

Thèse de Doctorat

Dihia MEGHNEM

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
École doctorale : Biologie Santé Nantes-Angers

Discipline : *Biologie, Médecine et Santé*

Spécialité : *immunologie*

Unité de recherche : *Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers*

Soutenu le : *9 décembre 2016*

Développement de nouveaux antagonistes de l'interleukine-15

JURY

Rapporteurs : Jean-Claude LECRON, Professeur des universités- PU, Université de Poitiers

Bertrand MERESSE, chargé de recherche, Lille.

Examineurs : Fabienne HASPOT-DEGAUQUE, chargé de recherche, INSERM U1064, Nantes

Bénédicte Manoury, Chargé de recherche, INSERM 1013, Paris

Invité(s) : Xavier SAULQUIN, Professeur des universités, CRCNA, Nantes

Directeur de Thèse : Yannick JACQUES, directeur de recherche émérite, CRCNA, Nantes

Co-directeur de Thèse : Erwan MORTIER, Chargé de recherche, CRCNA, Nantes

President du jury : Dr Xavier SAULQUIN

Remerciement

Je souhaite remercier particulièrement mes deux rapporteurs de thèse les docteurs Bertrand Meresse et Jean-Claude Lecron d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et de consacrer du temps pour la lecture de mon manuscrit.

Je remercie également les docteurs Bénédicte Manoury et Fabienne Haspot-Degauque d'avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse. Je les remercie également leurs précieux conseils lors des rendez vous annuels pour le comité de suivis de thèse.

Je remercie le docteur Xavier Saulquin d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse entant que membre invité.

Je remercie le docteur Yannick Jacques de m'avoir accueillie dans son laboratoire durant ces trois ans de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Erwan Mortier de m'avoir fait confiance pour réaliser cette thèse sous sa direction. Je te remercie pour ton encadrement, ton accompagnement, tes conseils scientifiques tout le long de ces trois ans. Un grand merci également pour ton soutien et tes encouragements dans les moments de doute, ce fut une très bonne expérience humaine et scientifique que de travailler avec toi. Je tiens particulièrement à te remercier pour ta bonne humeur quotidienne au laboratoire. J'ai appris au bout de ces trois ans que :

« Le chef a toujours raison ☺ »

Je remercie particulièrement Sebastien Morisseau qui a participé activement dans ce projet. Merci pour ton aide, tes conseils, tes blagues et de pas m'avoir mis dans la poubelle☺.

Un grand merci à Isabelle Barbieux pour son aide dans mon projet, en cytométrie et pour toutes les séances « papotage et conseils de maman ». Je remercie également Agnès Quemener pour ses nombreux conseils scientifiques, les figures de modélisation moléculaire et ses innombrables explications des testes statistiques et GraphPad.

Ma co-thésarde Marie Frutoso, Je suis très heureuse d'avoir partagé ces trois ans de thèse avec toi. Merci pour ta bonne humeur, la lecture quotidienne de l'horoscope, les expériences partagées à l'animalerie, les pauses café, les bières after work...etc

KiKi, un grand merci pour ton écoute, ta bonne humeur dans la salle de culture (c'est die !) et les innombrables pauses café. Merci de m'avoir soutenu et encouragé durant la période « younamaar »

Je souhaite remercier Mike Maillon, Geraldine Teppaz, Delphine Feron, Juliette Fitau-patay pour les très bons moments partagés durant ces trois ans.

Un merci très particulier à nos adorables stagiaires Alizée Steer, Sarah Kaddage, Malo Daniel, Lysa Bauerschmidt. J'ai passé d'excellents moments avec vous et je suis contente de vous avoir connu.

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes de l'unité de recherche U892 qui ont contribué de loin ou de près à ces trois belles années de thèse. Je remercie Cynthia, Julien et Giancarlo pour votre soutien et les belles soirées passées avec vous.

Je remercie infiniment Lamia et Albert de m'avoir encouragé à venir en France pour poursuivre mes études, de m'avoir soutenu, rassuré et aiguillé dans cette belle expérience.

Un immense merci à Paulo pour son soutien quotidien, ses encouragements et sa présence. Merci d'avoir supporté mes crises « IL-15 ☺ ».

Un grand merci et hommage à Vava Amar et Yemma Ouardia. Je vous remercie pour votre présence, votre soutien et vos encouragements malgré l'éloignement.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAU	4
LISTE DES ABREVIATIONS :	5
RESUME	7
SUMMARY	8
I. GENERALITES	10
A. LES CYTOKINES	10
1. <i>Familles des cytokines</i>	12
2. <i>Récepteurs des cytokines</i>	12
II. LES CYTOKINES HEMATOPOÏÉTIQUES	13
A. STRUCTURE DES RECEPTEURS DES CYTOKINES HEMATOPOÏÉTIQUES.....	13
1. <i>Famille gp130</i>	14
2. <i>Famille de la chaîne β_c</i>	15
3. <i>Famille de la chaîne γ_c</i>	16
a) <i>Signalisation des récepteurs de la famille γ_c</i>	17
III. BIOLOGIE DE L'IL-15 ET DE L'IL-2	18
A. CARACTERISTIQUES DES GENES DE L'IL-15 ET DE L'IL-2.....	19
B. EXPRESSION ET REGULATION DE L'IL-15 ET DE L'IL-2	23
1. <i>IL-15</i>	23
a) <i>Régulation transcriptionnelle</i>	24
b) <i>Régulations traductionnelles et post-traductionnelles</i>	25
2. <i>IL-2</i>	26
a) <i>Régulation transcriptionnelle</i>	26
b) <i>Stabilisation des ARNm</i>	27
C. COMPARAISON DES STRUCTURES DE L'IL-15 ET DE L'IL-2	28
D. RECEPTEURS DE L'IL-15 ET DE L'IL-2	28
1. <i>La chaîne réceptrice β</i>	29
2. <i>La chaîne γ_c</i>	29
3. <i>Les chaînes spécifiques de l'IL-15 et de l'IL-2 : $IL-15R\alpha$ et $IL-2R\alpha$</i>	30
A. LE RECEPTEUR $IL-15R\alpha$	30
1. <i>Caractéristiques du gène de l'$IL-15R\alpha$</i>	30
2. <i>Régulation de l'expression de l'$IL-15R\alpha$</i>	30
3. <i>Protéine de l'$IL-15R\alpha$</i>	32
B. LE RECEPTEUR $IL-2R\alpha$	34
1. <i>Caractéristiques du gène de l'$IL-2R\alpha$</i>	34
2. <i>Régulation de l'expression de l'$IL-2R\alpha$</i>	35
3. <i>Protéine de l'$IL-2R\alpha$</i>	36
C. INTERACTION DE L'IL-15 ET DE L'IL-2 AVEC LEURS RECEPTEURS	37
D. MODE D'ACTION DE L'IL-15	39
E. SIGNALISATION DE L'IL-15 ET DE L'IL-2.....	40
IV. LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DE L'IL-15 SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES:	43
A. LES CELLULES NK.....	43
1. <i>Développement</i>	43
2. <i>Survie</i>	44
3. <i>Activation</i>	44
B. LES LYMPHOCYTES $T\alpha\beta$	45
1. <i>Le développement</i>	45
2. <i>Survie des lymphocytes CD8 mémoires</i>	46
3. <i>Activation</i>	46

C.	LES CELLULES NK-T.....	46
D.	LES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$	47
E.	LES LYMPHOCYTES T INTRA-EPITHELIAUX.....	47
F.	AUTRES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	48
V.	ACTION DE L'IL-15 SUR LES CELLULES NON-IMMUNITAIRES.....	49
VI.	ROLE DE L'IL-15 DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE.....	49
A.	MALADIES INFECTIEUSES.....	49
B.	MALADIES INFLAMMATOIRES.....	51
1.	<i>La polyarthrite rhumatoïde.....</i>	51
2.	<i>Diabète de type I.....</i>	52
3.	<i>Maladies inflammatoires de l'intestin.....</i>	52
C.	REJET DE GREFFE.....	53
D.	LES CANCERS.....	54
1.	<i>Rôle pro-tumoral.....</i>	54
2.	<i>Rôle anti-tumoral.....</i>	55
VII.	L'IL-15 EN THERAPIE.....	56
A.	THERAPIE PAR STIMULATION DE L'IL-15.....	56
B.	THERAPIE PAR INHIBITION DE L'IL-15.....	58
1.	<i>Antagoniste.....</i>	58
2.	<i>AMG 714 (HuMaxIL-15).....</i>	60
3.	<i>Récepteur soluble IL-15Rα.....</i>	60
4.	<i>Inhibition du récepteur de l'IL-15.....</i>	61
a)	<i>Anticorps anti-IL-2/15Rβ (mμ1).....</i>	61
b)	<i>siARN dirigés contre IL-2/15Rβ.....</i>	61
VIII.	DEVELOPPEMENT D'ANTAGONISTES DE L'IL-15.....	63
A.	LE NANTIL-15.....	64
1.	<i>Stratégie d'inhibition et production du NANTIL-15.....</i>	64
2.	<i>Caractérisation du NANTIL-15 in vitro.....</i>	66
a)	<i>Spécificité d'inhibition du NANTIL-15.....</i>	66
b)	<i>Effet du NANTIL-15 est dépendant de l'expression de la chaîne IL-15Rα.....</i>	67
c)	<i>Effet du NANTIL-15 sur la trans-présentation.....</i>	71
3.	<i>Caractérisation de l'effet du NANTIL-15 in vivo.....</i>	74
a)	<i>Etude de la pharmacocinétique.....</i>	74
b)	<i>Effets du NANTIL-15 sur l'homéostasie des cellules NK et CD8⁺.....</i>	75
c)	<i>Inhibition de l'effet induit par l'IL-15 exogène.....</i>	79
d)	<i>Effet du NANTIL-15 sur l'évolution de l'arthrite.....</i>	80
4.	<i>Discussion.....</i>	86
B.	BIG : INHIBITEUR DU RECEPTEUR IL-2/15R $\beta\gamma$	92
1.	<i>Stratégie d'inhibition.....</i>	92
2.	<i>Article.....</i>	93
IX.	TRANS-PRESENTATION HOMOTYPIQUE DE L'IL-15.....	103
A.	MISE EN EVIDENCE DE LA TRANS-PRESENTATION HOMOTYPIQUE.....	105
1.	<i>Propagation du signal parmi les cellules NK-92.....</i>	105
2.	<i>La propagation du signal est spécifique de l'IL-15.....</i>	106
3.	<i>La propagation du signal est dépendante du contact physique.....</i>	108
4.	<i>Inhibition de la propagation du signal par BiG.....</i>	109
5.	<i>Implication des molécules d'adhésion dans la trans-présentation homotypique</i> <i>110</i>	
a)	<i>Expression membranaire des molécules d'adhésion.....</i>	110
b)	<i>Inhibition des molécules d'adhésion lors de la trans-présentation</i> <i>homotypique.....</i>	111
B.	TRANS-PRESENTATION HOMOTYPIQUE SUR LES CELLULES NK PRIMAIRES HUMAINES.....	112
1.	<i>Expression des chaînes réceptrices de l'IL-15 sur les cellules NK.....</i>	112
2.	<i>Expression des molécules d'adhésion.....</i>	114
3.	<i>Test de trans-présentation homotypique.....</i>	115

C. DISCUSSION.....	117
X. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	120
MATERIELS ET METHODES.....	124
REFERENCES.....	129
ANNEXE	143

Liste des figures

Figure 1 : Modes d'action des cytokines.....	10
Figure 2 : Redondance et pleiotropie des cytokines.	11
Figure 3 : Structure des recepteurs des cytokines hematopoïetiques.	14
Figure 4 : Recepteurs utilisant la chaîne gp130 pour la signalisation	15
Figure 5 : Cytokines utilisant la chaîne β_c	16
Figure 6 : Famille des cytokines utilisant la chaîne γ_c	17
Figure 7 : Les voies des signalisation de la famille des cytokines utilisant la chaîne γ_c	18
Figure 8 : Cartographie du gene et des isoformes de l'il-15 humaine	21
Figure 9 : Cartographie du gene de l'il-2 humaine	22
Figure 10 : Comparaison des genes de l'il-15 et de l'IL-2	23
Figure 11 : Comparaison des structures quaternaires de l'IL-15 et de l'IL-2..	28
Figure 12 : Structure du gene et les differentes isoformes de l'IL-15R α	31
Figure 13 : Structure et composition de la chaîne IL-15R α mature.....	33
Figure 14 : Structures du gene et de la proteine du recepteur IL-2R α	35
Figure 15 : Recepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15 et leurs affinites.	37
Figure 16 : Comparaison de l'interaction de l'IL-15 et de l'IL-2 avec les recepteurs	38
Figure 17 : Mode d'action de l'IL-15.	40
Figure 18 : Voies de signalisation intracellulaire de l'IL-15.....	42
Figure 19 : Implication de l'IL-15 dans les pathologies.....	56
Figure 20: Schema de la composition de l'antagoniste NANTIL-15.....	64
Figure 21 : Mode d'action du NANTIL-15	65
Figure 22 : Caracterisation du NANTIL-15..	66
Figure 23 : Specificite d'inhibition de la proliferation des cellules CTLL-2 par le NANTIL-15.	67
Figure 24 : Le NANTIL-15 ne presente pas d'effet inhibiteur sur les recepteurs dimerique IL-2/15R $\beta\gamma$. 69	
Figure 25 : L'effet inhibiteur du nantil-15 est tributaire de l'expression de la chaîne IL-15R α	70
Figure 26 : Le NANTIL-15 n'inhibe pas la <i>trans</i> -presentation de l'IL-15..	73
Figure 27 : Etude de la demi-vie plasmatique du NANTIL-15 <i>in vivo</i>	74
Figure 28 : Effet du traitement court par le NANTIL-15 sur l'homeostasie des cellules NK et lymphocytes T CD8 ⁺	76
Figure 29 : Effet du traitement continu par le NANTIL-15 sur l'homeostasie des cellules NK et lymphocytes T CD8 ⁺	78
Figure 30 : Inhibition de l'activation des cellules NK par l'IL-15 exogene.....	80
Figure 31 : Effet du NANTIL-15 sur l'evolution de l'arthrite.	83
Figure 32 : Le traitement avec le NANTIL-15 reduit l'infiltrat dans les jonctions inter phalangiennes. ...	85
Figure 33 : Modele hypothetique du mode d'action du NANTIL-15.	91
Figure 34 : Schema de la composition de l'antagoniste BIG.	92
Figure 35: Mode d'action de BIG	93
Figure 36 : Cinetique du signal pstat-5 dans les cellules NK-92 et Kit225..	104
Figure 37 : Etude de la <i>trans</i> -presentation homotypique de l'IL-15 entre les cellules NK-92.	105
Figure 38 : <i>trans</i> -presentation homotypique de l'IL-15.	107
Figure 39 : La transmission du signal pstat-5 entre cellules NK-92 est dependante du contact cellulaire.108	
Figure 40 : Inhibition de la <i>trans</i> -presentation homotypique de l'IL-15 entre cellules nk-92.	109
Figure 41 : Expression des molecules d'adhesion.....	110
Figure 42 : Inhibition de la molecule d'adhesion LFA-1.	112
Figure 43 : Expression des chaînes receptrices de l'IL-15 à la surface des cellules NK humaines.	113
Figure 44 : Expression des molecules d'adhesion ICAM-1/-2/-3 et LFA-1 à la surface des cellules NK humaines	114
Figure 45 : Enrichissement des cellules nk humaine et inhibition de la <i>trans</i> -presentation homotypique de l'IL-15 entre cellules NK-92	116

LISTE DES TABLEAU

Table 1 : Role de l'il-15 sur les cellules du systeme immunitaires autres que les cellules NK et les CD8 ⁺	48
Table 2 : Résumé des differents inhibiteurs de l'IL-15 est leurs cibles	62

Liste des abréviations :

a.a: acide aminé
Ac: anticorps
ADAM: A Desintegrin And Metalloprotease
ADN: Acide désoxyribonucléique
ALT : Adult T Cell Leukemia
AML1: Acute Myeloid Leukemia 1 protein (connu aussi sous le nom de Runx1)
AP-1: Activator Protein 1
ARNm : Acide ribonucléique messenger
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
B-CLL : B-cell Chronic Lymphatic Leukemia
Bcl-x_L : B-cell lymphoma-extra large
BSA : Bovine Serum Albumin
CD: Cluster of Differentiation
CGF: Colony Growth Factor
CLC: Cardiotrophin-Like Cytokine
CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor
COS-7: CV-1 in Origin with SV40 genes
CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes
CRD: Cystein Rich Domain
CREB: cAMP-Responsive Element-Binding protein
CREM: cAMP-Responsive Element Modulator
CRH: Cytokine Receptor Homology domain
CT-1: Cardiotrophin-1
CTC: Cutaneous T-Cell lymphoma
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
DSS: Dextran Sulphate Sodium
EBNA: Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1
EGF: Epidermal Growth Factor
EPO: Erythropoïétine
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases
FADD: FAS-Associated Death Domain
FL: Follicular Lymphoma
Foxp3: Forkhead box P3
G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Gp130: Glycoprotein 130
HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy
HDAC: Histone Deacetylase
HHV-8: Human Herpes Virus 8
HL: Hodgkin's Lymphoma
HMGI(Y): High-Mobility Group
HTLV-1: Human T cells Leukemia Virus 1
ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule 1
IELs: IntraEpithelial Lymphoid cells
IFN: Interféron
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
IRF: Interferon Regulatory Factor
IRF-E: Interferon Regulatory Factor response Element
JAK: Janus Associated Kinases
Kb: Kilobase
K_d: Constante cinétique d'association

K_d: Constante cinétique de dissociation
kDa: Kilodalton
LCK: Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase
LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LIF: Leukemia Inhibitory Factor
LPS: Lypopolysaccharide
LSP: Long Signal Peptide
M: Molaire
Mac-1: Macrophage-1 antigen
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor
MIP1 α : Macrophage Inflammatory Proteins 1 α
NF90: Nuclear Factor 90
NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells
NF κ B: Nuclear Factor Kappa B
NK: Natural Killer
NKG2D: Natural-Killer Group 2, member D
NK-T: Natural Killer T cells
NRE: Negative Regulatory Element
OCT-1: Organic Cation Transporter
OSM: Oncostatin M
Pb: Paire de base
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1: Programmed cell Death 1
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PLD1: Phospholipase D1
PolyIC: Polyinosinic:polycytidylic acid
PRL: Prolactin
PRR: Positive Regulatory Region
RANK-L: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand
Runx-1: Runt-related transcription factor 1
SH2: Src Homology 2
Spl: Squamosa Promoter Binding Protein-Like
SSP: Short Signal Peptide
SSP: Short Signal Peptide
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TACE: Tumor necrosis factor- α -Converting Enzyme
Tax: Transactivator of pX
TCR: T Cell Receptor
TGF: Transforming Growth Factor
Th1/2: T helper 1/2
TIP60: Tat-Interactive Protein 60, connue aussi comme Histone acetyltransferase KAT5
TNF: Tumor Necrosis Factor
TPO: Thrombopoïétine
TRADD: TNF-R1-Associated Death Domain protein
TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS: Virus de l'Immunodéficience Simienne
VSV: Virus de la Stomatite Vésiculaire
X-SCID: X linked Severe Combined Immunodeficiency

Résumé

L'IL-15 et l'IL-2 sont deux cytokines fonctionnellement très proches et nécessaires à l'activation et la prolifération des cellules immunitaires telles que les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. Le rôle activateur de l'IL-15 et de l'IL-2 fait de celles-ci deux acteurs importants dans les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires. Dans cette étude, nous avons développé un premier antagoniste de l'IL-15 nommé NANTIL-15 qui se fixe au récepteur IL-15R α mais ne recrute pas la chaîne IL-15R β et inhibe spécifiquement l'IL-15. Le NANTIL-15 n'affecte pas l'homéostasie des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ chez la souris. Dans un modèle murin d'arthrite, le NANTIL-15 réduit les cliniques et le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ dans le site inflammatoire. Le deuxième antagoniste, nommé BiG, se fixe au récepteur IL-2/15R β avec une haute affinité mais ne recrute pas la chaîne IL-2/15R γ . BiG inhibe les fonctions effectrices de l'IL-15 et de l'IL-2 sur les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. En présence de la chaîne IL-2R α , BiG n'a aucun impact sur les fonctions régulatrices de l'IL-2 sur les cellules T-reg. Ainsi BiG favorise le ratio régulateur/effecteur du système immunitaire. Dans un modèle murin de greffe de peau, BiG permet de ralentir le rejet des greffons. Enfin des travaux réalisés sur la lignée de cellules humaines NK-92 et les cellules NK humaines primaires ont permis de mettre en évidence une « *trans*-présentation homotypique » de l'IL-15. En effet, les cellules NK chargées avec l'IL-15 et non l'IL-2, *trans*-présentent cette IL-15 aux cellules NK voisines. Ce travail a également montré que cette *trans*-présentation homotypique est dépendante du contact physique entre les cellules et impliquerait les molécules d'adhésion telle que LFA-1.

