor cells and protects mature oligodendrocytes against apoptotic cell death in EAE lesions.

Discussion

Our data demonstrate that treatment with CNTF prior to onset of symptoms ameliorates significantly the clinical course of EAE, in a dose dependent manner. CNTF delivered at 180 μ g/kg/day was sufficient to inhibit T cell and macrophage/microglia recruitment into the CNS without affecting the peripheral immune response. Treatment with 1.2 mg/kg/day CNTF resulted in complete prevention of BBB leakage, formation of perivascular infiltrates and T cell migration into the CNS in the acute disease phase, and additionally in a slightly better preservation of oligodendrocytes, neurons and axons as well as in an increased number of oligodendrocyte progenitors in the chronic disease phase.

The role of CNTF as a survival and differentiation factor for neurons and oligodendrocytes is well established. *In vitro* CNTF promotes the survival of neurons^{20,58} and reduces TNF- α and serum deprivation-induced cell death of oligodendrocytes^{19,59,60}. *In vivo*, it prevents the degeneration of axotomized neurons.²³ In CNTF-deficient mice induction of EAE with MOG (35-55) peptide results in more severe axonal damage, increased number of apoptotic oligodendrocytes and a reduction in proliferating oligodendrocyte progenitor cells compared to WT mice.⁶¹

Although these direct neuroprotective effects of CNTF are well known, our results argue for a different mode of action of CNTF in EAE. The underlying cause for the beneficial effect of CNTF during the treatment period appears to be due to reduced

spinal cord inflammation. This conclusion is based on the observation of an almost complete absence of clinical symptoms that is associated with a complete prevention of BBB leakage and infiltration of T cells into the CNS in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF. A similar but less pronounced tendency is observed in mice treated with 180 µg/kg/day CNTF. After cessation of CNTF treatment, disease returned to control levels, and inflammatory response measured ~10 days after CNTF withdrawal was equivalent in both groups. Mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF had higher numbers of axons, NG2 positive oligodendrocyte progenitor cells and oligodendrocytes within the lesions, as well as no sign of significant neuronal loss. These relatively mild morphological changes observed in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF in the chronic disease phase were not associated with a better clinical score. Whether these higher numbers of axons, oligodendrocytes and neurons are a direct neuroprotective effect of CNTF or secondary to reduced inflammation in the acute disease phase remains open. The short half-life of CNTF and the complete absence of inflammation in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF in the acute phase favour the second hypothesis.

The decreased CNS infiltration was not caused by suppression of peripheral T cell proliferation since treatment with CNTF did not significantly reduce T cell proliferation in response to immunization with MOG(35-55) peptide. We have no indication for a Th1/Th2 shift: treatment with 180 µg/kg/day CNTF did not change levels of mRNA levels for IFN-γ or IL-10, in peripheral immune tissues. We observed slightly increased IL-10 mRNA levels in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF, but this did not result in detectably higher protein levels. Also other cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IFN-γ) showed no detectable change in protein levels. These observations make it unlikely that the beneficial effect of CNTF is mediated by immunomodulation of the peripheral immune response. This conclusion is consistent with earlier studies showing that induction of EAE in CNTF deficient mice or treatment of EAE with recombinant LIF (a member of the IL-6 family whose receptors comprises two signalling subunits of CNTFR, gp130 and LIFRβ⁶²⁻⁶⁴) did

not result in an altered peripheral immune response.^{41,61} The effect of CNTF on spinal cord inflammation is unlikely to be linked to a direct effect of this cytokine on T cells, as these cells are neither known to express CNTFR α nor LIFR β .^{13,65,66} It is conceivable that CNTF exerts its effects on the spinal cord immune response via immune modulating molecules produced by microglia, a cell population known to respond to CNTF^{67,68} or a direct neuroprotective effect preventing initial myelin and axon damage and therefore blocking secondary inflammatory response.⁶⁹ The ability of CNTF to cross the BBB is a prerequisite for a direct effect of CNTF on microglial cells or myelin and axons. Studies investigating the permeability of the intact BBB for CNTF led to contradictory results.⁷⁰⁻⁷² However, in EAE the BBB is disrupted early during the disease course⁷³, so that transport of CNTF into the CNS may not be restricted by the BBB - preliminary data support this possibility (IC, J-F G, not shown).

An alternative interpretation compatible with the observation of an unchanged immune response in the peripheral immune system and reduced inflammation in the spinal cord is that CNTF prevents inflammatory cell recruitment into the CNS via effects on the BBB. This hypothesis is suggested by the observation of significantly reduced T cell infiltration and diffuse microglia activation within the non-inflamed spinal cord parenchyma and a significantly reduction of Ig leakage in spinal cord tissue of CNTF-treated animals. It has been shown that brain endothelial cells express mRNA coding for gp130 and LIFR β .⁷⁴ Although expression of CNTFR α mRNA was not detected⁷⁴, requirement for the non-signalling chain can be bypassed by the formation of complexes between CNTF and soluble CNTFR α .¹⁴

The CNTF doses used in our EAE experiments are in the same range as other studies in which CNTF or LIF were administered systemically.^{26,41,75,76} However, we observed severe weight loss in mice treated with 1.2 mg/kg/day CNTF, to the extent that some mice had to be sacrificed due to ethical reasons. CNTF is known for its capability to induce weight loss and is currently under investigation as a potential treatment in obesity.⁷⁷ Induction of severe weight loss and death induced by CNTF in

a dose-dependent manner has been described in a previous study in which the authors discussed cachexia-like effects of CNTF, although none of the cytokines typically involved in cachectic wasting such as IL-6, TNF α and LIF was up-regulated.⁷⁸ In contrast, in genetic animal models (ob/ob mice) and in diet-induced obesity restricted food-uptake appears to be the major reason for weight loss.^{50 79} There are also indications that CNTF might induce weight loss by neurogenesis in areas of the hypothalamus relevant for energy-balance regulation⁸⁰ or by activation of hypothalamic leptin-like pathways and subsequent phosphorylation of STAT3, due to similarities in the structure of the CNTF and leptin receptor.⁵⁰ So far, side effects of CNTF such as fever, malaise and weight loss as well as the most likely poor ability of CNTF to cross the intact BBB have limited the success of clinical studies in amyotrophic lateral sclerosis patients who were given CNTF on account of its known neuroprotective effect.^{28,31,32} More promising results were obtained when CNTF was administered to the CNS by intrathecal injections or implantation of encapsulated transfected cells into the ventricular system.^{34,36,37,81,82} Recent progress on human CNTF biochemistry indicated that this cytokine can use soluble or membrane bound IL-6R α as a substitute to CNTFR α to activate the receptor signalling subunits, gp130 and LIFR β .⁸³ This led to the suggestion that some of the side effects of CNTF in clinical trials might be linked to this species-specific property of the human cytokine, which has been mapped to Gln 63.⁸³ This amino-acid is substituted by an arginine in rat and mouse CNTF, preventing interaction with IL-6R α .^{44,83} Modified forms of human CNTF with increased specificity such as Axokine in which human Gln 63 is replaced by murine Arg 63⁸⁴ could therefore have an improved safety profile.