Mots clés: cytokines, interleukine-15, interleukine-2, antagoniste, *trans*-présentation, inflammation, tolérance, *trans*-présentation homotypique, molécule d'adhésion.

Summary

IL-15 and IL-2 are cytokines which, functionally speaking, are very close. They are necessary for the activation and proliferation of immune cells such as NK cells and CD8⁺ T lymphocytes. The activator role of IL-15 and IL-2 is a major player in the autoimmune and inflammatory diseases. In this study, we developed a first antagonist named NANTIL-15, which binds to IL-15R α receptor but does not recruit the IL-2/15R β chain and specifically inhibits IL-15 induced activation. NANTIL-15 has no effect on the homeostasis of NK cells and CD8⁺ T cells in mice. In a mouse model of arthritis, NANTIL-15 reduced the clinical sign and the recruitment of CD8⁺ T cells into the inflammatory site. The second antagonist we developed, called BiG, binds to the IL-2 /15R β receptor with high affinity but does not recruit the IL-2/15R γ chain. BiG inhibits the effector functions of IL-15 and IL-2 on NK cells and CD8⁺ T lymphocytes. In the presence of the IL-2R α chain, BiG has no impact on the regulatory functions of IL-2 on T-reg cells. Thus BiG promotes the regulator/effector ratio in the immune system. In a mouse model of skin grafting, BiG delayed graft rejection. Finally the work done on human cell line NK-92 and primary human NK cells highlighted a "homotypic *trans*-presentation" of IL-15. Indeed, NK cells loaded with IL-15, but not IL-2, can *trans*-present this IL-15 to neighboring NK cells. This work also showed that this homotypic presentation is dependent on physical contact between NK cells, and involves adhesion molecules such as LFA-1.

Keywords: cytokines, interleukin-15, interleukin-2, antagonist, *trans*-presentation, inflammation, tolerance, homotypic *trans*-presentation, adhesion molecule.

Introduction

L'organisme des mammifères est composé d'un réseau complexe de différentes cellules et de médiateurs solubles qui assurent son bon fonctionnement et son intégrité.

Les cellules du système immunitaire ont pour rôle la défense de l'organisme contre les infections virales, les infections bactériennes, les infections parasitaires et les dérèglements auto-immuns.

Deux types de cellules immunitaires sont distingués :

- Les cellules de la réponse immunitaire innée telles que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural Killer). Ces cellules offrent la première ligne de défense immunitaire grâce à leur capacité à reconnaître le non-soi de manière rapide et non spécifique.
- Les cellules de la réponse adaptative, constituées de lymphocytes B et T. Leur action se caractérise par la diversité et la spécificité du répertoire de reconnaissance des antigènes et par l'établissement d'un phénotype « mémoire » lors de chaque réponse immunitaire.

Afin d'assurer le dialogue entre les cellules immunitaires et de coordonner une réponse immunitaire globale efficace (innée et adaptative), les différents effecteurs établissent des communications par des contacts membranaires physiques ou par des médiateurs solubles. Les médiateurs solubles qui influencent le comportement et la communication entre les cellules du système immunitaire sont appelés « cytokines ».

L'engagement des cytokines avec leurs récepteurs exprimés sur les cellules cibles déclenche des cascades de signalisations intracellulaires conduisant à différents effets biologiques telles que la différenciation, la prolifération, l'activation, la survie ou la mort de la cellule cible.

I. Généralités.

A. Les cytokines

Les cytokines sont une famille de glycoprotéines comptant plus de 130 membres identifiés à ce jour, pouvant être solubles ou membranaires et ayant un rôle dans l'hématopoïèse et la modulation des réponses immunitaires (Steinke and Borish, 2006). Sous leur forme soluble, les cytokines agissent de trois manières : autocrine sur les cellules productrices elles-mêmes, paracrine sur les cellules voisines ou endocrine sur les cellules distantes en empruntant la voie sanguine (**figure 1**).

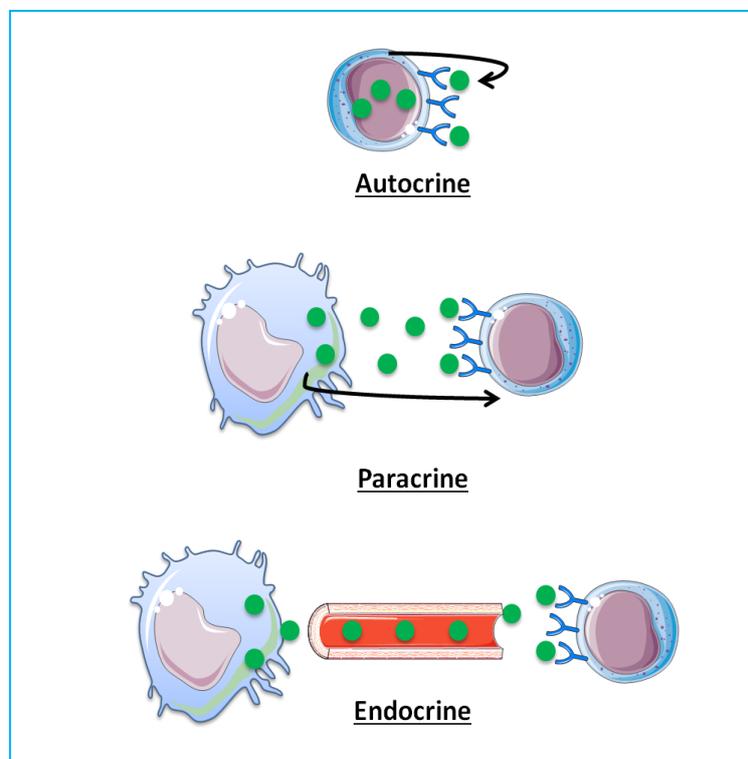


Figure 1 : Modes d'action des cytokines. Les cytokines agissent de manière autocrine sur la cellule sécrétrice elle-même, de manière paracrine sur les cellules voisines ou de manière endocrine sur les cellules éloignées en empruntant la voie sanguine.

Une cytokine est dite pléiotrope lorsqu'elle agit sur différents types cellulaires et induit des réponses variées telles la prolifération, la survie, la différenciation, la maturation ou l'inflammation (**figure 2**). A l'inverse, elles sont dites redondantes lorsque plusieurs cytokines

induisent une réponse identique sur la même cellule cible (Ozaki and Leonard, 2002; Robb, 2007) (**figure 2**).

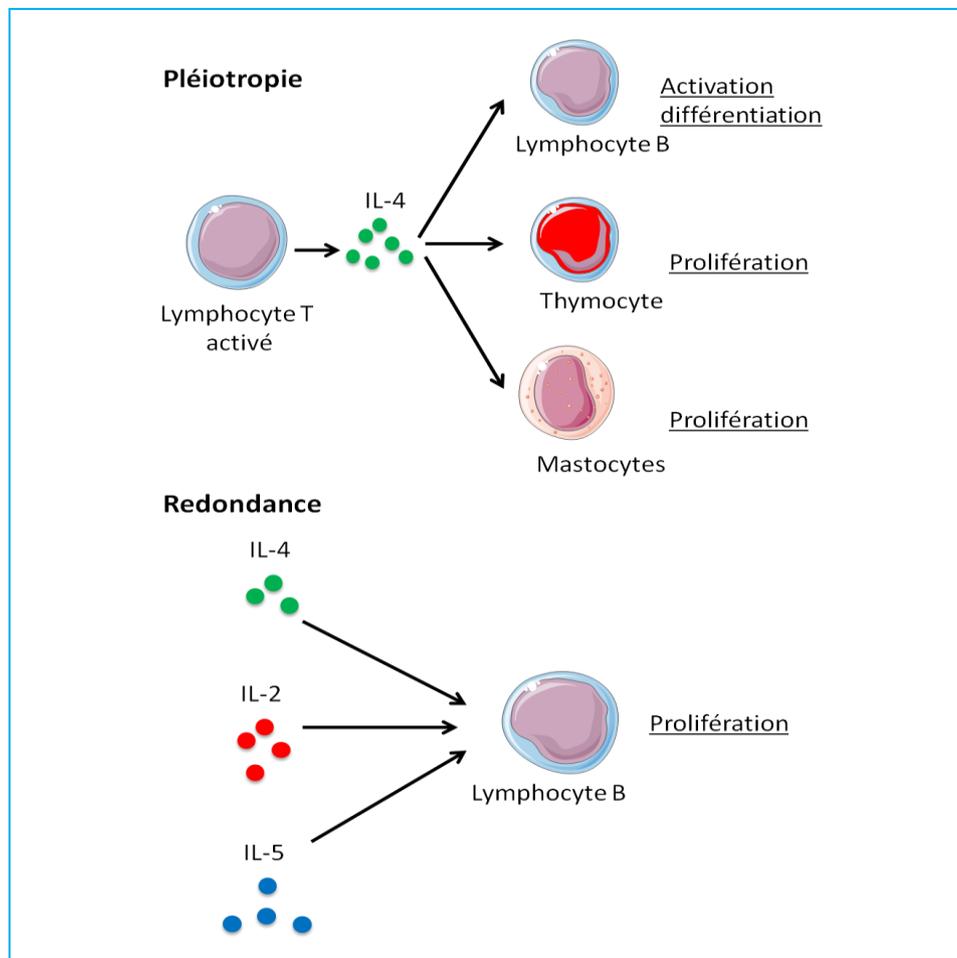


Figure 2 : Redondance et pléiotropie des cytokines. Une cytokine pléiotropique agit sur différentes cellules et induit divers effets tels que la prolifération, la différenciation. Les cytokines redondantes agissent sur une même cellule avec le même effet.

Les cytokines peuvent avoir des actions antagonistes, synergiques ou additives sur la cellule cible. Ainsi une cytokine peut induire la sécrétion en cascade d'autres cytokines et avoir un rétrocontrôle négatif ou positif sur sa propre expression.

1. Familles des cytokines

Les cytokines sont produites par différents types cellulaires et sont classées en sous-familles structurellement proches mais disposant de différentes fonctions (Vacchelli et al. 2012). Les cytokines sont répertoriées en neuf groupes :

- Chimioquinas
- Hématopoïétines
- Interleukine 1 (IL-1)
- Interleukine 10 (IL-10)
- Interleukine 17 (IL-17)
- Interférons (IFNs)
- Transforming Growth Factors (TGF)
- Platelet-Derived Growth Factors (PDGF)
- Tumor Necrosis Factors (TNF)

2. Récepteurs des cytokines

Les récepteurs de cytokines sont classés en six familles, selon leurs homologies structurales et fonctionnelles.

- Récepteurs des cytokines hématopoïétiques (récepteurs de Type I)
- Récepteurs de la famille des interférons et de l'IL-10 (récepteurs de Type II)
- Récepteurs de la super famille du TNF (récepteurs de Type III)
- Récepteurs des chimiokines
- Récepteurs des cytokines de la famille de TGF- β
- Récepteurs apparentés à la famille des immunoglobulines

II. Les cytokines hématopoïétiques

Le groupe des cytokines hématopoïétiques se compose de 27 membres ayant chacun un rôle important dans le développement et la différenciation des cellules hématopoïétiques, ainsi que dans l'activation des cellules matures.

A. Structure des récepteurs des cytokines hématopoïétiques

Les récepteurs hématopoïétiques sont des récepteurs membranaires de type I avec un domaine extracellulaire en N-terminal et un domaine intracellulaire en C-terminal. Le domaine extracellulaire, constitué d'environ 200 acides aminés, possède un motif caractéristique CHR (Cytokine Homology Region) composé de deux domaines fibronectine de type III et un domaine très conservé composé d'un ou plusieurs résidus cystéine. En C-terminal, les récepteurs de cette famille contiennent le motif tryptophane-serine-X-tryptophane-serine (W-S-X-W-S) indispensable pour le maintien de leur structure quaternaire mais non nécessaire pour l'activité (**figure 3**). Certains récepteurs hématopoïétiques, telles que la chaîne gp130 ou le récepteur du LIF, contiennent également des domaines Ig. Les récepteurs des cytokines IL-2 et IL-15 n'ont aucun domaine CHR, mais des domaines Sushi. La partie intracellulaire des récepteurs de cytokines hématopoïétiques ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. Cependant elle est constitutivement associée à des tyrosines kinases (Baker et al., 2007).

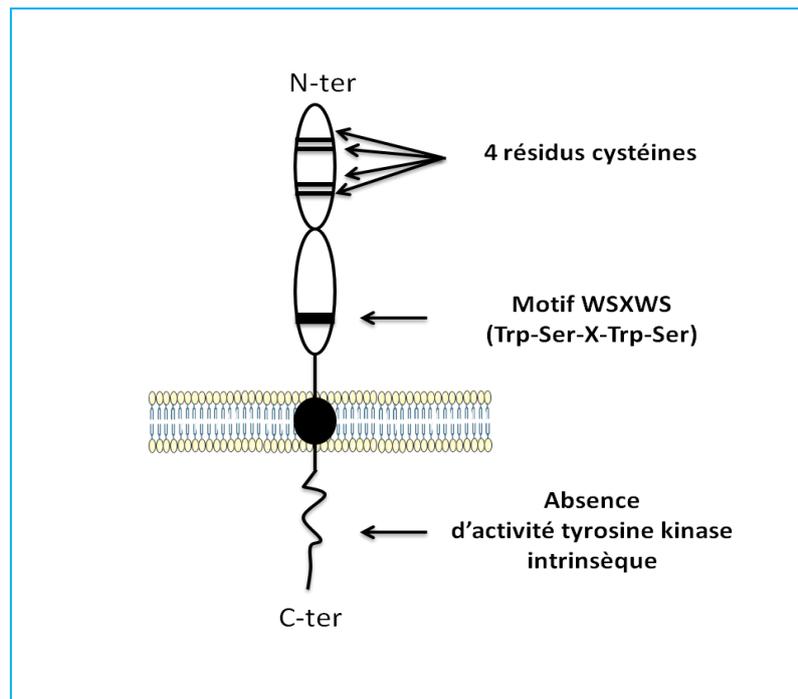


Figure 3 : Structure des récepteurs des cytokines hématopoïétiques. Le récepteur des cytokines hématopoïétiques est composé d'un domaine extracellulaire avec 4 cystéines et un motif WSXWS et un domaine intracellulaire dépourvu d'activité tyrosine kinase.

1. Famille gp130

Les membres de cette famille induisent leurs signaux par le biais de la chaîne gp130. L'IL-6, l'IL-11, l'IL-27, le cardiotrophin-1(CT-1), le LIF, le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), l'Oncostatin-M (OSM) et la cytokine Cardiotrophine-Like (CLC) utilisent différents récepteurs multimériques en combinaison avec la chaîne gp130. Par exemple, la liaison de gp130 avec les récepteurs IL-6R α ou IL-11R α dépourvus de domaine intracellulaire de signalisation, forme des récepteurs multimériques qui induisent des signaux intracellulaires après fixation de l'IL-6 ou de l'IL-11 (Wang et al., 2009) (**figure 4**).

Les cytokines de la famille gp130 possèdent un domaine appelé site III receptor-binding (liaison aux récepteurs) nécessaire à la liaison à la chaîne gp130 et à son activation. Le domaine extracellulaire du récepteur gp130 est composé d'un domaine Ig unique, suivi d'un module CHR (Cytokine Homology Receptor) et de trois domaines fibronectin-like. Le site III,

caractéristique des cytokines de ce groupe, interagit avec le domaine Ig de gp130 (Boulanger and Garcia, 2004).

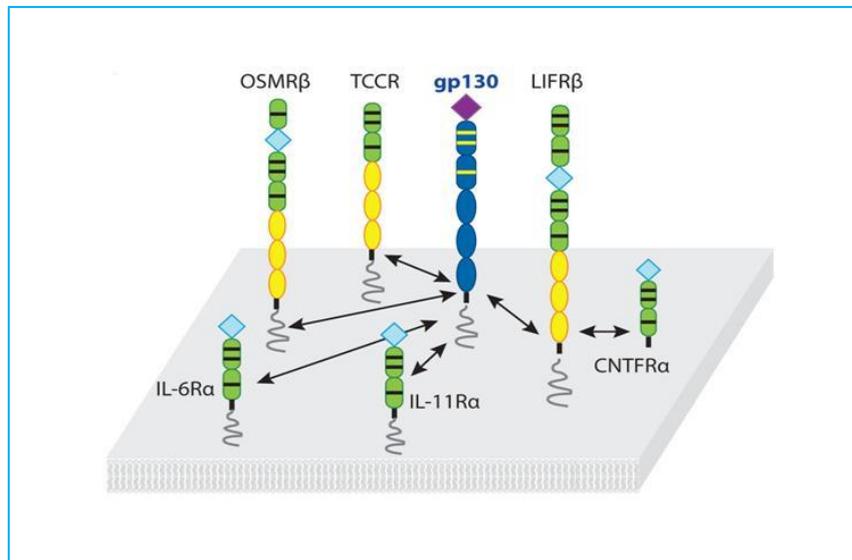


Figure 4 : Récepteurs utilisant la chaîne gp130 pour la signalisation. La chaîne gp130 s'hétérodimerise avec les récepteurs spécifiques de l'IL-6, l'IL-11, l'IL-27, du cardiotrophin-1 (CT-1), du LIF, du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), de l'Oncostatin-M (OSM) et de la cytokine Cardiotrophine-Like (CLC) pour induire un signal.

2. Famille de la chaîne β_c

La chaîne β commune (β_c) est un récepteur membranaire, utilisé pour la transduction du signal par les cytokines IL-5, IL-3 et GM-CSF. Ces trois cytokines interagissent avec la chaîne β_c complexée à leurs récepteurs spécifiques de type α de haute affinité (**figure 5**). La liaison d'une cytokine à son récepteur α et à la chaîne β_c forme un complexe activé induisant un signal intracellulaire principalement par l'association de JAK-2 au domaine cytoplasmique de la chaîne β_c (Bagley et al., 1997; Tavernier et al., 1995).

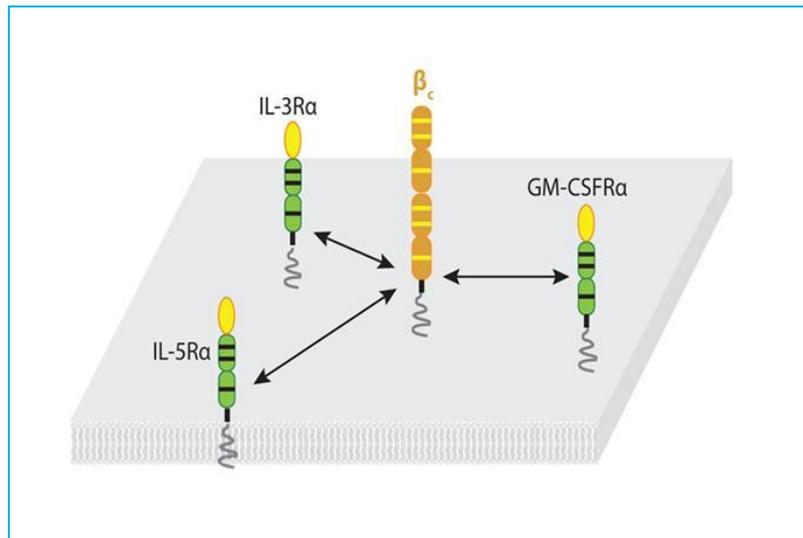


Figure 5 : Cytokines utilisant la chaîne β_c . Les cytokines IL-3, IL-5 et le GM-CSF utilisent leurs récepteurs spécifiques et la chaîne commune β_c pour induire un signal.

3. Famille de la chaîne γ_c

La famille des cytokines utilisant la chaîne γ_c (γ commune) est constituée de l'IL-2, l'IL-15, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-21 (**figure 6**). Son importance est illustrée par sa mutation qui induit l'élimination de l'activité des cytokines dépendantes de la chaîne γ_c , provoquant ainsi le Syndrome d'Immunodéficience Combinée Sévère (X-SCID) (Russell et al., 1994). Les récepteurs spécifiques alpha ($R\alpha$) des cytokines IL-7, IL-9, IL-21 et IL-4 forment des hétérodimères avec la chaîne γ_c . Les cytokines IL-2 et IL-15 utilisent des récepteurs trimériques composés de leurs chaînes spécifiques respectives $R\alpha$ et du dimère commun composé de la chaîne β et de la chaîne γ_c (Ma et al., 2006).

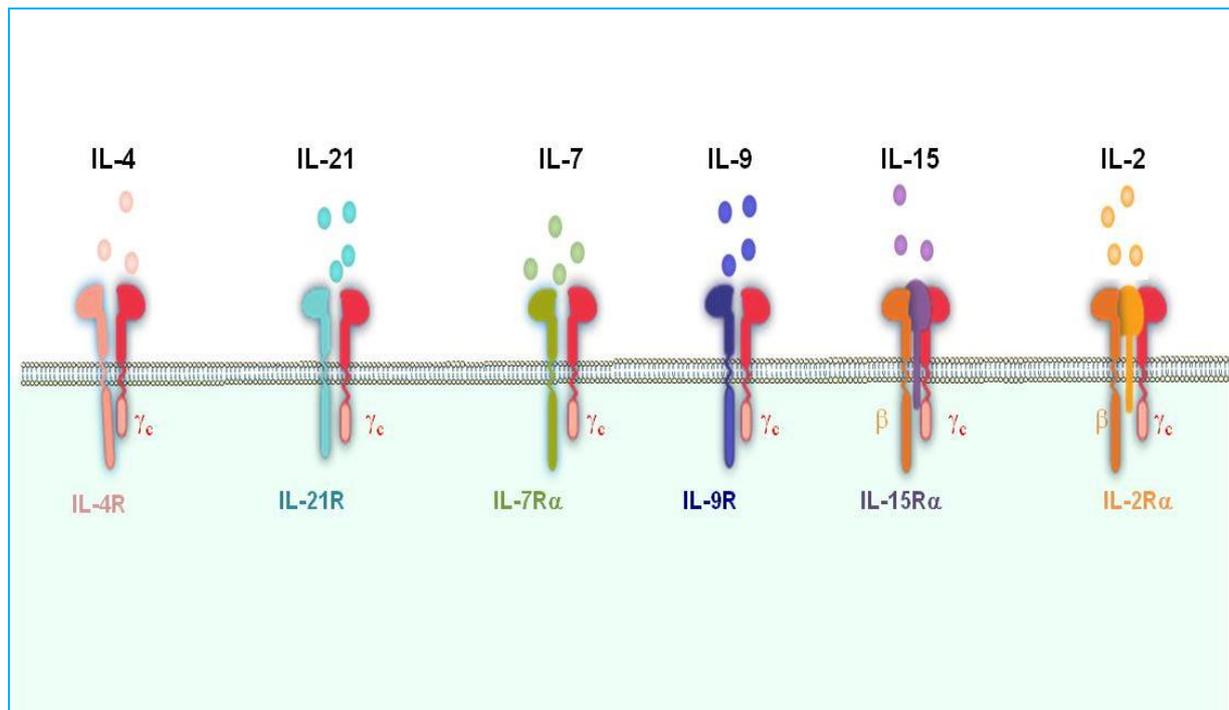


Figure 6 : Famille des cytokines utilisant la chaîne γ_c . La chaîne γ_c est utilisée par les cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 pour induire leur signal.

a) Signalisation des récepteurs de la famille γ_c

Les cytokines utilisant la chaîne γ_c induisent leurs signaux grâce aux voies de signalisation JAK/STAT. Les cytokines IL-2, IL-7, IL-9 et IL-15 induisent principalement STAT5A et STAT5B. Les cytokines IL-4 et IL-21 activent les facteurs de transcription respectivement STAT6 et STAT3 (**figure 7**). L'hétérodimérisation des cytokines avec leurs récepteurs induit le rapprochement des parties intracellulaires des sous-unités transductrices. Ce rapprochement active des kinases JAK/TYK qui par la suite s'auto-phosphorylent et phosphorylent les parties intracellulaires des récepteurs. Les résidus phospho-tyrosine sur les récepteurs constituent des sites d'ancrage pour une deuxième famille de protéines STAT. Cette liaison des protéines entraîne une auto-phosphorylation des protéines STAT puis leur dissociation du récepteur suivi de leur hétérodimérisation et finalement leur translocation vers le noyau. Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques utilisent d'autres voies de transduction de signal telles que les kinases RAS-RAF-MAP et/ou la kinase PI3 (Baker et al., 2007).

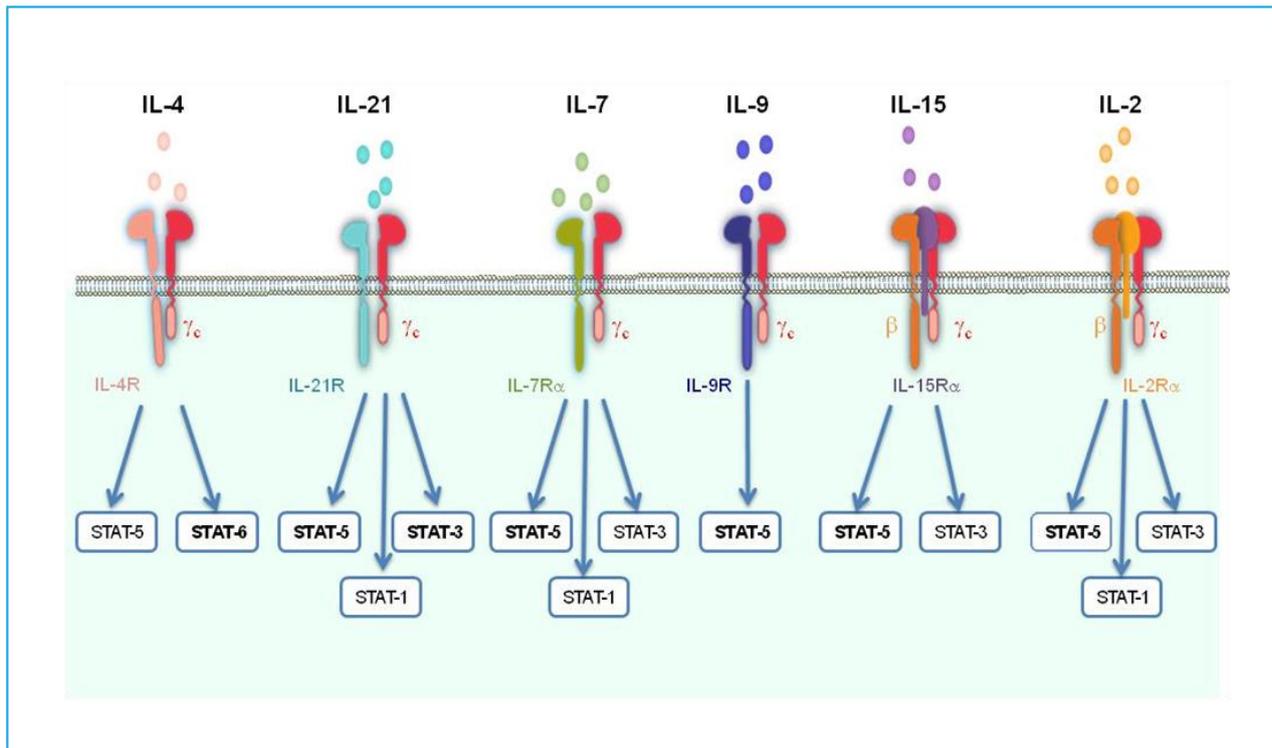


Figure 7 : Les voies de signalisation de la Famille des cytokines utilisant la chaîne γ_c : La fixation des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 à leurs récepteurs induit la signalisation via les différents facteurs de transcription STAT-1, STAT-3, STAT-5 et STAT-6.

III. Biologie de l'IL-15 et de l'IL-2

L'IL-15 et l'IL-2 sont deux cytokines appartenant à la famille des cytokines hématopoïétiques et à la sous-famille utilisant la chaîne commune γ_c . Elles régulent de nombreux aspects des immunités innée et adaptative.

Les cytokines IL-15 et IL-2 appartiennent à la famille des cytokines à 4 hélices α amphipathiques et présentent de nombreuses activités biologiques communes, telles la prolifération des lymphocytes T. Cette redondance d'activité s'explique par le partage de la chaîne β (IL-2/15R β) et de la chaîne γ_c (IL-2/15R γ_c) (Giri et al., 1994). Cependant des études ont montré que ces cytokines agissent différemment dans le système immunitaire, notamment grâce à leur récepteur spécifique R α respectif (IL-2R α et IL-15R α).

L'IL-15 module les fonctions des lymphocytes B, des mastocytes, des neutrophiles, des éosinophiles, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Elle a un rôle particulièrement important dans le développement, la survie et les fonctions des cellules T CD8⁺ et NK (Ma et al., 2006).

L'IL-15 a été découverte simultanément par deux groupes en 1994, grâce à sa capacité à mimer l'action de l'IL-2 sur la prolifération des lymphocytes T. D'une part l'équipe de Burton a montré que les cellules HuT-102 (lymphome T humain associé au virus-1 HTLV-1) secrètent une protéine de 14 kDa, appelée IL-T, capable de faire proliférer et d'activer les cellules T (Burton et al., 1994). D'autre part, l'équipe de Grabstein a isolé une protéine de 14 à 15 kDa nommée IL-15 à partir de surnageant de cellules CV-1/EBNA (lignée épithéliale rénale de singe), induisant la prolifération des cellules murines CTLL-2 dépendante de l'IL-2 (Grabstein et al., 1994).

L'IL-2, également connue sous le nom de lymphokine ou facteur de croissance des cellules T, a été mise en évidence par l'équipe de Gallo en 1976 et l'équipe de Kendall en 1978 dans le surnageant de culture de cellules lymphocytaires T grâce sa capacité à induire la prolifération d'autres cellules T activées. L'IL-2 intervient dans la prolifération, la différenciation, la survie des lymphocytes T et B activés et la cytotoxicité des cellules NK. (Baker et al., 1978; Morgan et al., 1976).

A. Caractéristiques des gènes de l'IL-15 et de l'IL-2

L'IL-15 est une cytokine hautement conservée entre les espèces. Sa forme humaine présente une homologie de 97% avec la forme simienne. Le gène de l'IL-15 est composé de 34 kb. Il se situe sur le chromosome 4q31 chez l'homme et sur le chromosome 8 chez la souris (Anderson et al., 1995a). Il est composé de neuf exons et de huit introns, mais la

protéine mature est codée par quatre exons seulement (Grabstein et al., 1994). Un exon supplémentaire existe chez l'homme (4a) et chez la souris (5a).

Deux isoformes de l'IL-15 sont produites selon la présence de l'exon supplémentaire : une forme avec un long peptide signal de 48 acides aminés **IL-15LSP** (Long Signaling Peptide) ou une forme courte ayant un peptide signal de 21 acides aminés **IL-15SSP** (Short Signaling Peptide) (Meazza et al., 1996). Chez l'homme, le long peptide signal de la forme IL-15LSP est composé de 48 acides aminés et est codé par les exons 3, 4 et une partie de l'exon 5. L'insertion de 119 pb entre l'exon 4 et l'exon 5 avec trois codons STOP prématurés correspondant à la région 4a, donne naissance, par épissage, à un peptide signal plus court de 21 acides aminés (**figure 8**). Chez la souris, la forme courte du peptide signal est composée de 26 acides aminés et résulte de l'insertion de 136 pb dans la région nommée 5a.

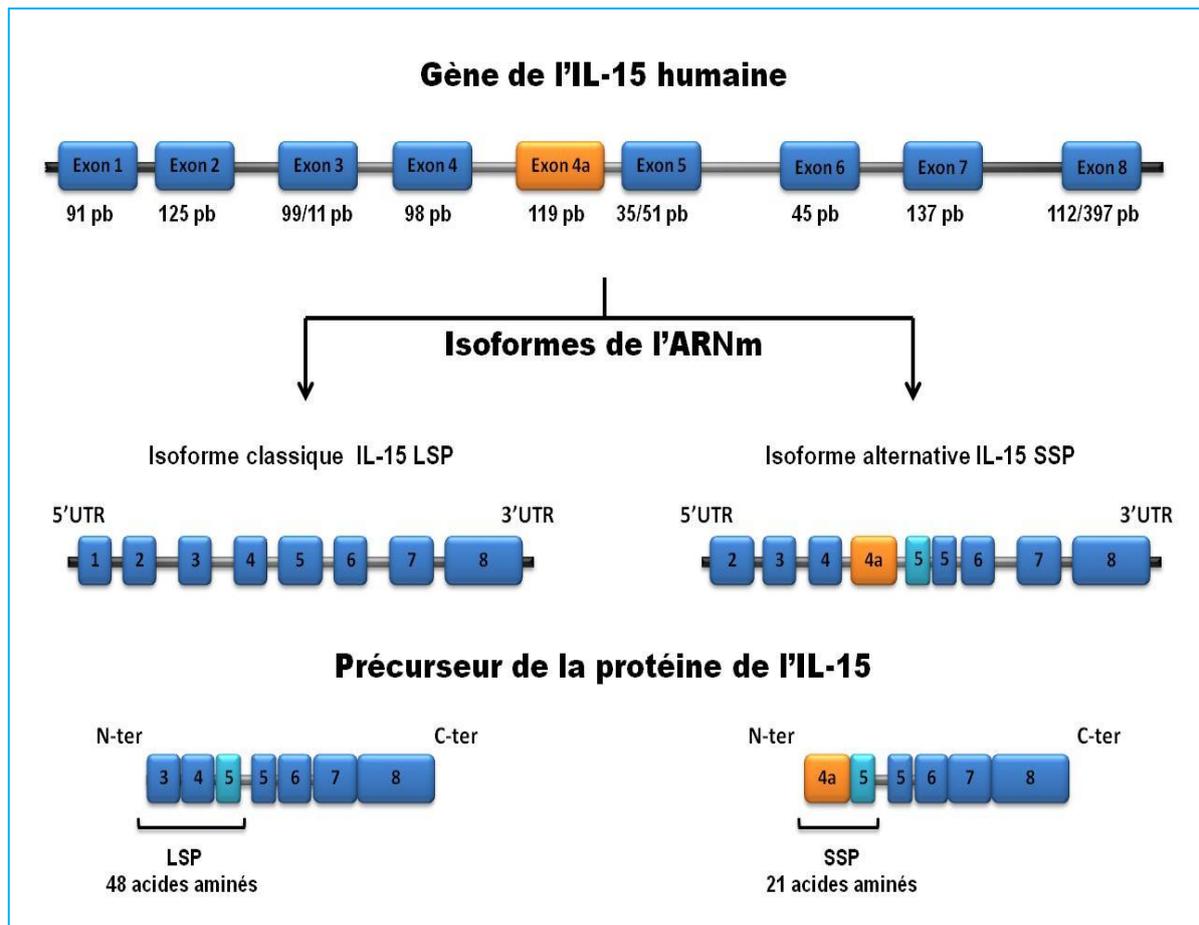


Figure 8 : Cartographie du gène et des isoformes de l'IL-15 humaine. Le gène de l'IL-15 est composé de 8 exons et un exon alternatif 4a. L'absence ou la présence de l'exon 4a, produit deux isoformes du transcrite de l'IL-15 : la forme LSP et la forme SSP. La forme LSP est produite en absence de l'exon 4a et le signal peptide de cette forme est constitué de 48 acides aminés. La forme SSP est produite par l'introduction de l'exon alternatif 4a et le peptide signal de cette forme est constitué de 21 acides aminés (Fehniger and Caligiuri, 2001).