In summary, we show that the clinical benefit of CNTF in EAE is caused mainly by impaired inflammation in the CNS. The demonstration of beneficial effects of recombinant mouse CNTF in EAE together with the development of new applications to reduce side effects might sharpen the focus on CNTF as a potential therapeutic for MS.

Acknowledgement

We are grateful to Dr K. J. Kallen (Christian Albrecht Universität zu Kiel, Germany) for kindly providing the stably transfected Ba/F3 cells, C. Stadelmann and D. Merkle for helpful discussion and Dina Draeby (Medical Biotechnology Center University of Southern Denmark) and Jason Millward (Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada) for help with the EAE experiments.

Figure legends

Figure 1. Daily intraperitoneal administration of CNTF reduces EAE symptoms in mice. **A:** Mice were immunized with MOG(35-55) peptide and complete Freund's adjuvant on day 0. From days 8 to 24 mice were either treated with 60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 7$) (**black circles**), 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 8$) (**white triangles**) or saline ($n = 8$) (**white squares**). Treatment with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ significantly improved the clinical course during the time of treatment. **B:** Intraperitoneal injection of 1.2 mg/kg/day CNTF ($n = 11$) (**black diamonds**) led to a further improvement of the clinical symptoms compared to saline-treated mice ($n = 5$) (**white squares**). **C:** Intraperitoneal injection of 60 or 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF modified the time course of weight loss in mice with EAE, but minimal body weight did not change significantly between CNTF and saline-injected mice. **D:** Treatment with 1.2 mg/kg/day induced severe loss of body weight in some mice. These mice were sacrificed at day 23. Cessation of CNTF treatment at day 24 led to increase in body weight. **E:** Treatment with 1.2 mg/kg/day CNTF led to a significant improvement of the maximal clinical score during the treatment period compared to saline-injected mice ($p = 0.02$). **F:** Treatment with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and 1.2 mg/kg/day significantly reduced the cumulative disease score during treatment period compared to saline-injected mice (180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$: $p = 0.0112$, 1.2 mg/kg/day: $p = 0.0016$). The graphs in **E** and **F** show the median scores. One sacrificed due to severe EAE, and two sacrificed due to severe weight loss.