Le gène de l'IL-2 se trouve sur le chromosome humain 4q26. La région 5'-UTR du gène de l'IL-2 débute avec un motif consensus TATAAT suivi du premier exon d'environ 180 pb et d'un premier intron de 90 pb. Les deuxième et troisième exons, respectivement composés de 60 et 144 nucléotides, sont séparés par un intron de 2400 pb. Le dernier intron est composé de 1900 pb et précède le reste de l'information génétique en 3'-UTR qui englobe le quatrième exon de 108 pb (**figure 9**) (Devos et al., 1983; Taniguchi et al., 1983).

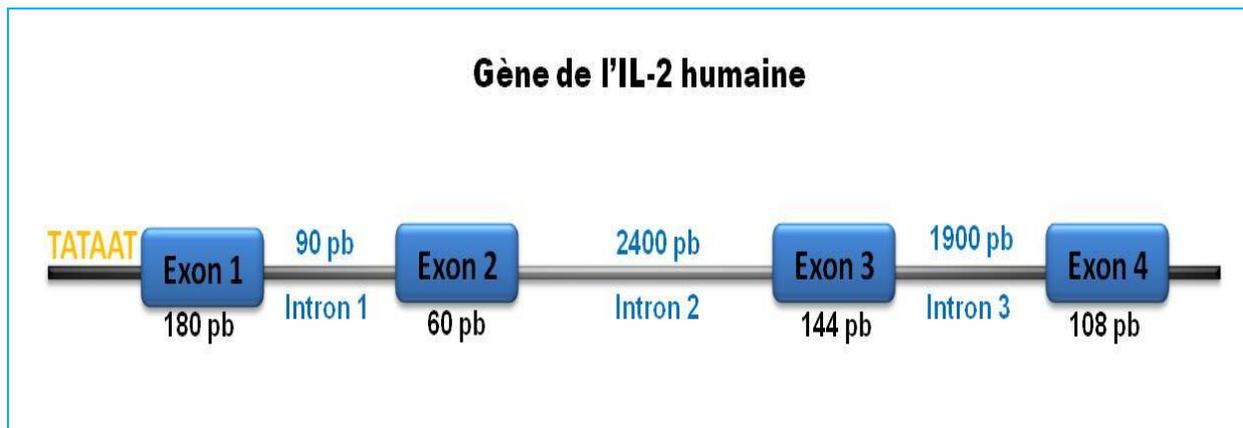


Figure 9 : Cartographie du gène de l'IL-2 humaine. Le gène de l'IL-2 est composé de 4 exons et de 3 introns (Bazan, 1992).

Dans le cas de l'IL-15, les exons 3, 4 et 4a codent pour le peptide signal et seul les exons 5 à 8 codent pour la protéine mature, formant ainsi la structure caractéristique des cytokines à 4 hélices α (**figure 10**). L'alignement des séquences génomiques de l'IL-2 et de l'IL-15 humaines, montre une faible homologie entre les deux gènes qui se traduit par une faible homologie de séquence protéique.

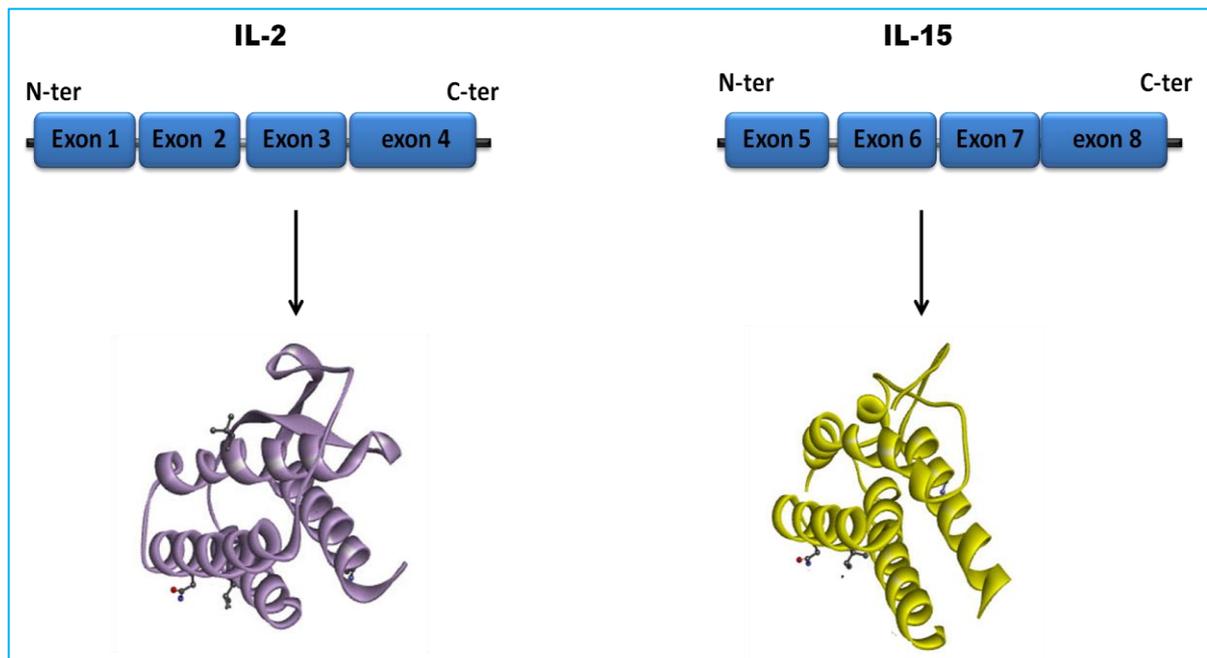


Figure 10 : Comparaison des gènes de l'IL-15 et de l'IL-2. La protéine mature de l'IL-2 est codée par l'intégralité du gène (4 exons). La protéine mature de l'IL-15 est codée par seulement les quatre exons 5, 6, 7 et 8. La traduction des transcrits de l'IL-15 et de l'IL-2 produisent deux protéines matures avec une structure caractéristique à 4 hélices α .

B. Expression et régulation de l'IL-15 et de l'IL-2

1. IL-15

L'ARN messager de l'IL-15, qui est constitutivement exprimé à des faibles taux, est présent dans un très grand nombre de tissus et de types cellulaires tels que les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les kératinocytes, les cellules épithéliales et les cellules stromales. Il est également retrouvé dans les tissus cardiaques, rénaux, hépatiques, musculaires, intestinaux, épidermiques et pulmonaires (Grabstein et al., 1994). La forme protéique de l'IL-15 est restreinte aux cellules épithéliales, aux monocytes, aux macrophages, aux neutrophiles, aux fibroblastes, cellules dendritiques et aux cellules stromales. Cette différence d'expression entre l'ARNm et la protéine est expliquée par la forte régulation de l'IL-15 au niveau de la transcription, la traduction et la sécrétion.

Au niveau cellulaire, les deux isoformes de l'IL-15 diffèrent par leur trafic intracellulaire, leur distribution et leur sécrétion. Les premières études ont montré que la forme IL-15SSP n'est pas sécrétée et reste dans le cytoplasme. Mais une récente étude a montré que la forme IL-15SSP est sécrétée lorsque celle-ci est couplée avec la chaîne IL-15R α . En effet, la forme IL-15SSP est stabilisée par la chaîne IL-15 R α , ce qui forme un complexe IL-15SSP/IL-15R α , biologiquement actif chez la souris et induit l'expansion des cellules NK (Bergamaschi et al., 2009). Par ailleurs, cette forme IL-15SSP est détectée dans le noyau et serait responsable de la régulation de la transcription du gène de l'IL-15 de façon autocrine. L'isoforme IL-15LSP avec un long peptide signal empreinte les compartiments de l'appareil de Golgi, les vésicules de sécrétion et le réticulum endoplasmique puis est sécrétée.

a) Régulation transcriptionnelle

Les IL-15 murine et humaine possèdent de nombreux motifs conservés dans la région régulatrice 5'-UTR tels que NF κ B, IRF-E, γ IRF, NF-IL-6, α IFN-2, myb et CGF. NF κ B et IRF-1 qui sont nécessaires pour l'induction de l'IL-15.

NF κ B : le site NF κ B est situé entre les positions 75 et 65, avant le site d'initiation de la transcription de l'IL-15. Ce site est important pour l'activation du gène de l'IL-15 par la protéine Tax, codée par le virus HTLV-1. La suppression de cette région élimine l'induction de l'IL-15 par Tax (Anderson et al., 1995a; Azimi et al., 1998; Dubois et al., 1999).

IRF-1 : le site IRF-1 est situé entre les positions 295 et 243, en amont du site d'initiation de la transcription. Il induit l'expression de l'IL-15 et contrôle le développement des cellules NK, NK-T et des cellules lymphoïdes intraépithéliales (ILEs) (Waldmann and Tagaya, 1999). Les souris IRF-1^{-/-} présentent une sévère déficience en cellules NK. Bien que les NK produits dans la moelle osseuse, ils présentent un défaut de développement à cause de l'absence de l'IL-15 (Ogasawara et al., 1998).

b) Régulations traductionnelles et post-traductionnelles

Bien que l'ARNm de l'IL-15 soit retrouvé dans différents types cellulaires, sa forme protéique est faiblement détectable. En effet, les monocytes activés par le LPS ou l'IFN γ expriment un fort taux d'ARNm d'IL-15, mais le surnageant de culture présente peu ou pas d'IL-15 sous forme protéique (Bamford et al., 1996). Cette divergence entre l'expression de l'ARNm et l'absence de la forme protéine de l'IL-15 s'expliquerait par sa forte régulation post-transcriptionnelle. Trois niveaux de régulation ont été mis en évidence : les nombreux codons AUG dans la région 5'-UTR, la région C-terminal de la protéine et le long peptide signal de 48 acides aminés.

Codons AUG : la région 5'-UTR est généralement courte, simple et contient peu de codons d'initiation AUG. Dans l'ARNm de l'IL-15, elle est longue et se compose de 465 nucléotides pour la forme humaine et de 352 pour la forme murine. De plus, elle possède de multiples codons AUG : 12 dans l'ARNm humain et 5 dans l'ARNm murin. Cette multiplicité de codons AUG est aussi observée dans les ARNm de l'IL-7, l'IL-11, l'IL-13 et les récepteurs de l'IL-2R α , l'IL-2R β , l'IL-5R α et l'IL-9R α . La déplétion de cette région se traduit par une expression de 12 à 15 fois supérieure d'IL-15 comparé à l'ARNm sauvage, montrant ainsi son importance (Bamford et al., 1996).

Le long peptide signal : Les peptides signaux LSP et SSP de l'IL-15 contribuent à la régulation de son expression. L'isoforme de l'IL-15SSP contenant la région 4a est quatre à cinq fois plus exprimée que la forme IL-15LSP, montrant ainsi l'implication de la longueur du peptide signal dans la régulation de l'expression de l'IL-15. De plus l'inversion des peptides signaux de l'IL-15 et de l'IL-2 augmente de 17 à 20 fois plus l'expression de l'IL-15 et réduit de 40 à 50 fois celle de l'IL-2. (Onu et al., 1997).

Région C-terminale : l'IL-15 est également régulée par la partie C-terminale de sa forme protéique. L'ajout d'un épitope FLAG à l'extrémité C-terminal de l'IL-15, engendre une production de l'IL-15 de 5 à 10 fois plus importante que la protéine native (Bamford et al., 1998).

Lorsque les modifications des trois points de contrôle sont combinées, l'IL-15 est produite 250 fois plus que l'IL-15 sauvage, ce qui montre que l'abrogation de la régulation de l'IL-15 engendre une augmentation majeure de sa production (Bamford et al., 1996). Ces diverses régulations sont indispensables pour le contrôle de l'expression de l'IL-15. En effet, sa surexpression est associée aux inflammations et aux maladies auto-immunes.

2. IL-2

L'IL-2 est principalement produite par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés, mais à moindre échelle par les cellules dendritiques activées, les cellules NK et les cellules NK-T. (Granucci et al., 2001; Jiang et al., 2005). L'IL-2 est sécrétée de manière rapide et transitoire suite aux signaux induits par l'engagement du TCR sur les lymphocytes T et par les signaux de co-stimulation par le CD28. Contrairement à l'IL-15, la régulation de l'expression de l'IL-2 est réalisée au niveau transcriptionnel et au niveau de la stabilisation de son ARNm. En effet la sécrétion transitoire de l'IL-2 est régulée par les signaux du TCR et ceux de costimulation, suivis par des signaux de down-régulation ainsi qu'une dégradation des ARNm.

a) Régulation transcriptionnelle

Le promoteur de l'IL-2 situé en amont du site d'initiation, est composé de 500 bp. Cette région est hautement conservée entre l'homme et la souris. Divers facteurs de transcription tels que NFκB, AP-1, HMG1(Y), Ets, AML1/Runx1, Zfxla, CREM et Foxp3, régulent positivement ou négativement l'expression de l'IL-2 (Crispín and Tsokos, 2009).

NFκB et AP-1: l'engagement du TCR sur les lymphocytes T induit des signaux qui augmentent AP-1 et NFκB. Ces derniers induisent la déphosphorylation de NFAT (Facteurs Nucléaire des cellules T Activés) et ainsi sa translocation dans le noyau. NFAT associé à OCT-1 se lie à la région promotrice et induit la transcription du gène de l'IL-2. D'autres facteurs tels que Fos et Jun, peuvent également se lier à AP-1 (Shaulian and Karin, 2002), activer NFAT et induire l'expression de l'IL-2 (Tsai et al., 1996; Yoshida et al., 1998).

Foxp3 : Divers travaux se sont intéressés à la régulation de l'expression de l'IL-2 par le facteur de transcription Foxp3. Foxp3 est capable de se fixer au promoteur de l'IL-2 et d'inhiber sa production. Il réprime l'activité du complexe NFAT/AP-1 en se liant à NFAT et forme ainsi un complexe Foxp3/NFAT/ADN. Cette association empêche la formation des inducteurs de l'IL-2 : le complexe NFAT/AP-1/ADN et le complexe NFAT/Fos/Jun/DNA inducteurs de l'IL-2 (Bettelli et al., 2005; Wu et al., 2006). Le facteur Foxp3 intervient également dans la réduction de l'acétylation des histones du promoteur de l'IL-2. En effet il interagit avec les enzymes histone acétyltransferase TIP60 et les histones désacétylases HDAC9 et HDAC7 fortement exprimées dans les cellules T régulatrices (Wu et al., 2006). Lorsque Foxp3, TIP60, and HDAC7 sont transfectés dans la lignée lymphocytaire T Jurkat, l'expression de l'IL-2 est supprimée (Li et al., 2007).

b) Stabilisation des ARNm

Le signal de costimulation par le CD28 favorise la production d'IL-2 par l'activation de la protéine NF90. Cette protéine se lie à la région riche en AU, au niveau de l'extrémité 3'UTR de l'ARNm de l'IL-2 puis le stabilise. Dans les cellules quiescentes, NF90 est transloquée du noyau vers le cytoplasme suite à l'activation par le CD28, l'empêchant ainsi de stabiliser l'ARNm d'IL-2 (Pei et al., 2008).

C. Comparaison des structures de l'IL-15 et de l'IL-2

L'IL-15 et l'IL-2 ont une structure en 4 hélices orientées « haut-haut-bas-bas ». L'IL-2 et l'IL-15 sont similaires dans les régions A, C et D mises en jeu dans l'interaction avec la chaîne IL-2/15R β et la chaîne IL-2/15R γ . Les régions les moins conservées entre l'IL-15 et l'IL-2 se situent dans :

- les boucles AB et BC, plus courtes dans la structure de l'IL-15
- la position relative de l'hélice B
- l'absence d'une hélice dans la boucle AB dans la structure de l'IL-15.

Ces différences contribuent à la liaison spécifique de ces deux cytokines à leurs deux chaînes spécifiques respectives R α (Ring et al., 2012) (**figure 11**).

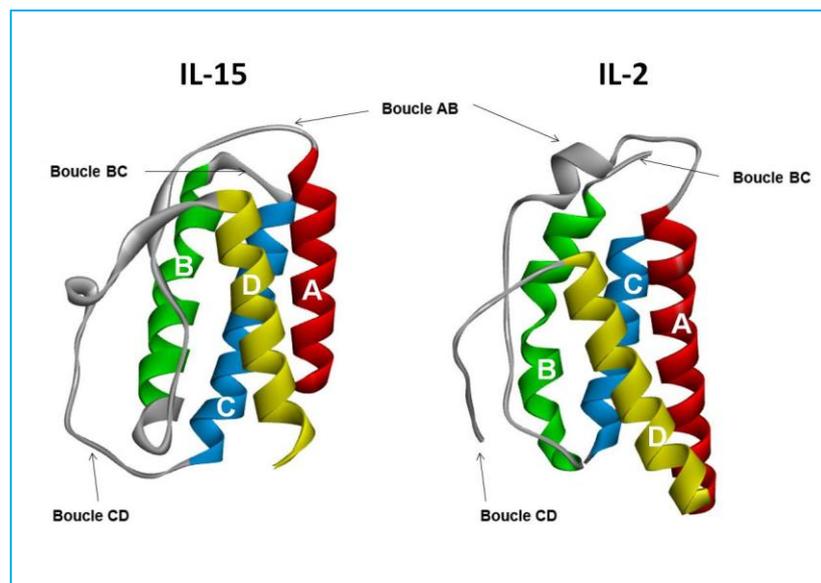


Figure 11 : Comparaison des structures quaternaires de l'IL-15 et de l'IL-2. L'IL-15 et l'IL-2 ont une structure composée de quatre hélices : l'hélice A (rouge), l'hélice B (vert) et hélice C (bleu) et l'hélice D (jaune). Dans les deux structures, elles sont reliées par 3 boucles AB, BC et CD.

D. Récepteurs de l'IL-15 et de l'IL-2

L'IL-15 et l'IL-2 partagent le récepteur dimérique composé de la chaîne IL-2/15 β (CD122) et de la chaîne commune IL-2/15R γ_c (CD132). L'IL-15 et l'IL-2 possèdent chacune une chaîne réceptrice spécifique IL-15R α (CD215) et IL-2R α (CD25) respectivement.