Figure 1

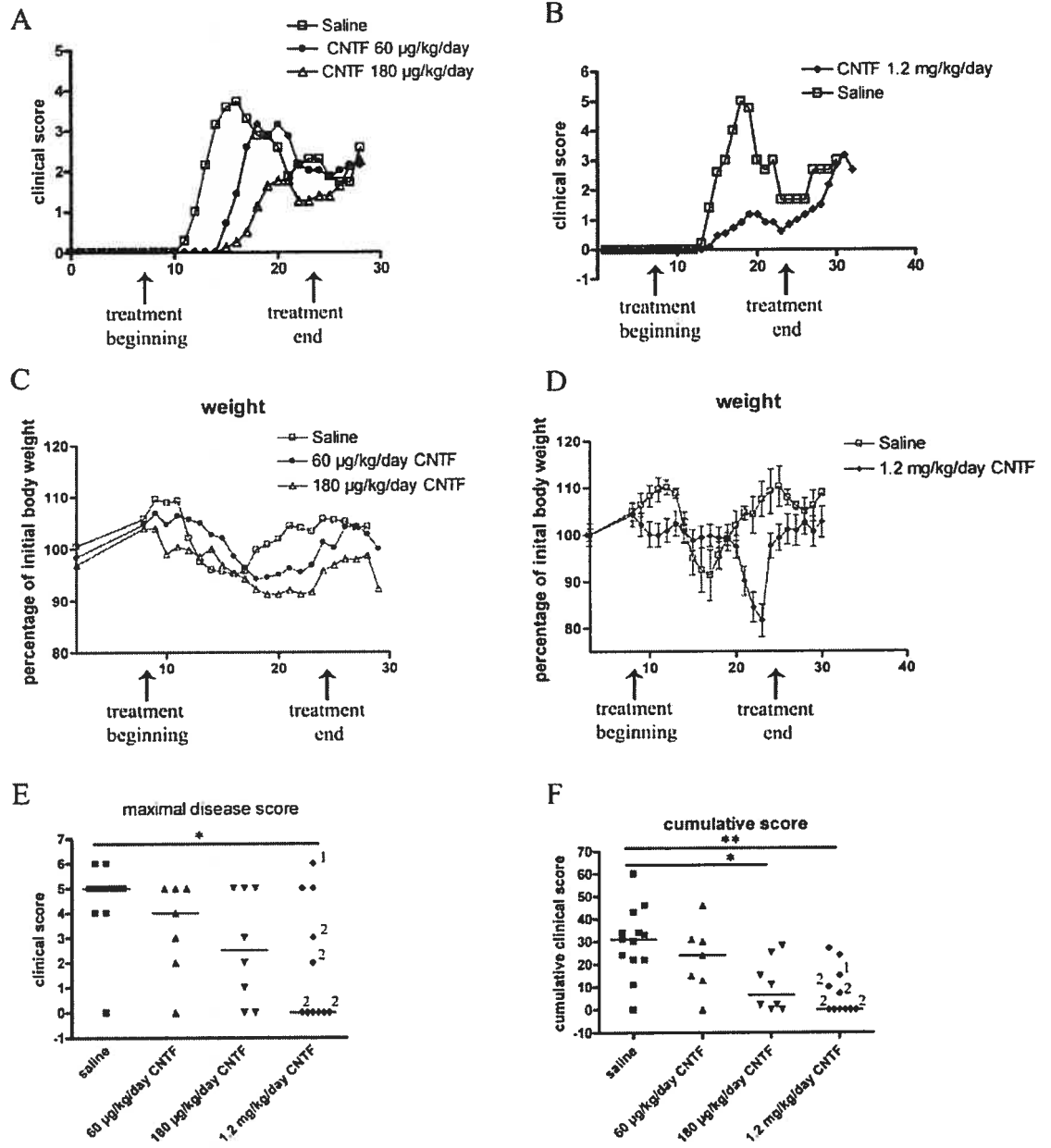


Figure 2. CNTF does not modify T cell proliferation and cytokine mRNA levels in response to immunization with MOG peptide. **A:** Lymph nodes were collected from mice immunized with MOG plus complete Freund's adjuvant and treated with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ($n = 8$), 1.2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 7$) or saline ($n = 11$) at day 15 to 22 after immunization. Proliferative response of isolated lymph node cells was assayed *in vitro*. Stimulation with 50 μg MOG(35-55) peptide led to a marked MOG-dependent proliferation that was not altered by CNTF treatment. **B and C:** Cytokine mRNA levels were assessed by real time PCR analysis of RNA isolated from lymph nodes or spleen. The results for 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ($n = 9$) and 1.2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 2$) were derived from two separate experiments. Results are shown within one graph with the appropriate saline control groups ($n = 9$ or 6, respectively). **B:** The levels of IFN γ mRNA did not differ significantly between CNTF-treated and saline-injected mice. **C:** Mice treated with 1.2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF had significantly higher levels of IL-10 mRNA. **D-F:** Levels of IL-2, IFN- γ and IL-5 protein in the supernatants of lymph node cell cultures from mice treated with saline ($n = 8$) or 1.2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 6$) were measured by ELISA. No significant differences were detected. All graphs show mean + SEM.

Figure 2

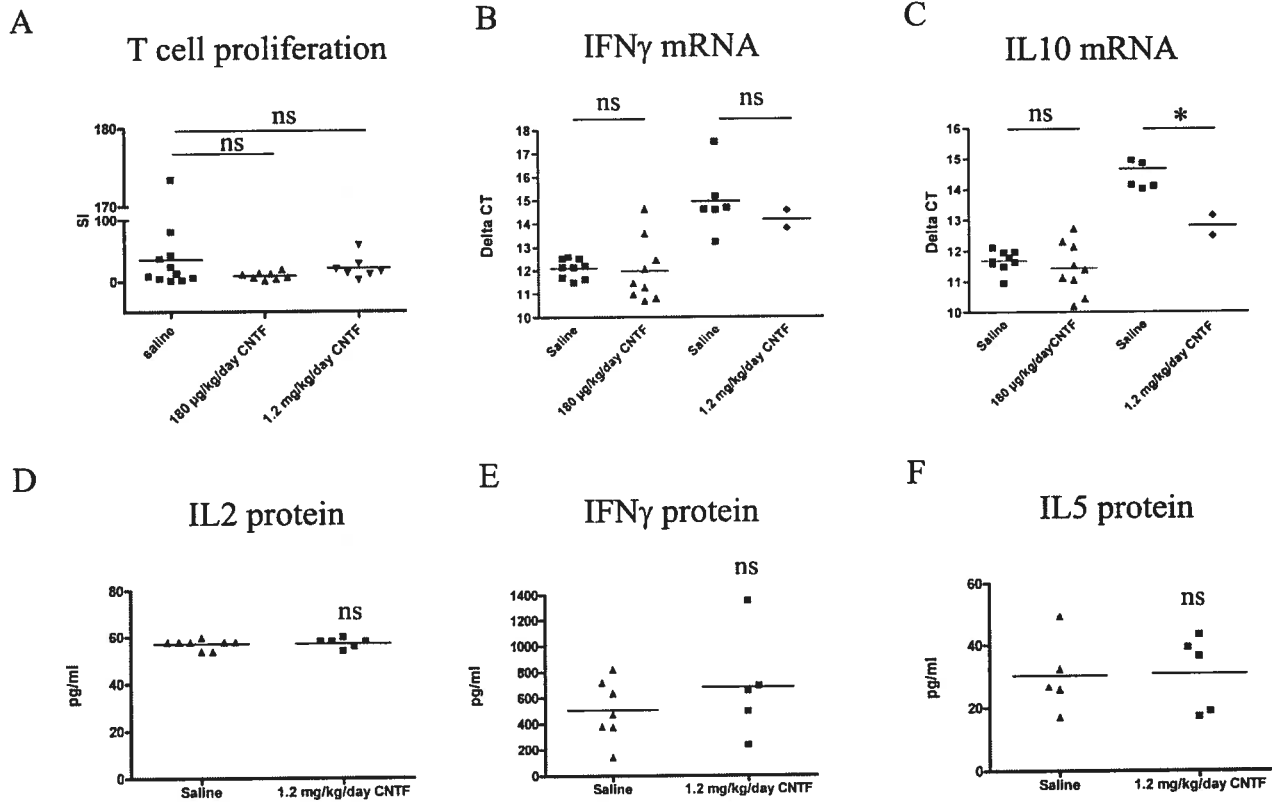


Figure 3. CNTF reduces the immune response in the spinal cord. Levels of mRNA for IL-10 and IFN γ , number of perivascular infiltrates, extent of demyelination, number of T cells in unaffected white matter, and permeability of the BBB for Ig were analyzed in spinal cord during the acute phase of the disease. **A** and **B**: Mice were treated with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 9$) or saline ($n = 9$) and levels of mRNA for IL-10 and IFN- γ were determined by real time-PCR. In mice treated with 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 9$) a trend to lower mRNA levels for IL-10 ($p = 0.1513$) (**A**) and significantly lower IFN- γ ($p = 0.0135$) (**B**) were observed in spinal cord tissue compared to saline-injected mice ($n = 9$). **C-F**: Tissue sections from mice injected with saline ($n = 16$), 180 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ($n = 10$) or 1.2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ CNTF ($n = 4$) were stained with the macrophage marker MAC3, the T cell marker CD3, the myelin stain LFB-PAS and anti-Ig for BBB leakage. Mice treated with CNTF showed significantly fewer perivascular infiltrates/cross section (**C**), reduced loss of LFB-PAS staining (**D**), fewer T cells in the apparently unaffected white matter (**E**) and reduced Ig leakage (**F**) compared to saline-injected mice. **G**: Immunohistochemistry for MAC3 and Ig revealed a complete absence of perivascular macrophages/microglia cells and BBB leakage in mice treated with 1.2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ in contrast to saline-injected mice. **Arrows** indicate perivascular infiltrates [immunohistochemistry for Mac3 (brown) and mouse Ig (brown), counterstained with haematoxylin]. The graphs in **A-F** show means. In **A-D** and **F**, each point represents one animal, in **E** each point shows the result for a single spinal cord cross-section.

Figure 3

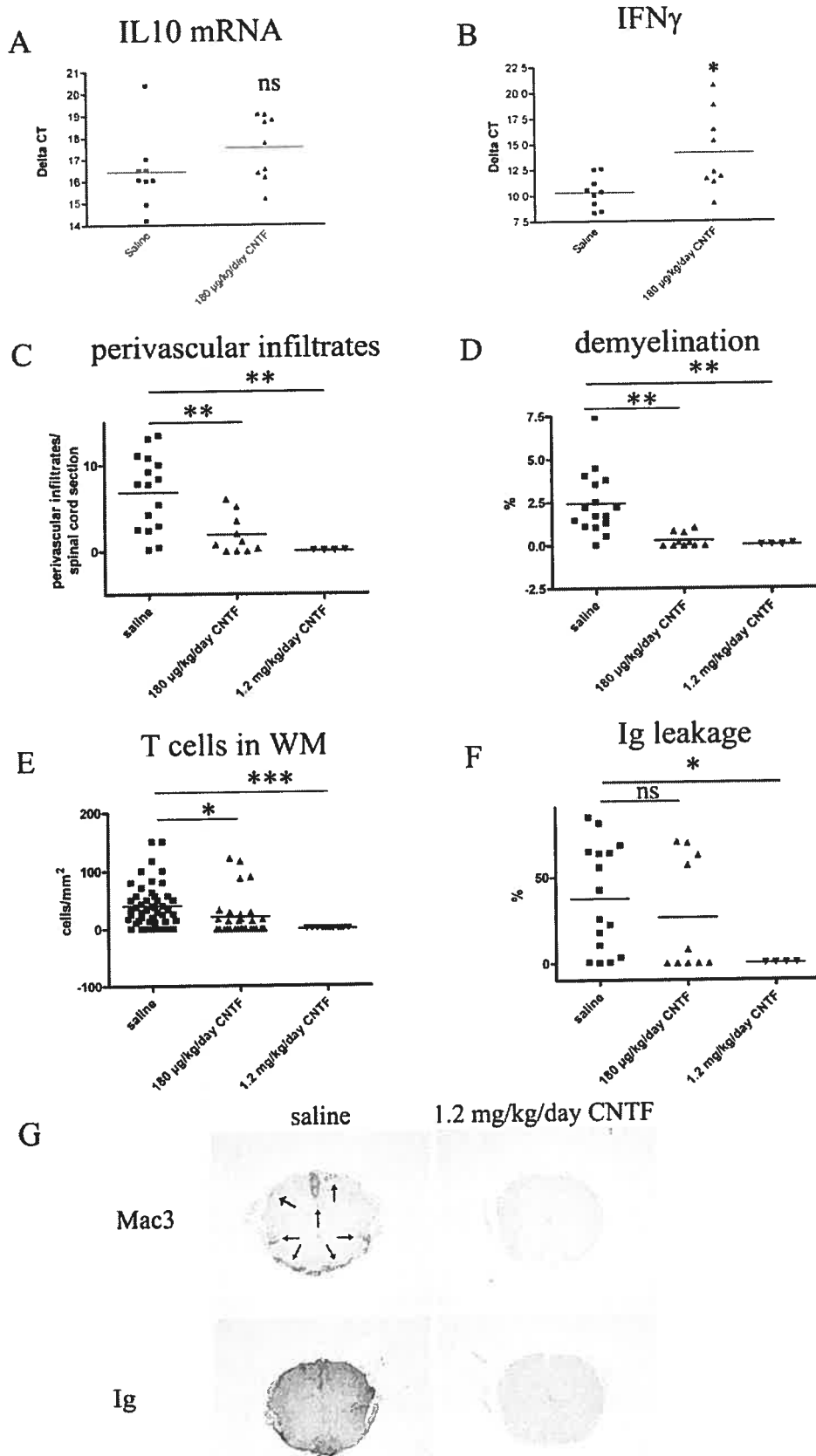


Figure 4. CNTF increases the number of oligodendrocytes and their precursors and decreases axonal and neuronal damage. **A-D:** To analyze the effects of CNTF treatment in the chronic disease phase, spinal cord tissues from mice in the chronic disease phase [day 28-36 after immunization with MOG(35-55) peptide] were studied. The numbers of NG-2 positive cells, oligodendrocytes (PLP-ISH), axons (Bielschowsky's staining) and neurons (NeuN) in healthy mice or mice treated either with different concentrations of CNTF or saline were determined. The animals from the two experiments shown in Figure 1, A and B, were pooled for this analysis; the saline treated mice in these two experiments did not show significant differences in the clinical course or different histological parameters. **A-C:** In saline-treated EAE, the numbers of NG2-positive cells, PLP-positive oligodendrocytes, and axons within the lesions were significantly reduced compared to naive mice ($p < 0.001$ for all parameters). **D:** Also the number of Neu-N positive neurons in the ventral horn of the thoracic spinal cord of saline-injected mice with EAE was significantly lower compared to healthy animals without disease ($p < 0.001$). Treatment with 1.2 mg/kg/day CNTF led to significantly higher numbers of NG-2 positive cells ($p = 0.0002$) (**A**), PLP positive oligodendrocytes ($p = 0.012$) (**B**), and axons ($p < 0.0001$) (**C**) within the lesions. **D:** Administration of 1.2 mg/kg/day CNTF prevented completely the reduction in NeuN-positive neurons observed in control EAE mice ($p = 0.0006$). All graphs show mean + SEM. Notice the different scale of the y-axis in **D**. Each point in **A-C** represents the result of one spinal cord cross-section, in **D** each dot represents the result of one animal.