1. La chaîne réceptrice β

Le gène de la chaîne IL-2/15 β , composé de 10 exons et 9 introns, se situe sur le chromosome humain 22 en position q12-13. La protéine mature d'un poids moléculaire de 70-75 kDa, codée par les exons 2 à 10, est composée de 525 acides aminés et d'un peptide signal de 26 acides aminés. La partie intracellulaire constituée de 286 acides aminés est riche en leucine et proline, dépourvue de séquence consensus tyrosine kinases et contient 6 résidus tyrosines. Le domaine extracellulaire est composé de 241 acides aminés et la région transmembranaire hydrophobe est composée de 25 acides aminés (Shibuya et al., 1990).

2. La chaîne γ_c

La chaîne commune γ_c est partagée par l'IL-15, l'IL-2, l'IL-7, l'IL-4, l'IL-9 et l'IL-21. Chez l'homme, le gène de la chaîne γ_c se situe sur le chromosome X en position Q13.1 et contient 8 exons et 7 introns (Noguchi et al., 1993). La protéine mature IL-2/15 γ_c est composée de 369 acides aminés répartis en 4 segments : le peptide signal, la partie extracellulaire, la partie transmembranaire hydrophobe, et la partie intracellulaire sont constituées respectivement de 22, 233, 28 et 86 acides aminés. Son domaine extracellulaire contient un domaine CHR doté de 4 cystéines conservées et d'un motif WSXWS. Le domaine intracellulaire ne contient pas de séquence consensus de tyrosine kinase, mais il contient une séquence SH2 qui lui permet de se lier à des protéines de signalisation par l'intermédiaire de phosphotyrosines pour la transduction du signal. L'induction d'un signal n'est pas réalisable qu'avec la seule présence de la chaîne γ_c , il nécessite la dimérisation avec la chaîne IL-2/15R β (Walsh, 2012).

3. Les chaînes spécifiques de l'IL-15 et de l'IL-2 : IL-15R α et IL-2R α

A. Le récepteur IL-15R α

En 1994, Giri et ses collègues ont montré que l'IL-15 se fixe avec une affinité moyenne d'environ 10^{-9} M à son récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$. Par la suite il a été observé que l'IL-15 peut se fixer sur les cellules SCID (absence de la chaîne γ) avec une forte affinité (Anderson et al., 1995b). Il a également été observé que l'IL-15 ne se fixe pas sur les cellules COS7 transfectées avec la chaîne β . Ces observations ont suggéré l'hypothèse de l'existence d'une chaîne R α de haute affinité spécifique de l'IL-15. En 1995, la forme murine de cette chaîne, nommée IL-15R α , est mise en évidence en premier (Giri et al., 1995) puis la forme humaine a été ensuite clonée par l'équipe d'Anderson (Anderson et al., 1995c).

1. Caractéristiques du gène de l'IL-15R α

Les gènes humain et murin de l'IL-15R α sont très proches de celui de l'IL-2R α . Ils se situent sur le chromosome 2 chez la souris et le chromosome 10 chez l'homme. Le gène de l'IL-15R α est constitué de 7 exons et de 6 introns (**figure 12A**). Plusieurs isoformes sont issues de l'épissage alternatif du gène de l'IL-15R α . Ces épissages alternatifs sont réalisés sur les exons 2, 3 et l'exon 7 au niveau duquel se produit une insertion génique donnant ainsi une forme plus longue appelée 7'. D'autres isoformes de l'IL-15R α peuvent résulter de délétions au niveau des exons 2, 3, 4, et/ou 5 à laquelle peut s'ajouter l'utilisation de l'exon 7' (Anderson et al., 1995b; Dubois et al., 1999). L'exon 1 code pour le peptide signal, les exons 2 à 5 pour le domaine extracellulaire, l'exon 6 pour le domaine transmembranaire et les exons 7 ou 7' codent pour la région intracellulaire (**figure 12B**).

2. Régulation de l'expression de l'IL-15R α

L'ARN messager de l'IL-15R α est retrouvé dans les cellules immunitaires tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK et les macrophages. Il est également retrouvé dans les cellules non-immunitaires telles les cellules stromales et épithéliales ou dans différents types tissulaires comme les tissus thymiques, intestinaux, nerveux, hépatiques, musculaires et osseux (Giri et al., 1995).

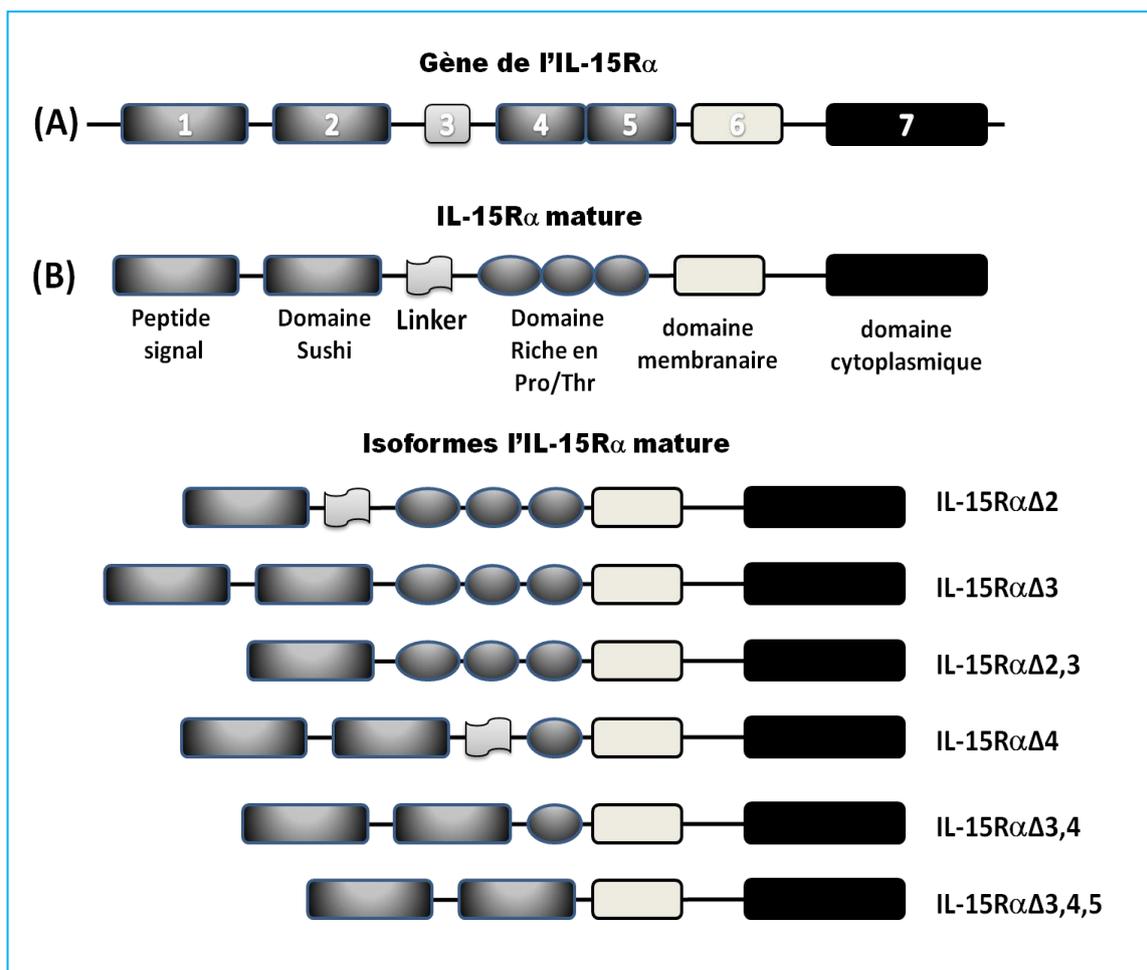


Figure 12 : Structure du gène et les différentes isoformes de l'IL-15R α . (A) Le gène du récepteur l'IL-15R α est composé de 7 exons et 6 introns. (B) Structure de la protéine IL-15R α mature est caractérisée par la présence d'un domaine Sushi dans sa partie extracellulaire. Plusieurs isoformes de l'IL-15 mature peuvent être produites par l'épissage alternatif ou par délétions au niveau des différents exons.

L'expression de la chaîne IL-15R α est induite dans les lymphocytes T par divers traitements tels que l'IL-2, l'anticorps anti-CD3 ou la PMA. Certaines lignées de macrophages soumises à un traitement avec IFN γ augmentent également l'expression de la chaîne IL-15R α de 4 à 27

fois. Des résultats similaires sont obtenus avec les cultures de cellules humaines primaires suite à un traitement avec le LPS, l'Anti-CD3 (Anderson et al., 1995c).

3. Protéine de l'IL-15R α

Son poids moléculaire, originellement de 35 kDa, est augmenté par les N- et O-glycosylations du domaine extracellulaire pour atteindre 38 kDa et 55 kDa (Dubois et al., 1999). La région extracellulaire de l'IL-15R α contient un domaine Sushi riche en proline et thréonine, aussi connu comme une petite séquence consensus (short consensus repeat) ou motif de glycoprotéine de type I (GP-1). Le domaine Sushi a été identifié dans un grand nombre de protéines telles que les protéines du complément C1r et C1s, et les facteurs H et C2m (Bottenus et al., 1990; Kato and Enjyoji, 1991). Il contient 62 acides aminés dont 4 cystéines et 2 ponts disulfures. Le premier est formé par la cystéine 1 (position 3) et la cystéine 3 (position 45) ; le deuxième par la cystéine 2 (position 29) et la cystéine 4 (position 63) (Wei Xq et al., 2001). Ces deux ponts assurent le maintien de la structure quaternaire de l'IL-15R α (**figure 13**).

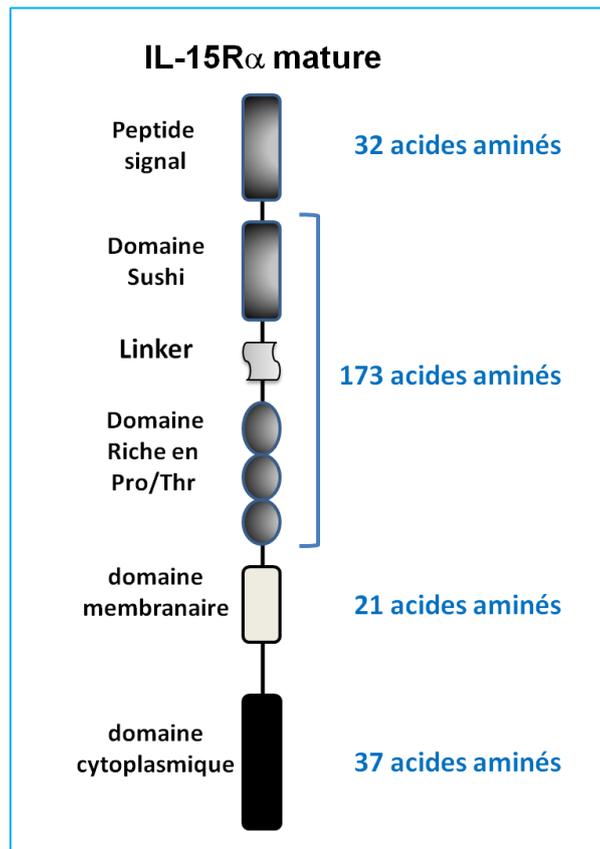


Figure 13 : structure et composition de la chaîne IL-15R α mature : Son domaine intracellulaire est composé de 37 acides aminés, son domaine transmembranaire de 21 acides aminés. Le domaine extracellulaire comporte le domaine sushi, un linker et un domaine riche en proline et leucine de 173 acides aminés. Le peptide signal est composé de 32 acides aminés.

Une forme soluble de l'IL-15R α existe chez la souris et chez l'homme (Mortier et al., 2004). Elle est le résultat d'un clivage protéolytique réalisé dans la partie transmembranaire de l'IL-15R α , au niveau de la sérine en position 181 (S¹⁸¹). Sa délétion inhibe le clivage du récepteur de l'IL-15R α humain (Tamzalit et al., 2014). Cette coupure nécessite l'activité de TACE (Tumor necrosis factor- α -Converting Enzyme) et de métalloprotéine ADAM-17 (Anthony et al, 2015).

B. Le récepteur IL-2R α

1. Caractéristiques du gène de l'IL-2R α

Le gène codant pour l'IL-2R α est situé sur le chromosome 10 en position q14-15 chez l'homme. Le gène existe en une seule copie d'une taille de 25 kb environ et contient 8 exons et 9 introns (Malkovský and Sondel, 1987) (**figure 14**). L'exon 1 code pour le peptide signal, l'exon 3 code pour la région Linker et l'exon 5 et l'exon 6 codent pour la région riche en leucine et thréonine. Le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire sont codés respectivement par l'exon 7 et l'exon 8. L'exon 4 code pour une partie de 71 acides aminés très similaire à l'exon 2. Les deux régions codées par les exons 2 et 4 sont les domaines Sushi contenant des sites potentiels d'O- et N-glycosylation. La délétion de l'exon 4 entraîne une perte de fixation de l'IL-2 et d'interaction de l'IL-2/15R β avec la chaîne IL-2R α , indiquant l'importance de ces domaines Sushi.

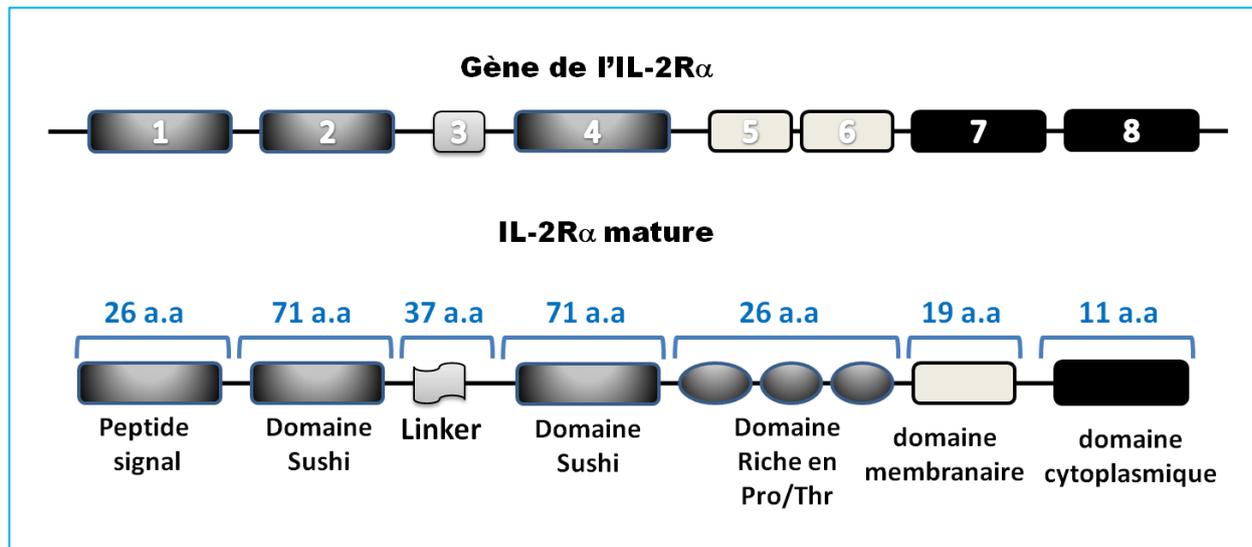


Figure 14 : Structures du gène et de la protéine du récepteur IL-2R α . Le gène de l'IL-2R α est constitué de 8 exons et 9 introns. La protéine mature de l'IL-2R α est caractérisée par la présence de deux domaines Sushi dans sa partie extracellulaire.

2. Régulation de l'expression de l'IL-2R α

Durant le développement des cellules T, l'IL-2R α est exprimée sur les thymocytes doubles négatifs CD4⁻CD8⁻. Puis son expression est intégralement down-régulée dans les thymocytes doubles positifs CD4⁺CD8⁺ (Demaison et al., 1998; Schorle et al., 1991a). L'IL-2R α est également exprimée sur les lymphocytes T régulateurs T-reg, les monocytes, les cellules NK, les cellules B matures, les cellules Kupffer hépatiques, les macrophages pulmonaires et les cellules de Langerhans de la peau. L'expression du gène de l'IL-2R α est régie par des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Le gène de l'IL-2R α est induit par des stimuli mitogènes ou antigéniques, et par des cytokines telles que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-7, le TGF- β ou l'IL-15 (Matikainen et al., 1999). Il est également induit par des protéines virales telles que Tax (human T-cell lymphotropic virus, type I) ou EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1). La chaîne IL-2R α n'est pas détectable sur les lymphocytes T naïfs et est induite suite à la stimulation antigénique. L'antigène stimule la production de l'IL-2 qui à son tour induit l'expression de sa chaîne l'IL-2R α (Waldmann, 1989).

Six régions de régulation positive du gène de l'IL-2R α appelées PRR (Positive Regulatory Regions) sont décrites. Les PRR1, PRR2, PRR4, PRR5 et PRR6 régulent la transcription du gène de l'IL-2R α après la stimulation des lymphocytes T par un antigène. Les PRR3 et PRR4 régulent l'expression du gène de l'IL-2R α suite à une stimulation par l'IL-2. Enfin PRR5 régule l'expression induite par le TGF- β (Kim et al., 2006). Différents régulateurs négatifs de l'expression du gène de l'IL-2R α comme NRE-1 et NRE-2, ont été caractérisés. NRE-1 est impliqué dans la régulation négative de l'expression de l'IL-2R α dans les cellules T jurkat (Smith and Greene, 1989).

3. Protéine de l'IL-2R α

La forme protéique de l'IL-2R α humaine a un poids moléculaire de 33 kDa et est constituée de 272 acides aminés dont un peptide signal de 21 acides aminés. Les N- et O-glycosylations de la chaîne l'IL-2R α augmentent son poids moléculaire jusqu'à 55 kDa. Le domaine extracellulaire de l'IL-2R α est composé de 219 acides aminés contenant 11 résidus cystéines formant des ponts disulfures. Le court domaine intracellulaire contient 13 acides aminés et est dépourvu d'activité enzymatique tyrosine kinase (Kuziel and Greene, 1990) **(figure 14)**.

C. Interaction de l'IL-15 et de l'IL-2 avec leurs récepteurs

Les deux cytokines se fixent à leur récepteur dimérique commun IL2/15R $\beta\gamma$ avec une affinité moyenne ($K_d = 10^{-9}$ M). L'IL-2 se fixe à sa chaîne spécifique IL-2R α avec une faible affinité ($K_d = 10^{-8}$ M). L'IL-15 se fixe à sa chaîne spécifique IL-15R α avec une forte affinité ($K_d = 10^{-11}$ M). L'hétérodimérisation des chaînes IL-15R α ou IL-2R α avec le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ forme un récepteur trimérique de haute affinité ($K_d = 10^{-11}$ M) pour chacune des cytokines (**figure 15**).