Figure 4

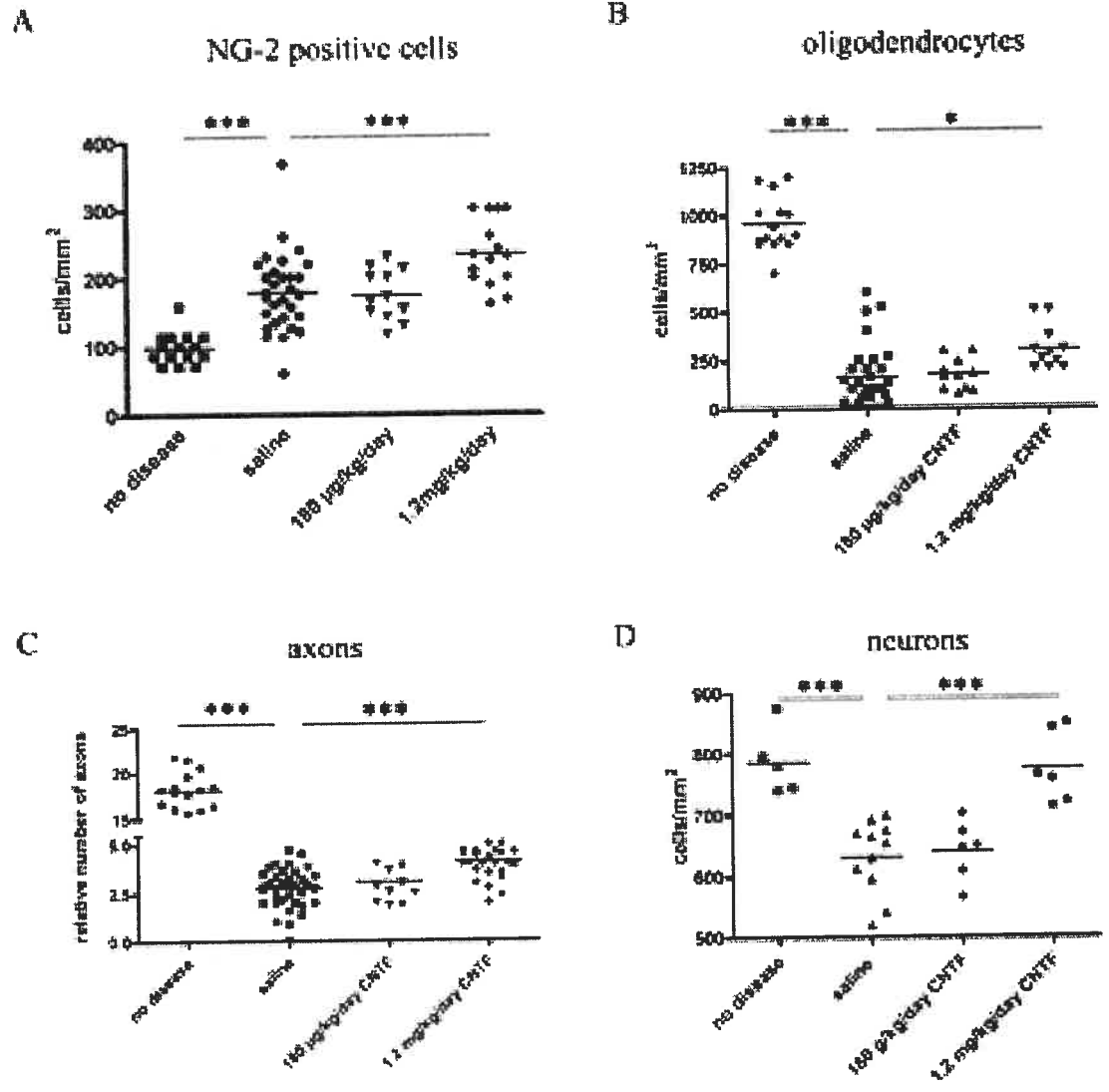


Figure 5. Morphological changes in EAE lesions. Immunohistological analysis of mice in the chronic disease phase [day 28-36 after immunization with (MOG)₃₅₋₅₅ peptide]. **A:** Immunization with MOG₍₃₅₋₅₅₎ peptide leads to focal loss of oligodendrocytes and myelin [immunohistochemistry for PLP (red) combined with *in situ* hybridization for PLP mRNA (blue cytoplasmic signal)]. The **arrows** mark the border of the lesion. **B:** EAE lesions are characterized by a clear reduction in the number of axons (same lesion as in **A**, Bielschowsky's silver impregnation). **C:** In EAE lesions cells with morphologic characteristics of apoptosis such as condensed and/or fragmented nuclei are found (**arrows**). **D:** A proportion of apoptotic cells are oligodendrocytes as identified by immunohistochemistry with CNPase (brown). The apoptotic cell expresses CNPase on the cell surface (**arrow**). **C** and **D:** Immunohistochemistry with anti-CNPase, counterstained with hematoxylin. **E** and **F:** Immunohistochemistry for NG2 (brown) reveals a marked up-regulation of NG2-positive cells (**arrows**) in EAE lesions (**F**) compared to unaffected white matter (**E**). **G:** Within white matter lesions numerous cells with fragmented DNA are observed that stain positive in the TUNEL reaction (**left panel, black, arrows**). The **right panel** depicts the adjacent grey matter. No TUNEL positive neurons are seen in the grey matter (**arrows**), but one small non-neuronal cell is TUNEL positive (**arrowhead**) [TUNEL staining (black) combined with nuclear fast red]. **H:** In the anterior horns of spinal cord grey matter swollen, weakly eosinophilic neurons were found that lack Nissl bodies (**arrows**).

Figure 5

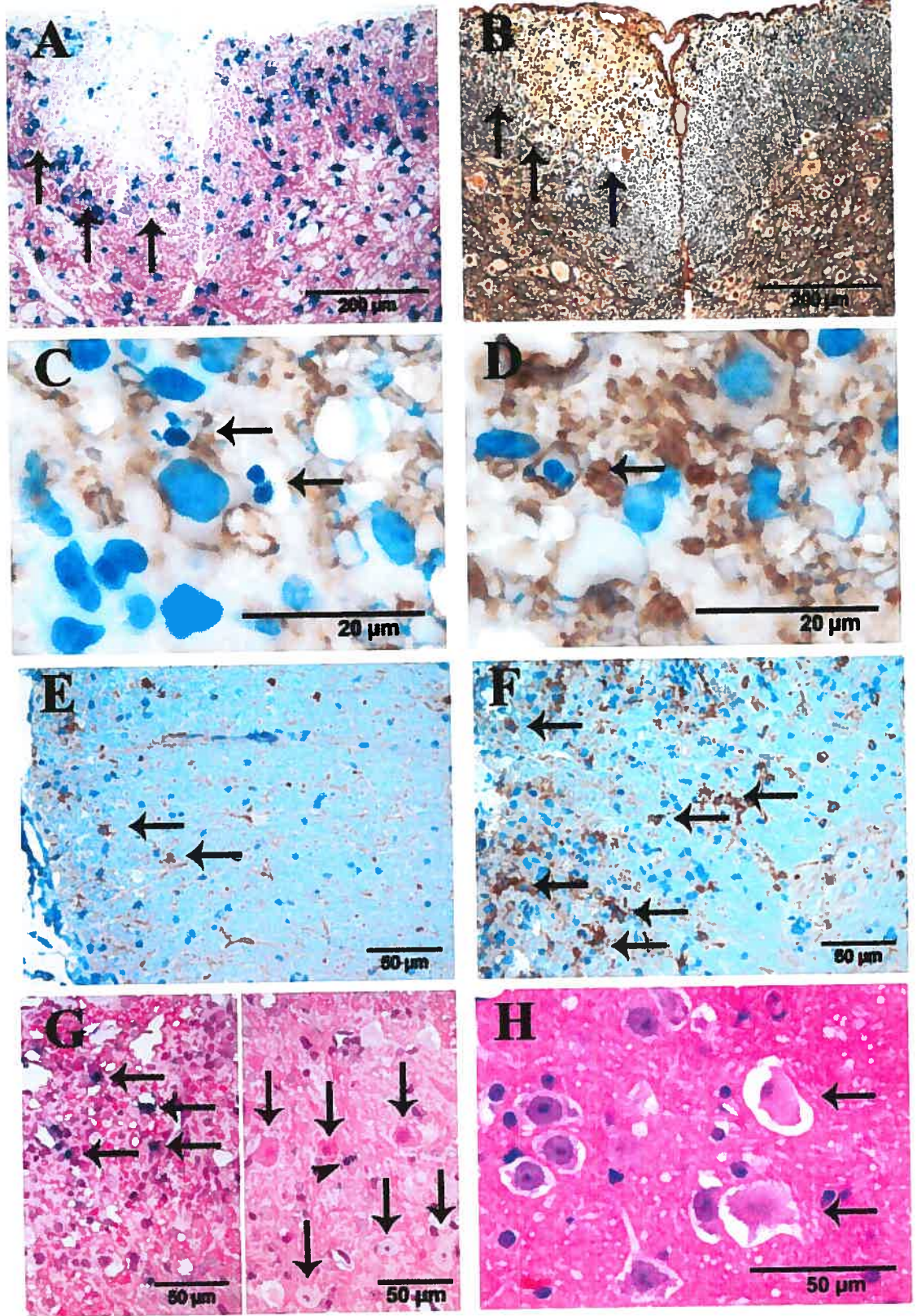


Table 1. Number of NG2-Positive Cells, Oligodendrocytes, Axons and Thoracic Neurons in Healthy Animals and in EAE Mice Injected with Saline or Different Concentrations of CNTF.

	No-EAE mice (n = 5)	Saline (n = 12)	60 µg/kg/day CNTF (n = 7)	180 µg/kg/day CNTF (n = 8)	1.2 mg/kg/day CNTF (n = 6)	Significance (saline vs 1.2 mg/kg/day CNTF)
NG2-positive cells (cells/mm ²)	98 +/- 6	173 +/- 9	186 +/- 26	177 +/- 10	234 +/- 13	p = 0.001
Oligodendrocytes (cells/mm ² , PLP-ISH)	956 +/- 36	163 +/- 30	n.d.	176 +/- 24	303 +/- 33	p = 0.012
CNPase positive apoptotic figures	n.d.	33 +/- 4	11 +/- 3	21 +/- 6	18 +/- 7	p = 0.058
Axons (relative number, Bielschowsky's staining)	17.97 +/- 0.51	2.87 +/- 0.18	2.77 +/- 0.20	3.0 +/- 0.26	4.16 +/- 0.21	p < 0.0001
Neurons (cells/mm ² , NeuN staining)	788 +/- 25	632 +/- 18	681 +/- 38	641 +/- 20	774 +/- 24	p = 0.001
Perivascular infiltrates	-	4.9 +/- 0.8	2.4 +/- 1.0	2.8 +/- 0.7	4.3 +/- 0.7	ns
T cells in lesion	-	1893 +/- 121	2332 +/- 185	2259 +/- 130	1796 +/- 167	ns
Macrophages in lesion	-	769 +/- 66	824 +/- 78	795 +/- 90	636 +/- 86	ns

Animals without disease were sacrificed at 8 to 10 weeks. EAE mice were between 10 to 12 weeks of age when sacrificed.

All values are expressed as mean +/- SEM.

n.d., not determined; n.s., not significant.

References

1. Keegan BM and Noseworthy JH: Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 2002, 53: 285-302
2. Owens T: The enigma of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2003, 16: 259-265
3. Prineas JW: The neuropathology of multiple sclerosis. *Demyelinating Diseases*. Edited by Koetsier JC. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1985, pp. 213-257
4. Lassmann H: Comparative neuropathology of chronic experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. Berlin Heidelberg Springer-Verlag, 1983
5. Bjartmar C, Kidd GJ, Mork S, Rudick R, and Trapp BD: Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2000, 48: 893-901
6. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, Antel JP, and Arnold DL: Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 1998, 121: 1469-1477
7. van Waesberghe JHTM, Kamphorst W, De Groot CJA, van Walderveen MAA, Castelijns JA, Ravid R, van der Valk P, Polman CH, Thompson AJ, and Barkhof F: Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. *Ann Neurol* 1999, 46: 747-754
8. Arnason BG: Treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Biomed Pharmacother* 1999, 53: 344-350
9. Arnon R and Aharoni R: Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101 Suppl 2: 14593-14598