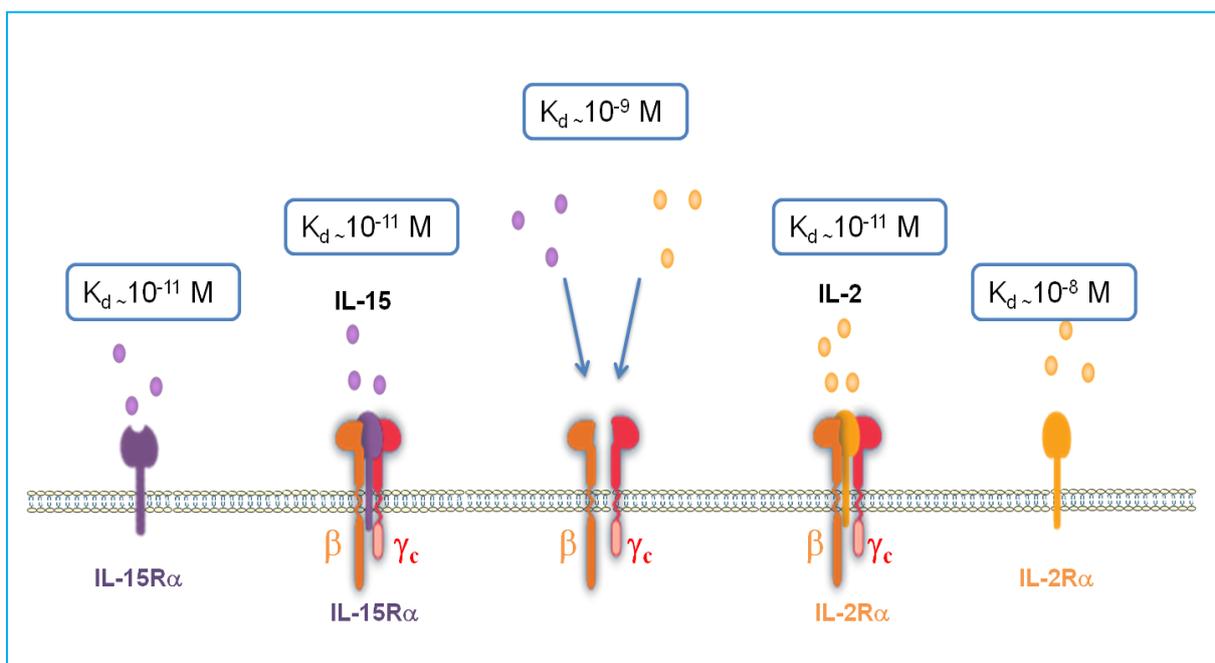


Figure 15 : Récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15, et leurs affinités. Les deux cytokines IL-15 et IL-2 se fixent à leur récepteur dimérique commun IL2/15R $\beta\gamma$ avec une affinité moyenne ($K_d = 10^{-9}$ M). L'IL-2 se fixe à sa chaîne spécifique IL-2R α avec une faible affinité ($K_d = 10^{-8}$ M). L'IL-15 se fixe à sa chaîne spécifique IL-15R α avec une forte affinité ($K_d = 10^{-11}$ M). L'IL-2 et l'IL-15 se fixent à leurs récepteurs trimériques respectifs avec une haute affinité ($K_d = 10^{-11}$ M).

La chaîne IL-2/15R β se lie aux hélices A et C, et la chaîne IL-2/15R γ se lie aux hélices A et D de l'IL-15 et de l'IL-2. La similarité structurale de l'IL-15 et de l'IL-2 au niveau des hélices A, C, et D et la conservation de la nature des résidus se trouvant dans l'interface d'interaction avec les chaînes β et γ indiquent que ces deux cytokines engagent le récepteur dimériques IL-2R/15 $\beta\gamma$ de la même manière (Ring et al., 2012) (**figure 16**).

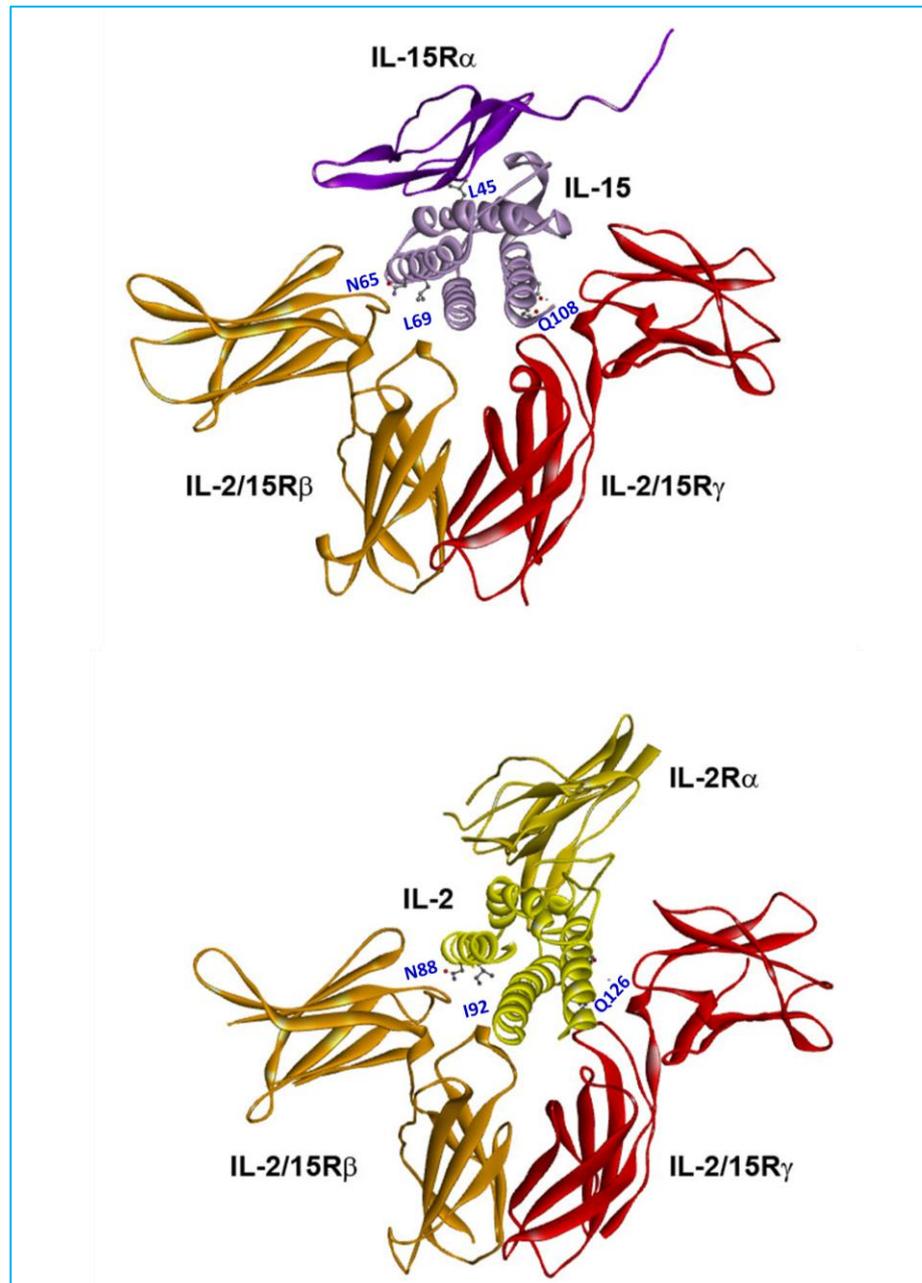


Figure 16 : Comparaison de l'interaction de l'IL-15 et de l'IL-2 avec les récepteurs. Structure du complexe quaternaire formé par l'IL-15 et son récepteur trimérique composé des chaînes IL-15R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ (**haut**). structure du complexe quaternaire formé par l'IL-2 et le récepteur trimérique composé des chaînes IL-2R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ (**bas**).

D. Mode d'action de l'IL-15

L'IL-15 utilise deux modes d'action :

1. La cis-présentation, commune aux autres cytokines, consiste en la fixation de l'IL-15 à son récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ ou son récepteur trimérique IL-15R $\alpha\beta\gamma$ exprimés sur la membrane des cellules cibles (**figure 17 gauche**).
2. La trans-présentation, mécanisme propre à l'IL-15, implique la participation de deux types cellulaires : une cellule présentatrice de l'IL-15 et une cellule répondeuse. Les cellules présentatrices expriment à leur membrane le complexe IL-15R α /IL-15 et le présentent à la cellule répondeuse exprimant le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ (**figure 17 droite**).

L'existence d'un mécanisme de trans-présentation a été mis en évidence par Dubois et ses collègues, qui ont montré que l'IL-15 présente à la surface des cellules présentatrices est recyclée dans les endosomes puis re-exprimée à la surface cellulaire sous forme de complexe IL-15R α /IL-15. Cette IL-15 est ensuite présentée aux cellules T exprimant le récepteur d'affinité intermédiaire IL-2/15R $\beta\gamma$ et induit leur survie (Dubois et al., 2002). Par ailleurs l'IL-15 complexée au récepteur IL-15R α a également été identifiée sur les cellules parenchymateuses intestinales qui stimulent le développement des cellules NK, NK-T et les lymphocytes intra-épithéliaux (Schluns et al., 2004).

Il a également été montré que le complexe IL-15/IL-15R α est pré-assemblé dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi de cellules dendritiques et que ce complexe est nécessaire à l'activation des cellules NK *in vitro*. Cette étude a également démontré l'indispensable expression de l'IL-15R α sur les cellules dendritiques pour l'activation des cellules NK *in vivo* (Lucas et al., 2007; Mortier et al., 2008).

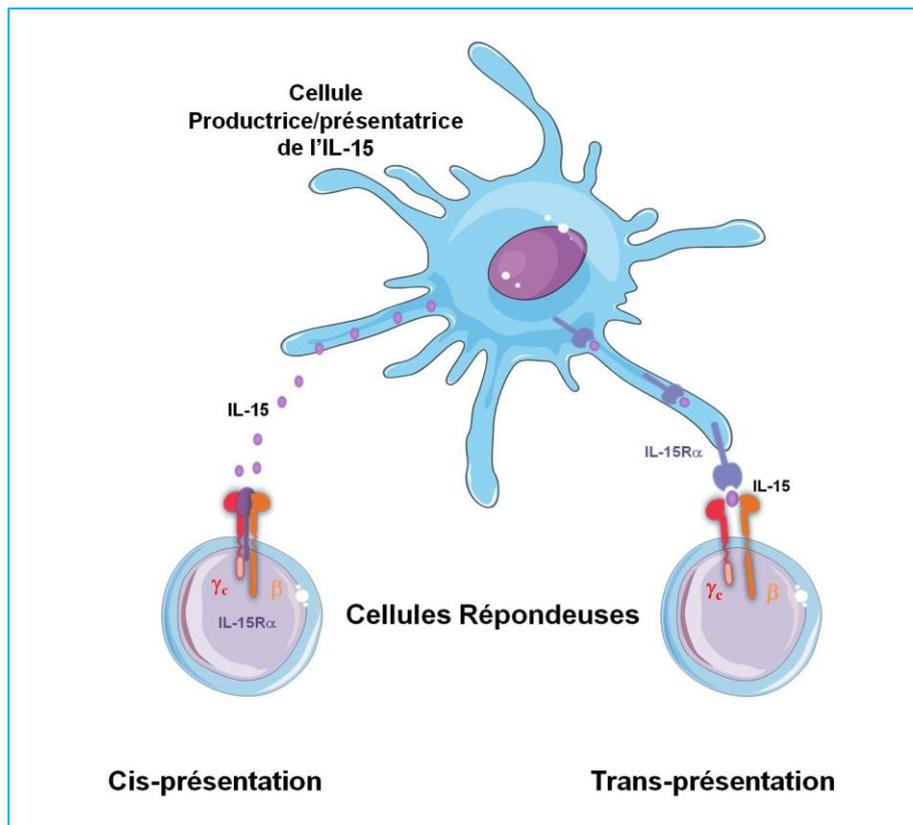


Figure 17 : Mode d'action de l'IL-15. La *cis*-présentation (**gauche**) consiste en la fixation de l'IL-15 à son récepteur dimérique ou trimérique exprimé sur les cellules cibles. La *trans*-présentation (**droite**), consiste en la présentation du complexe IL-15R α /IL-15 par les cellules présentatrices aux cellules répondeuses exprimant le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$.

E. Signalisation de l'IL-15 et de l'IL-2

La fixation de l'IL-15 ou de l'IL-2 au récepteur dimérique d'affinité intermédiaire IL-2/15R $\beta\gamma$ induit le recrutement de JAK1 par la chaîne IL-2/15R β et l'activation de JAK3 constitutivement présente sur la chaîne IL-2/15R γ . Les JAK phosphorylent les résidus tyrosines sur les domaines intracellulaires des chaînes IL-2/15R β et IL-2/15R γ . Ces résidus phosphorylés servent de site d'ancrage pour les protéines STAT-3 et STAT-5. La phosphorylation des facteurs de transcription STATs induit leur décrochage et leur homo/hétérodimérisation et translocation vers le noyau (Perera et al., 2012). La chaîne IL-2/15R β recrute et active également des tyrosines kinases de la famille SRC telles que LCK, FYN ou LYN (Minami et al., 1993). Elle active aussi les voies RAS, PI3, AKT et MAPK qui

induisent l'expression des facteurs de transcription c-FOS, c-JUN, c-MYC, et NFκB (**figure 18**). En dépit de la faible longueur de son domaine intracellulaire, et de l'absence d'activité enzymatique et de site d'ancrage des tyrosines kinases, l'IL-15Rα peut induire un signal dans les cellules épithéliales intestinales (Reinecker et al., 1996).

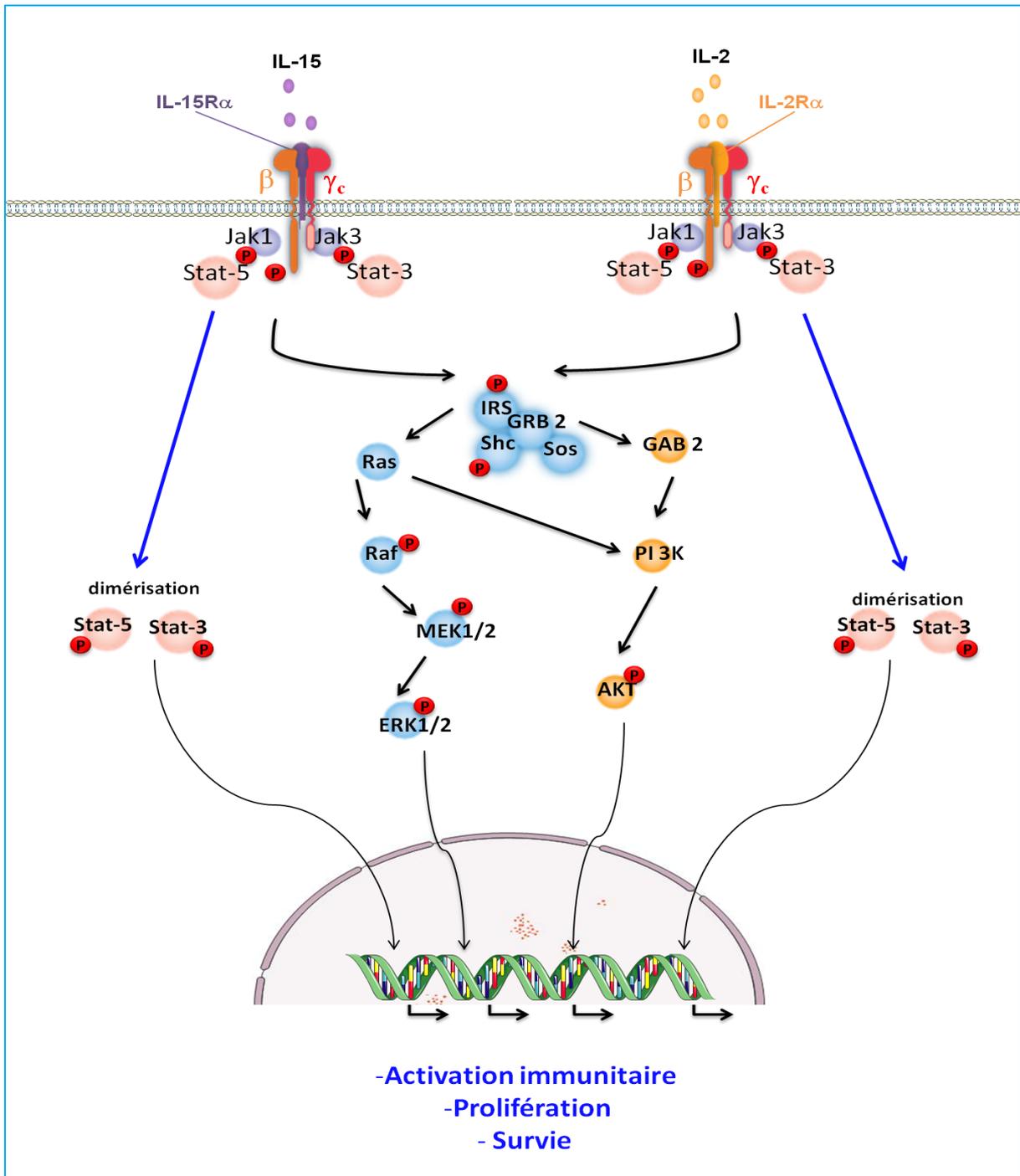


Figure 18 : Voies de signalisation de l'IL-15. La fixation de l'IL-15 à son récepteur induit le recrutement de JAK1 et JAK3. Ces dernières phosphorylent les résidus tyrosines sur les domaines intracellulaires des chaînes IL-2/15R β et IL-2/15R γ . Ces résidus phosphorylés servent de site d'ancrage pour les protéines STAT-3 et STAT-5. JAK1 et JAK3 activées phosphorylent également les protéines STAT-3 et STAT-5. Les facteurs STAT-3 et STAT-5 s'homodimérisent et transloquent vers le noyau. La chaîne IL-2/15R β recrute des tyrosines kinases de la famille SRC et active également les voies RAS, PI3, AKT et MAPK.

IV. Les fonctions biologiques de l'IL-15 sur les cellules immunitaires:

A. Les cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes granuleux dérivés de la moelle osseuse caractérisées par leur activité tueuse naturelle « Natural Killer ». Elles jouent un rôle primordial dans la première ligne de défense immunitaire lors des infections virales, bactériennes, et contre les tumeurs.