10. Lin F, Mismar D, Lile J, Armes L, Butler E, Vannice J, and Collins F: Purification, cloning and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 1989, 246: 1023-1025
11. Adler R, Iland K, Manthorpe M, and Varon S: Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 1979, 204: 1434-1436
12. Stockli K, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R, Lindholm D, and Thoenen H: Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 1989, 342: 920-923
13. Sleeman M, Anderson K, Lambert P, and Yancopoulos G: The ciliary neurotrophic factor and its receptor. *Pharm Acta Helv* 2000, 74: 265-272
14. Davis S, Aldrich T, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farrugella T, DiStefano P, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, and et al.: Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 1993, 259: 1736-1739
15. Oppenheim R, Prevette D, Yin Q, Collins F, and MacDonald J: Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 1991, 251: 1616-1618
16. Stockli K, Lillien L, Naher-Noe M, Breitfeld G, Hughes R, Raff M, Thoenen H, and Sendtner M: Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 1991, 115: 447-459
17. Ip NY and Yancopoulos G: The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996, 19: 491-515
18. Barres BA, Schmid R, Sendtner M, and Raff MC: Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 1993, 118: 283-295
19. D'Souza SD, Alinauskas KA, and Antel JP: Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury. *J Neurosci Res* 1996, 43: 289-298

20. Arakawa Y, Sendtner M, and Thoenen H: Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* 1990, 10: 3507-3515
21. Louis J-C, Magal E, Takayama S, and Varon S: CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 1993, 259: 689-692
22. Stankoff B, Aigrot MS, Noel F, Wattilliaux A, Zalc B, and Lubetzki C: Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* 2002, 22: 9221-9227
23. Sendtner M, Kreutzberg GW, and Thoenen H: Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990, 345: 440-441
24. Clatterbuck R, Price D, and Koliatsos V: Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal cell death in the adult nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 2222-2226
25. Curtis R, Adryan K, Zhu Y, Harkness P, Lindsay R, and DiStefano P: Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature* 1993, 365: 253-255
26. Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum J, Wong V, and Lindsay R: Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BNF. *Science* 1994, 265: 1107-1110
27. Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli K, Carroll P, Kreutzberg GW, and Thoenen H: Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuropathy. *Nature* 1992, 358: 502-504
28. Miller R, Bryan W, Dietz M, Munsat T, Petajan J, Smith S, and Goodpasture J: Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1996, 47: 1329-1331
29. Anderson K, Panayotatos N, Corcoran T, Lindsay R, and Wiegand S: Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 7346-7351

30. de Almeida L, Zala D, Aebischer P, and Deglon N: Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2001, 8: 433-446
31. Bongioanni, J, Reali, C, and Sogos, V. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. CD004302. 2004. *Cochrane Database Syst Rev*.
32. Miller R, Petajan J, Bryan W, Armon C, Bahrn R, Goodpasture J, Hoagland R, Parry G, Ross M, and Stromatt S: A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* 1996, 39: 256-260
33. Dittrich F, Thoenen H, and Sendtner M: Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol* 2005, 35: 151-163
34. Emerich D: Dose-dependent neurochemical and functional protection afforded by encapsulated CNTF-producing cells. *Cell Transplant* 2004, 13: 839-844
35. Emerich D, Winn S, Hantraye P, Peschanski M, Chen E, Chu Y, McDermott P, Baetge E, and Kordower J: Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 1997, 386: 395-399
36. Bloch J, Bachoud-Levi A, Deglon N, Lefaucheur J, Winkel L, Palfi S, Nguyen J, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugieres P, Boisse M, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, and Peschanski M: Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2004, 15: 968-975
37. Mittoux V, Joseph J, Conde F, Palfi S, Dautry C, Poyot T, Bloch J, Deglon N, Ouary S, Nimchinsky EA, Brouillet E, Hoff P, Peschanski M, Aebischer P, and Hantraye P: Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 2000, 11: 1177-1187

38. Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, and Deguchi T: A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nature Genet* 1994, 7: 79-84
39. Giess R, Mäurer M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, Sendtner M, and Rieckmann P: Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2002, 59: 407-409
40. Hoffmann V, Pohlau D, Przuntek H, Epplen JT, and Hardt C: A null mutation within the ciliary neurotrophic factor (CNTF)-gene: implications for susceptibility and disease severity in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun* 2002, 3: 53-55
41. Butzkeuven H, Zhang J-G, Soilu-Hanninen M, Hochrein H, Chionh F, Shipham KA, Emery B, Turnley AM, Petratos S, Ernst M, Bartlett PF, and Kilpatrick TJ: LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nature Med* 2002, 8: 613-619
42. Maier K, Rau C, Storch MK, Sattler M, Demmer I, Weissert R, Taherri N, Kuhnert A, Bahr M, and Diem R: Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from secondary cell death during acute autoimmune optic neuritis in rats. *Brain Pathol* 2004, 14: 378-387
43. Cognet I, de Coignac A, Magistrelli G, Jeanin P, Aubry J, Maisnier-Patin K, Caron G, Chevalier S, Humbert E, Nguyen T, Beck A, Valin D, Delneste Y, Malissard M, and Gauchat J: Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of *Escherichia coli* BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. *J Immunol Methods* 2003, 272: 199-210
44. Cognet I, Guilhot F, Chevalier S, Guay-Giroux A, Bert A, Elson G, Gascan H, and Gauchat J: Expression of biologically active mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) and soluble CNTF α in *Escherichia coli* and characterization of their functional specificities. *Eur Cytokine Netw* 2004, 15: 255-262

45. Overbergh L, Valckx D, Waer M, and Mathieu C: Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 1999, 11: 305-312
46. Shi L, Jung Y, Tyagi S, Gennaro M, and North R: Expression of TH-1 mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristics of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 241-246
47. Zehntner SP, Brickman C, Bourbonnière L, Remington L, Caruso M, and Owens T: Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell response. *J Immunol* 2005, 174: 5124-5131
48. Chen J, Murphy M, Willingham M, Pastan I, and August J: Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol* 1985, 101: 85-95
49. Breitschopf H, Suchanek G, Gould RM, Colman DR, and Lassmann H: In situ hybridization with digoxigenin-labeled probes: sensitive and reliable detection method applied to myelinating rat brain. *Acta Neuropathol* 1992, 84: 581-587
50. Lambert P, Anderson K, Sleeman M, Wong T, Tan J, Hjarunguru A, Corcoran T, Murray J, Thabet K, Yancopoulos G, and Wiegand S: Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 4652-4657
51. Kuchroo VK: T-cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 101-123
52. Hamm S, Dehouck B, Kraus J, Wolburg-Buchholz K, Wolburg h, Risau W, Cecchelli R, Engelhardt B, and Dehouck M: Astrocyte mediate modulation of blood-brain-barrier permeability does not correlate with loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res* 2004, 315: 157-166

53. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, and Engelhardt B: Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol* 2005, 109: 181-190
54. Nishiyama A, Lin X, Giese N, Heldin C, and Stallcup W: Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 1996, 43: 299-314
55. Stegmüller J, Schneider S, Hellwig A, Garwood J, and Trotter J: AN2, the mouse homologue of NG2, is a surface antigen on glial precursor cells implicated in control of cell migration. *J Neurocytol* 2002, 31: 497-505
56. Levine JM and Reynolds R: Activation and proliferation of rat endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 1999, 160: 333-47
57. Reynolds R, Cenci di Bello I, Dawson M, and Levine J: The response of adult oligodendrocyte progenitors to demyelination in EAE. *Prog Brain Res* 2001, 132: 165-174
58. Maier K, Rau C, Storch MK, Sättler M, Demmer I, Weissert R, Taheri N, Kuhnert A, Bähr M, and Diem R: ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from secondary cell death during acute autoimmune optic neuritis in rats. *Brain Pathol* 2004, 14: 378-387
59. Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, and Raff MC: Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* 1992, 23: 1221-1230
60. Mayer M, Bhakoo KK, and Noble M: Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes. *Development* 1994, 120: 143-153
61. Linker RA, Mäurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, and Gold R: CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nature Med* 2002, 8: 620-624

62. Gearing D, Comeau M, Friend D, Gimpel S, Thut C, McCourty J, Brasher K, King J, Gillis S, Mosley B, and et al.: The IL-6 signal transducer, gp 130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992, 255: 1434-1437
63. Gearing D, Thut C, VandeBos T, Gimpel S, Delaney P, King J, Price V, Cosman D, and Beckmann M: Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp 130. *EMBO J* 1991, 10: 2839-2848
64. Ip NY, Nye S, Boulton T, Davis S, Taga T, Li Y, Birren S, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson D, and et al.: CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the the IL-6 signal transducing receptor component gp 130. *Cell* 1992, 69: 1121-1132
65. Hilton D, Nicola N, and Metcalf D: Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leucocytic monocytic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 5971-5975
66. Hilton D, Nicola NA, and Metcalf D: Distribution and comparison of receptor for leukemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells. *J Cell Physiol* 1991, 146: 207-215
67. Kahn MA, Ellison JA, Speight GJ, and de Vellis J: CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 1995, 685: 55-67
68. Hagg T, Varon S, and Louis J: Ciliary neurotrophic factor (CNTF) promotes low-affinity nerve growth factor receptor and CD4 expression by rat CNS microglia. *J Neuroimmunol* 1993, 48: 177-187
69. Aboul-Enein F, Bauer J, Klein M, Schubart A, Flugel A, Ritter T, Kawakami N, Siedler F, Linington C, Wekerle H, Lassmann H, and Bradl M: Selective and antigen-dependent effects of myelin degeneration on central nervous system inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004, 63: 1284-1296
70. Pan W, Kastin A, Manness L, and Brennan J: Saturably entry of ciliary neurotrophic factor into brain. *Neurosci Lett* 1999, 263: 69-71

71. Poduslo J and Curran G: Permeability of the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Mol Brain Res* 1996, 36: 280-286
72. Dittrich F, Thoenen H, and Sendtner M: Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol* 1994, 35: 151-163
73. Floris S, Blezer EL, Schreibelt G, Dopp E, van der Pol SM, Schadee-Eestermans IL, Nicolay K, Dijkstra CD, and de Vries HE: Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* 2004, 127: 616-627
74. Ruprecht K, Kuhlmann T, Seif F, Hummel V, Kruse N, Brück W, and Rieckmann P: Effects of Oncostatin M on human cerebral endothelial cells and expression in inflammatory brain lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001, 60: 1087-1098
75. Benigni F, Villa P, Demitri M, Sacco S, Sipe J, Lagunowich L, Panayotatos N, and Ghezzi P: Ciliary neurotrophic factor inhibits brain and peripheral tumor necrosis factor production and, when coadministered with its soluble receptor, protects mice from lipopolysaccharide toxicity. *Mol Med* 1995, 1: 568-575
76. Helgren M, Squinto S, Davis H, Parry D, Boulton T, Heck C, Zhu Y, Yancopoulos G, Lindsay R, and DiStefano P: Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 1994, 76: 493-504
77. Bays H: Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obesity Research* 2004, 12: 1197-1211
78. Henderson J, Seniuk N, Richardson P, Gauldie J, and Roder J: Systemic administration of ciliary neurotrophic factor induces cachexia in rodents. *J Clin Invest* 1994, 93: 2632-2638
79. Sleeman M, Garcia K, Liu R, Murray J, Malinova L, Moncrieffe G, Yancopoulos G, and Wiegand S: Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 14297-14302

80. Kokoeva M, Yin H, and Flier J: Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 2005, 310: 679-683

81. Aebischer P, Schlupe M, Deglon N, Joseph J, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang J, Zurn A, Kato A, Regli F, and Baetge E: Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogenic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nature Med* 1996, 2: 696-699

82. Penn R, Kroin J, York M, and Cedarbaum J: Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery* 1997, 40: 94-100

83. Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grotzinger J, Rose-John S, and Kallen K: Signaling of human ciliary factor (CNTF) revisited. *J Biol Chem* 2003, 278: 9528-9535

84. Panayotatos N, Radziejewska E, Acheson A, Pearsall D, Thadani A, and Wong V: Exchange of a single amino acid interconverts the specific activity and gel mobility of human and rat ciliary neurotrophic factors. *J Biol Chem* 1993, 268: 19000-19003

“Reprinted from *Am. J. Pathol.* 2006 169: 584-598 with permission from the American Society for Investigative Pathology.”