1. Développement

Durant la différenciation des cellules NK humaines, la *trans*-présentation de l'IL-15 par les cellules stromales de la moelle osseuse induit l'expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface ; cette induction ne se produit pas chez les souris IL-15R $\alpha^{-/-}$. L'IL-15 induit également la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺CD56⁻ en cellules NK CD56⁺. Deux types de cellules CD56⁺ existent : Les cellules CD56^{bright} qui sont peu cytotoxiques mais produisent des cytokines telles que l'IFN γ , TNF α et GM-CSF, et des chimiokines telles que MIP-1 α , en réponse à un traitement avec l'IL-15 ou l'IL-12, et les cellules NK CD56^{dim} qui sont cytotoxiques et secrètent de l'INF γ après stimulation par l'IL-15 en combinaison avec l'IL-12 ou l'IL-2 (Huntington et al., 2009; Mrózek et al., 1996).

Le marqueur CD56 étant inexistant chez la souris, les sous-types de cellules NK sont identifiés grâce à l'expression des marqueurs CD27 (membre de la superfamille des récepteurs de facteur de nécrose tumoral : TNFRSF) et CD11b (Mac-1) à leurs surfaces. En effet, ces deux marqueurs permettent de subdiviser les cellules NK en quatre stades de développement : les cellules précurseurs, représentées par les cellules NK CD27⁻CD11b⁻, les cellules immatures, représentées par les cellules CD27⁺CD11b⁻, les cellules mature doubles positives CD27⁺CD11b⁺. Ces dernières ont un fort potentiel de sécrétion de cytokines. Le dernier stade de développement est représenté par les cellules matures activées, représentées

par les cellules CD27⁻CD11b⁺, qui présentent une forte activité cytotoxique (Chiossone et al., 2009; Hayakawa et al., 2006).

Le traitement des souris par l'IL-15 induit la différenciation des cellules CD27⁻CD11b⁻ et CD27⁺CD11b⁻ en cellules matures double positives CD27⁺CD11b⁺ et la différenciation de ces cellules matures double positives CD27⁺CD11b⁺ en cellules cytotoxiques CD27⁻CD11b⁺.

2. Survie

Bien que les cellules NK persistent chez les souris IL-2^{-/-} et les souris IL2R α ^{-/-} (Kündig et al., 1993; Vosshenrich et al., 2005), il a été montré que l'absence de la chaîne IL-2/15R γ ou le traitement avec un anticorps anti-IL-2/15R β induisent une déficience en cellules NK chez la souris (Kündig et al., 1993; Schorle et al., 1991b; Tanaka et al., 1993). Cela souligne l'importance de l'IL-15 dans le développement, la prolifération et l'activation des cellules NK, via l'utilisation du récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ (Carson et al., 1994a). En effet les cellules NK sont absentes chez les souris IL-15^{-/-}, les souris IL-15R α ^{-/-} et les souris IL-2/15R β ^{-/-} (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998; Suzuki et al., 1997). Il a également été montré que le développement et la survie des cellules NK *in vivo* dépendent de la *trans*-présentation du complexe IL-15/IL-15R α aux cellules NK exprimant les chaînes transductrices IL-2/15R β et IL-2/15R γ (Koka et al., 2003). L'IL-15 joue un rôle crucial dans la survie des cellules NK, notamment grâce à sa capacité à induire la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Carson et al., 1997).

3. Activation

Les cellules NK sont dotées de mécanismes cytotoxiques leur permettant de lyser les cellules cibles, via la sécrétion de perforine et de granzyme, la sécrétion de cytokines cytotoxiques comme l'INF γ ou l'engagement des récepteurs à domaine de mort cellulaire (death domain receptors) tels que FAS exprimés sur les cellules cibles.

En effet, l'activité cytotoxique des cellules NK CD56⁺ humaines traitées avec l'IL-15 vis-à-vis des cellules cibles (COLO 205) est augmentée de manière dose-dépendante (Carson et al., 1994b). De plus, l'IL-15 augmente l'expression du récepteur NKG2D sur les cellules NK, ayant pour conséquences l'augmentation de l'activité cytotoxique (Meresse et al., 2004; Roberts et al., 2001). L'IL-15 participe également à la production de cytokines par les cellules NK. Les macrophages stimulés par le LPS produisent de l'IL-15, qui à son tour stimule la production d'IFN γ par les cellules NK (Fehniger and Caligiuri, 2001). D'autres études ont également montré le rôle de l'IL-15 dans l'acquisition de la molécule d'adhésion LFA-1 (CD11a et CD18) par les cellules NK, qui se lie à la molécule ICAM-1 exprimée à la surface des cellules cibles. La liaison LFA-1/ICAM-1 permet l'interaction entre les cellules NK et la cellule cible, et la sécrétion des granzymes et perforines (Barao et al., 2003). Par ailleurs la molécule LFA-1 favorise l'adhésion des cellules NK à l'endothélium et leur migration vers le foyer d'inflammation (Allavena et al., 1997).

B. Les lymphocytes T $\alpha\beta$

1. Le développement

L'effet de l'IL-15 sur les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ diffère selon leurs stades de développement. Les études réalisées sur les souris IL-15^{-/-} et les souris IL-15R α ^{-/-} ont montré une faible diminution des cellules T CD8⁺ naïves chez les souris IL-15R α ^{-/-} et aucun effet notable n'a été observé sur le développement des cellules T CD4⁺. De plus, l'analyse comparative des populations T CD8⁺ et CD4⁺ chez les souris IL-2/15R β ^{-/-} et les souris sauvages ne révèle aucun changement dans leur différenciation. Ainsi l'IL-15 interviendrait dans la prolifération, l'activation et la survie des cellules T.

2. Survie des lymphocytes CD8 mémoires

Le rôle crucial de l'IL-15 dans la survie des cellules T CD8⁺ mémoires a été mis en évidence par la forte diminution de la population CD8⁺CD44^{high} chez les souris IL15^{-/-} et les souris IL-15Rα^{-/-} (Kennedy et al., 2000). En effet, la chaîne IL-15Rα est induite sur les cellules T CD8⁺ mémoires ce qui les rend plus sensibles à l'IL-15 comparés aux cellules CD8⁺ naïves. De plus, le traitement avec l'IL-15 entraîne l'expansion des cellules T CD8⁺ mémoires chez la souris grâce à l'induction des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L (Berard et al., 2003).

A l'inverse, il apparaît que l'IL-15 joue un rôle moindre dans la survie et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ mémoires puisque ceux-ci sont toujours présents chez les souris IL-15Rα^{-/-}. Cette différence entre l'effet de l'IL-15 sur les lymphocytes T CD4⁺ et celui sur les lymphocytes T CD8⁺ mémoires peut être expliquée par la différence d'expression des récepteurs de l'IL-15 sur les deux types cellulaires. La chaîne IL-15Rβ est plus fortement exprimée sur les lymphocytes T CD8⁺ mémoires que sur les cellules T CD4⁺ mémoires (van Leeuwen et al., 2009).

3. Activation

Les lymphocytes T CD8⁺ activés expriment plus fortement la chaîne IL-15Rβ comparés aux cellules T CD4⁺ activées, et ont ainsi une meilleure réactivité à l'IL-15. L'IL-15 joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T CD8⁺ lors de l'activation antigénique, notamment pendant l'infection virale par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Schluns et al., 2002).

C. Les cellules NK-T

Chez la souris, l'IL-15 induit la survie et la maturation des cellules NK-T dans le thymus et la rate par l'activation du facteur de survie Bcl-2 (Gordy et al., 2011). L'IL-15 intervient

également dans l'acquisition des récepteurs NKG2D et Ly49 par les cellules NK-T en phase de développement (Chang et al., 2011).

D. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont des cellules de l'immunité innée et adaptative, localisées dans les épithélia, les muqueuses digestives et respiratoires, la peau, les organes lymphoïdes et le sang périphérique. L'IL-15, en synergie avec l'IL-12, peut induire la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T $\gamma\delta$ (García et al., 1998). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ de la peau appelés « cellules dendritiques épidermiques T » sont également dépendants de l'IL-15 (Van Beneden et al., 2002).

E. Les lymphocytes T intra-épithéliaux

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) sont des cellules résidentes de l'épithélium intestinal et sont majoritairement des lymphocytes T CD8⁺ exprimant l'hétérodimère CD8 $\alpha\alpha$ (Lefrancois, 1991). En absence d'IL-15, d'IL-15R α , ou d'IL-2R β , la population d'IELs est fortement réduite (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998). La *trans*-présentation de l'IL-15 par les cellules épithéliales intestinales participe également à leur développement (Ma et al., 2009).

F. Autres cellules du système immunitaire

Table 1 : Rôle de l'IL-15 sur les autres cellules du système immunitaire

Cellules	Rôle de l'IL-15
Les macrophages	Les macrophages activés par le LPS et le TNF α produisent de l'IL-15. Une forte concentration en IL-15 induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 et TNF α par les macrophages. Au contraire, les faibles concentrations induisent la sécrétion de cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Alleva et al., 1997).
Les monocytes	Le traitement des monocytes avec l'IL-15 induit la production d'IL-8 et de MCP-1 (macrophage chemotactic protein), deux molécules chimioattractives des neutrophiles et monocytes (Musso et al., 1999). En présence de GM-CSF, l'IL-15 induit également la conversion des cellules monocytes CD14 ⁺ en cellules dendritiques matures capables de présenter les antigènes aux cellules T (Saikh et al., 2001).
Les cellules dendritiques	Les cellules dendritiques expriment l'IL-15R α et produisent de l'IL-15 en réponse aux stimuli LPS, PolyIC ou IFN $\alpha\beta$ (Granucci et al., 2001). L'introduction du gène de l'IL-15 dans les cellules dendritiques augmente l'expression des marqueurs membranaires CD83, CD86 et CD40, et la sécrétion de l'IL-12 (Tourkova et al., 2002).
Les neutrophiles	Les neutrophiles expriment les récepteurs IL-15R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ . L'IL-15 agit sur les neutrophiles en induisant des modifications morphologiques et l'augmentation de la phagocytose (Ratthe, 2004). La stimulation des neutrophiles par l'IL-15 induit la sécrétion de l'IL-8 (McDonald et al., 1998).
Les lymphocytes B	L'homéostasie des lymphocytes B n'est pas affectée par l'IL-15. Les lymphocytes B ne sont pas altérés chez les souris IL-15 ^{-/-} et les souris IL-15R α ^{-/-} , néanmoins, l'IL-15 en combinaison avec le CD40L, joue un rôle dans la sécrétion des IgA, IgG1 et IgM par les lymphocytes B (Armitage et al., 1995). Il a également été montré que l'IL-15 produite par les cellules dendritiques folliculaires régule la survie et la prolifération des lymphocytes B (Park et al., 2004).

V. Action de l'IL-15 sur les cellules non-immunitaires

L'IL-15 agit sur différentes cellules non-immunitaires telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires et les adipocytes.

Les cellules épithéliales intestinales expriment les ARNm de l'IL-15 et peuvent être activées par cette dernière. Leur prolifération est induite via l'activation du facteur de transcription STAT-3 (Reinecker et al., 1996). Il a aussi été montré que l'IL-15 et ses récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales rénales (TEC : tubular epithelial cells) et que leur stimulation autocrine par l'IL-15 assure leur survie (Shinozaki et al., 2002). Les cellules endothéliales expriment également les récepteurs IL-15R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ . *In vivo*, l'IL-15 induit l'angiogenèse par l'induction de la phosphorylation rapide des tyrosines kinases (Angiolillo et al., 1997). Les cellules endothéliales produisent également de l'IL-15 et participent à l'activation des lymphocytes T et à leur migration (Oppenheimer-Marks et al., 1998).

L'IL-15 a également un effet direct sur la formation des cellules ostéoclastes-like lorsque les cellules de la moelle osseuse sont cultivées en présence d'IL-15 *in vitro* (Ogata et al., 1999). De plus les cellules T exprimant l'IL-15 à leur surface chez les patients atteints d'arthrite contribuent à la différenciation des monocytes en ostéoclastes (Miranda-Carús et al., 2006).

VI. Rôle de l'IL-15 dans un contexte pathologique

A. Maladies infectieuses

Diverses études ont montré l'implication de l'IL-15 dans les maladies infectieuses bactériennes, virales et fongiques.

L'étude de la sécrétion de cytokines dans le plasma de patients ou de macaques infectés par le VIH ou le VIS, montre une augmentation du niveau de l'IL-15 durant la phase aigüe de l'infection (Eberly et al., 2009; Stacey et al., 2009). L'administration de l'IL-15 chez le macaque augmente la population de cellules NK et celle de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du virus (Mueller et al., 2008). *In vitro*, l'IL-15 augmente l'activité des cellules NK issus des patients atteints et induit la production des chimiokines (Fehniger et al., 1998; Rodriguez et al., 2007 ; d'Ettorre et al., 2002). Plusieurs résultats suggèrent également le rôle de l'IL-15 dans l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques via l'interaction MIC A/B et NKG2D (Jinushi et al., 2003).

L'IL-15 est également impliqué pendant l'infection bactérienne par *L. monocytogenes*, en induisant l'activation précoce des cellules épithéliales intestinales (IEL) (Hirose et al., 1998). Il a également été montré que les macrophages activés durant l'infection par *S. choleraesuis* activent les lymphocytes T $\gamma\delta$, qui prolifèrent en présence d'IL-15 et secrètent de fortes quantités d'IFN γ et d'IL-4 (Nishimura et al., 1996). De plus l'administration d'anti-IL-15 chez les souris inhibe l'apparition des cellules T $\gamma\delta$ et diminue la protection contre *E.coli* (Takano et al., 1998).

Les études de la réponse immunitaire contre les champignons montrent que l'IL-15 augmente l'activité antifongique et favorise la phagocytose des monocytes lors de l'infection par *C. albicans* (Vázquez et al., 1998). L'IL-15 participe également à l'activation des monocytes durant l'infection par *Aspergillus*. En effet, après incubation avec l'IL-15, les monocytes secrètent de l'IL-8 qui augmente leur activité phagocytaire de façon autocrine (Winn et al., 2003).

B. Maladies inflammatoires

1. La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est un désordre auto-immun caractérisé par l'inflammation synoviale, l'érosion du cartilage et la destruction des jonctions articulaires. Les études histologiques des jonctions articulaires chez les patients montrent la présence de cellules immunitaires et de diverses cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-7, l'IL-15 et le TNF α (Djaafar et al., 2010; Karmakar et al., 2010).

L'IL-15 a été retrouvée dans le fluide et les membranes synoviales, et serait responsable du recrutement et de l'activation des lymphocytes T dans le site inflammatoire chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (McInnes et al., 1996a; Wilkinson and Liew, 1995). Des études *in vitro* montrent également que les cellules T issues de patients atteints et activées par l'IL-15 sont capables d'activer les monocytes/macrophages pour produire du TNF α . Cette activation se produit par le contact physique entre les cellules T et les monocytes/macrophages ; ce contact est dépendant du CD69, du LFA-1 et d'ICAM-1 (McInnes et al., 1996b). Il a également été montré que, contrairement aux lymphocytes T issus de souris sauvages, ceux issus de souris IL-15R^{-/-} sont incapables d'activer les ostéoclastes (Djaafar et al., 2010)..

D'autres travaux ont permis d'identifier une population de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ chez les patients atteints et exprimant à leur surface l'IL-15 et RANKL. Ces cellules T isolées permettent *in vitro* la différenciation des ostéoclastes (Miranda-Carús et al., 2006).

L'IL-15 exerce un rôle direct sur la différenciation des ostéoclastes, par l'activation des voies MAPKs et NF κ B durant l'arthrite (Park et al., 2011).

2. Diabète de type I

La surexpression de l'IL-15 et l'IL-15R α sur les cellules β pancréatiques chez les souris doubles transgéniques induit le développement d'une hyperglycémie liée à une destruction des cellules β et à la production d'anticorps anti-insuline montrant ainsi le rôle inflammatoire de l'IL-15 dans le diabète de type I. L'inhibition de la signalisation de l'IL-15 via un traitement avec anticorps anti-CD122 (IL-2/15R β), protège du développement du diabète de type I chez ces souris (Chen et al., 2013). L'analyse des biopsies d'îlots de Langerhans de patients atteints de diabète de type 1 (TD1) a montré que l'IL-15 et l'IL-15R α sont exprimés chez tous les patients. L'IL-15R α est également retrouvé dans le sérum de ces patients (Chen et al., 2014). Ces résultats montrent l'implication de l'IL-15 et de l'IL-15R α dans le diabète de type 1.

3. Maladies inflammatoires de l'intestin

Différentes études ont montré une augmentation de l'expression de l'IL-15 par les PBMC chez les patients atteints de colite ulcéraire (Kirman and Nielsen, 1996). L'expression de l'ARNm de l'IL-15 est également élevée dans les muqueuses rectales (Sakai et al., 1998). L'étude de l'expression de l'IL-15 dans les biopsies de patients atteints de maladie de Crohn ou de la colite ulcéraire, montre que l'IL-15 est exprimée par les macrophages activés de la lamina propria (Liu et al., 2000).

Les études *in vivo* du rôle de l'IL-15 dans un modèle de colite aiguë ou chronique induite par le dextran sulfate sodium (DSS) chez la souris, montrent que les souris IL-15^{-/-} comparées aux souris sauvages présentent moins de létalité et de perte de poids. De plus, en absence d'IL-15, l'infiltration de la lamina propria par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK est réduite. L'étude des cytokines pro-inflammatoires montre également une diminution d'IL-12, du TNF α et d'IFN γ en absence d'IL-15 (Yoshihara et al., 2006). L'IL-15 est

également surexprimée durant la maladie cœliaque. En effet l'IL-15 est exprimée à la membrane des entérocytes et active les cellules NK et les lymphocytes T intra-épithéliaux en augmentant l'expression du récepteur NKG2D (Meresse et al., 2004).

C. Rejet de greffe

Le rejet de greffe se produit généralement suite à l'infiltration du greffon par les cellules immunitaires du receveur qui reconnaissent le greffon comme un élément du non-soi. La réponse immunitaire adaptative (les lymphocytes T et lymphocytes B) est responsable de la spécificité et de la mémoire du rejet. Les cellules innées du système immunitaire interviennent également dans le rejet de greffe, notamment dans la reconnaissance du non-soi par les cellules NK, dans la sécrétion de cytokines et dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

L'ARNm de l'IL-15 a été retrouvée dans les biopsies rénales et chez les patients ayant rejetés le greffon (Strehlau et al., 1996). L'expression de l'IL-15 et du granzyme B a également été étudiée dans les lavages alvéolaires pulmonaires chez des patients transplantés. L'expression de l'IL-15 par les macrophages s'est avérée significativement plus élevée chez les patients présentant de courts épisodes de rejets comparés aux patients qui présentent un greffon stable. La même observation est faite pour l'expression du granzyme B par les lymphocytes T CD8⁺ (Shi et al., 2004).

L'étude du rôle de l'IL-15 dans le rejet de greffe de peau chez la souris a montré que l'IL-15 complexée à son récepteur IL-15R α active les cellules NK. Ces dernières induisent le rejet de la greffe de peau chez les souris Rag^{-/-} en absence de lymphocytes T (Kroemer et al., 2008).

D. Les Cancers

1. Rôle pro-tumoral

A cause de son effet prolifératif sur les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK, l'IL-15 joue un rôle dans la prolifération et la survie des cellules néoplasiques lymphoïdes retrouvées dans la leucémie à lymphocytes larges et granuleux (LGLL), la leucémie lymphoïde chronique B (B-CLL), le lymphome folliculaire (FL), le lymphome hodgkinien (HL), le lymphome cutané à cellules T (CTC) et la leucémie adulte à cellules T (ALT).

Les études du rôle de l'IL-15 dans la leucémie à lymphocytes larges et granuleux, ont pu montrer que la surexpression chronique de l'IL-15 chez les souris transgéniques provoque le développement de LGLL (Fehniger and Caligiuri, 2001). En effet, Les cellules T et NK de type LGLL issues de patients expriment les récepteurs IL-15R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ , et leur prolifération est induite par l'IL-15 (Zambello et al., 1997). L'exposition des LGL normaux à l'IL-15 suffit pour les transformer en cellules LGLL néoplasiques. Leur transfert chez la souris entraîne le développement de leucémies à lymphocytes larges et granuleux *in vivo* (Mishra et al., 2012).

L'IL-15 est également impliquée dans la B-CLL en induisant la prolifération des cellules en se fixant sur les récepteurs IL-2/15R β et IL-2/15R γ (Trentin et al., 1996). *In vitro*, cette prolifération est induite via les voies de signalisation STAT-3/5 et ERK1/2 (de Toterò et al., 2008).

Lors du lymphome CTC, l'expression de l'IL-15 est augmentée dans la peau et joue un rôle chimioattractant et activateur des cellules T. Durant les stades avancés de lymphome CTC, les cellules T acquièrent la capacité de produire de l'IL-15 (Leroy et al., 2001). Pendant le lymphomes folliculaires, l'IL-15 est également *trans*-présentée par les monocytes/macrophages aux lymphocytes B (Epron et al., 2012). L'activation de la protéine

virale *Tax* induit l'expression de l'IL-15 et de l'IL-15R α sur les cellules T, et une boucle autocrine de l'IL-15 induisant la prolifération des lymphomes T lors du développement d'une leucémie adulte à cellules T (Azimi et al., 1998; Waldmann, 2015).

2. Rôle anti-tumoral

Grâce à sa capacité à stimuler le système immunitaire, l'IL-15 joue un rôle anti-tumoral. En effet, la forte expression de l'IL-15 chez les souris transgéniques inhibe la formation de métastases grâce à l'augmentation de l'infiltrat de T CD8⁺ et de cellules NK intra-tumoraux. De plus, la sécrétion d'INF γ par les lymphocytes T CD8⁺ infiltrants est augmentée par l'IL-15 (Meazza et al., 2000).

A l'inverse, dans un modèle murin de cancer du sein, les souris IL-15^{-/-} sont 10 fois plus sensibles à l'apparition de métastases que les souris sauvages. Les souris transgéniques sur-exprimant l'IL-15 sont 10 fois plus résistantes que les souris sauvages. L'absence d'IL-15 dans les souris IL-15^{-/-} et la polarisation des CD4⁺ en Th2 engendrent la formation de macrophages de type M2 immunosuppresseurs qui contribuent à la formation de métastases (Gillgrass et al., 2014). Le rôle évident de l'IL-15 dans la réponse immunitaire anti-tumorale a également été montré par le travail de Bahri R, qui indique que l'absence de l'IL-15 (souris IL-15^{-/-}) augmente l'incidence de tumeurs dans le colon (Bahri et al., 2015).

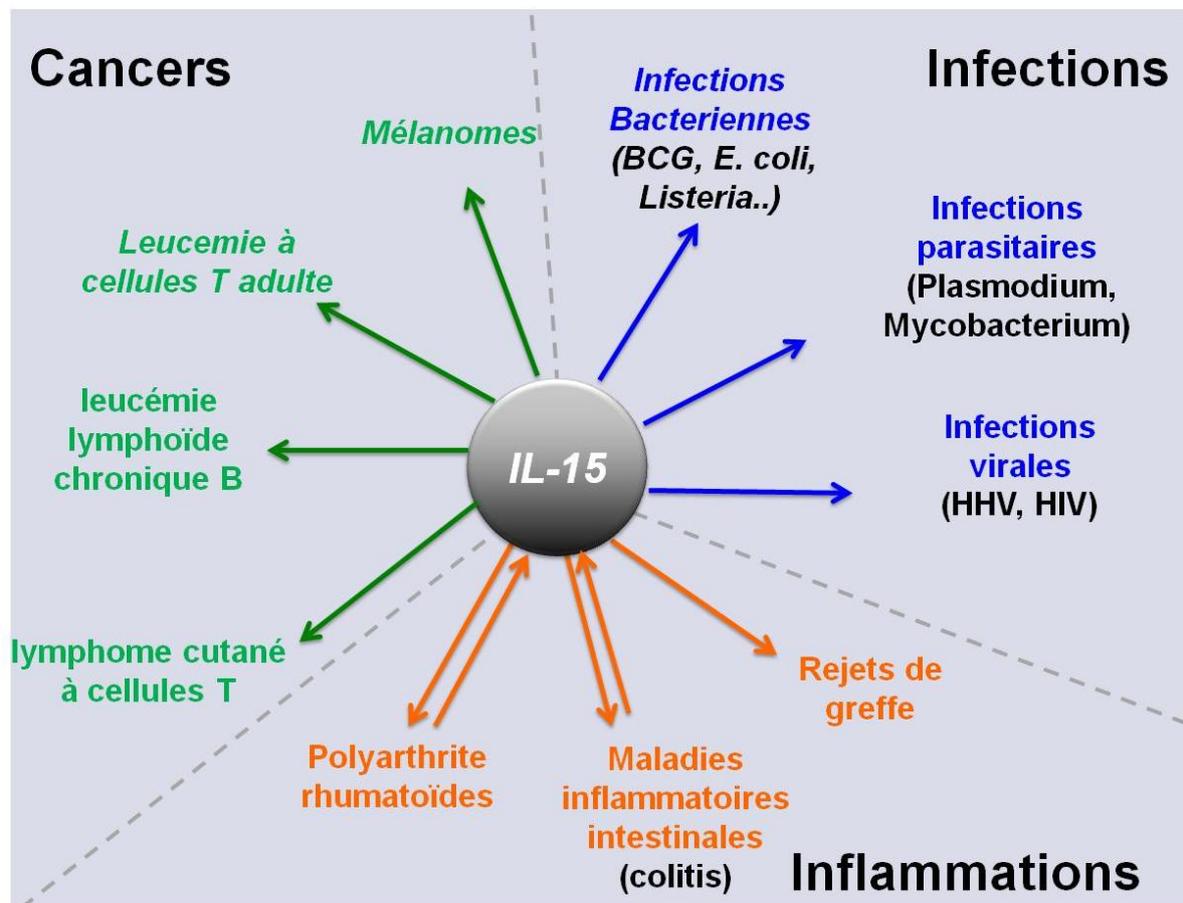


Figure 19 : Implication de l'IL-15 dans les pathologies. L'IL-15 joue un rôle dans les pathologies inflammatoires, les tumeurs et les infections microbiennes.

VII. L'IL-15 en thérapie

A. Thérapie par stimulation de l'IL-15

L'IL-2 et l'IL-15 partagent de nombreuses fonctions : les deux cytokines stimulent la prolifération des lymphocytes T et interviennent dans le développement et la survie des cellules NK. Différents aspects du système IL-15 présentent de réels avantages quant à l'utilisation de cette cytokine dans l'immunothérapie anticancéreuse. En effet, contrairement à l'IL-2, l'IL-15 n'affecte pas le développement des lymphocytes $CD4^+$ T reg $CD25^+Foxp3^+$.

L'administration de l'IL-15 chez le macaque induit l'augmentation du nombre de cellules NK et l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ mémoires effecteurs dans le sang périphérique (Sneller et al., 2011). L'IL-15 a également fait l'objet d'un essai clinique chez des patients atteints de mélanome métastatique. L'analyse des populations cellulaires suite à l'administration de l'IL-15 montre une relocalisation très rapide des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ mémoires, qui disparaissent de la circulation. Une clairance des métastases dans le poumon de deux patients a également été observée (Conlon et al., 2015).

Le complexe IL-15R α /IL-15 présente une activité supérieure à celle de l'IL-15 (Rubinstein et al., 2006). Ce complexe présente un réel potentiel anti-tumoral grâce à sa capacité à stimuler spécifiquement les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ mémoires et non les cellules T-reg. En effet l'administration de ce complexe chez la souris induit une expansion des cellules NK-T et des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que l'activation des cellules NK indiquée par l'augmentation du CD69, du granzyme B et de l'INF γ (Guo et al., 2015). L'effet thérapeutique du complexe IL-15R α /IL-15 a été montré dans diverses études dont celle d'H. Sun dans des modèles tumoraux (pulmonaire, hépatique et rénal) chez la souris. En effet l'administration du plasmide IL-15R α /IL-15 par la technique «administration hydrodynamique de gènes» entraîne l'expression du complexe dans le sérum, qui active les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ ce qui inhibe la croissance tumorale (Sun and Liu, 2016). Le complexe IL-15R α /IL-15 réduit également la progression de la tumeur dans un modèle de mélanome murin (Stoklasek et al., 2006).

Dans l'objectif d'augmenter la demi-vie du complexe IL-15R α /IL-15, le groupe de Hing C. Wong a généré une molécule de fusion ALT-803 composée de deux complexes IL-15R α /IL-15 liés au domaine Fc d'une immunoglobuline humaine IgG1 (Wong et al., 2013). *In vivo* cette molécule a une demi-vie de 25 heures, durée nettement supérieure à celle de l'IL-15,

évaluée à 40 minutes (Han et al., 2011). La comparaison des effets anti-tumoraux de l'IL-15 et de la molécule ALT-803 dans les modèles murins de mélanome sous-cutané et de carcinome métastatique, a montré une meilleure efficacité de l'ALT-803 comparé à l'IL-15, puisqu'une seule injection intraveineuse d'ALT-803 suffit pour éliminer les tumeurs et prolonge la survie des souris (Rhode et al., 2016).

Une molécule de fusion nommée RLI, qui consiste en la liaison entre l'IL-15R α et l'IL-15 grâce à un linker, a été également développée (Mortier et al., 2006). La molécule RLI possède une efficacité supérieure à celle de l'IL-15 ou de l'IL-2 dans la réduction des métastases pulmonaires et hépatiques, et augmente la survie des souris dans le modèle de mélanome induit par les cellules B16F10 (Bessard et al., 2009). Le RLI a également été associé à un anti-GD2 ciblant le ganglioside GD2 exprimé sur les tumeurs neuroectodermiques. Cette association forme une immuno-cytokine permettant d'augmenter la demi-vie du RLI sans altérer ses fonctions biologiques et de concentrer la cytokine dans les tumeurs. Cette immuno-cytokine présente une forte activité anti-tumorale dans le modèle sous-cutané EL4 et le modèle métastatique NXS2 (Vincent et al., 2013).

B. Thérapie par inhibition de l'IL-15

Compte tenu du rôle de l'IL-15 dans la stimulation du système immunitaire durant les maladies inflammatoires et le rejet de greffe, plusieurs stratégies ont été développées dans le but de réduire l'action de l'IL-15.

1. Antagoniste

IL-15muté/FC γ 2a (nommé par la suite CRB15) est un antagoniste formé par la recombinaison d'une IL-15 humaine mutée avec la région Fc d'un anticorps IgG2a murin. Les mutations de l'IL-15 se situent dans la région C-terminale, au niveau des acides aminés Q101 et Q108 qui sont remplacés par des acides aspartiques D101 et D108.

La première étude de Kim et ses collègues a montré que l'IL-15muté/FC γ 2a se fixe *in vitro* aux cellules BAF-BO3 et n'induit pas la phosphorylation de STAT-3 et STAT-5. Dans cette étude, l'antagoniste IL-15muté/FC γ 2a inhibe spécifiquement leur prolifération induite par l'IL-15. Son effet thérapeutique a été testé dans un modèle d'hypersensibilité retardée (immunisation avec la BSA dans les pattes), où l'IL15muté/FC γ 2a réduit l'inflammation et l'infiltration par les macrophages et les cellules T CD4⁺ dans le site inflammatoire (Kim et al., 1998).

Cet antagoniste a été également testé dans un modèle de rejets de greffe d'ilôts pancréatiques chez la souris en combinaison avec le CTLA-4/Fc. La combinaison des deux molécules induit la tolérance aux greffons chez plus de 70% des souris receveuses. Les études histologiques des greffons montrent que l'IL-15muté/FC γ 2a réduit les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ infiltrant (Ferrari-Lacraz et al., 2004).

Son effet a également été étudié dans un modèle murin d'arthrite induite au collagène (CIA : collagen induced arthritis) dans lequel il a permis de réduire le développement de la pathologie grâce à son effet inhibiteur sur l'expression des cytokines inflammatoire IL-1 β , TNF- α , IL-6, et IL-17. L'antagoniste a également permis de réduire les lymphocytes T infiltrant les jonctions synoviales inflammatoires (Ferrari-Lacraz et al., 2004).

Dans un modèle de greffes de cœur avec une incompatibilité mineure consistant en un transfert de cœur de souris B10.BR (H-2^k) à une souris CBA/Ca (H-2^k), le traitement des souris avec IL-15muté/FC γ 2a induit une tolérance complète des greffons. Dans le cas d'une incompatibilité complète Balb/c (H-2^d) \rightarrow C57/BL6 (H-2^b), l'IL-15muté/FC γ 2a prolonge la survie des greffons. L'étude immuno-histologique des greffons montre que le traitement avec IL-15muté/FC γ 2a, permet de réduire les macrophages, lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ infiltrant. L'étude des transcrits des cytokines inflammatoires a également montré une

diminution de l'IL-1 β , du TNF α , de l'INF γ et des perforines chez les souris traitées (Zheng et al., 2006).

Des résultats similaires ont également été montrés dans un modèle *in vivo* de colite induite par le DSS chez la souris, durant lequel l'antagoniste a assuré la survie de 50% des souris et la réduction du score clinique (Brounais-Le Royer et al., 2013).

2. AMG 714 (HuMaxIL-15)

AMG 714 est un anticorps IgG1 anti-IL-15 humaine qui ne bloque pas l'interaction de l'IL-15 à son récepteur IL-15R α . Il interagit avec l'IL-15 au niveau de son interface d'interaction avec la chaîne IL-2/15R γ empêchant, ainsi, la signalisation via le récepteur trimérique L-15R $\alpha\beta\gamma$ (Villadsen et al., 2003). Il bloque la prolifération des cellules NK issues des PBMC humains *in vitro*. AMG 714 inhibe également la sécrétion de l'INF γ et l'expression du marqueur d'activation CD69 par les cellules NK. Lorsqu'AMG 714 est administré chez l'homme, aucune diminution des cellules NK circulantes n'est observée (Lebrec et al., 2013). L'AMG714 induit l'apoptose des lymphocytes intra-épithéliaux surexposés à l'IL-15 chez des souris transgénique. En effet l'AMG714 inhibe la phosphorylation de STAT-5 et JAK3 induite par l'IL-15 (Malamut et al., 2010).

3. Récepteur soluble IL-15R α

Grâce à sa haute affinité, l'IL-15R α peut neutraliser l'IL-15 sécrétée dans des conditions inflammatoires. L'absence de la chaîne IL-15R α sur les cellules stromales épidermiques aggrave l'inflammation durant le psoriasis chez la souris. En effet, il a été montré que l'IL-15R α subit une coupure protéolytique, ainsi libérée, sous sa forme soluble neutralise l'IL-15 libre présent dans le site inflammatoire, atténuant ainsi la prolifération et l'activation des lymphocytes T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$. De plus, dans ce modèle murin de psoriasis, le

traitement des souris avec l'IL-15R α soluble réduit considérablement le score clinique et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF α (Bouchaud et al., 2013).

Dans un modèle de greffes de cœur avec une incompatibilité mineure (décrit précédemment), le traitement des souris avec la forme soluble sIL-15R α induit une tolérance des greffons. Dans le cas d'une incompatibilité complète Balb/c (H-2^d) \rightarrow C57/BL6 (H-2^b), le traitement avec sIL-15R α ou avec un anti-CD4 a un effet modeste sur la survie des greffons (médiane de survie de 20 jours pour les deux traitements), alors que la combinaison prolonge considérablement la survie des greffons (médiane de survie de 60 jours) (Smith et al., 2000).

4. Inhibition du récepteur de l'IL-15

a) Anticorps anti-IL-2/15R β (mik β 1)

L'anticorps mik β 1 est dirigé contre la chaîne IL-2/15R β . Sa caractérisation *in vitro* a montré son efficacité dans l'inhibition de la *trans*-présentation de l'IL-15. En revanche mik β 1 n'inhibe pas la *cis*-présentation. L'anticorps monoclonal Mik β 1 humain a montré une faible efficacité chez les patients atteints de T-LGL (Waldmann et al., 2013).

b) siARN dirigés contre IL-2/15R β

La stratégie de blocage du récepteur IL-2/15R β avec un siARN associé à des nanoparticules a été testée *in vivo* sur un modèle d'arthrite chez le rat. Elle a permis de réduire le score clinique de l'arthrite chez les rats traités. La régression de la pathologie est associée à une diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF α dans le site inflammatoire (Zhang et al., 2013).

Table 2 : résumé des différents inhibiteurs de l'IL-15 et leurs cibles

Inhibiteurs de l'IL-15	Cible
IL-15muté/FC γ 2a (CRB15)	IL-15R γ
AMG 714 (HuMaxIL-15)	Interface d'interaction de l'IL-15 avec IL-15R γ
Récepteur soluble IL-15R α	IL-15 soluble
mik β 1	IL-15R β
siARN anti IL-2/15R β	IL-15R β

Partie I

Développement d'antagonistes de l'IL-15

VIII. Développement d'antagonistes de l'IL-15

L'IL-15 influence le développement, la survie, la différenciation et la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK. Ainsi, un défaut de sa signalisation ou de sa production altère le développement des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ mémoires. À l'inverse, une production incontrôlée de l'IL-15, comme dans les maladies inflammatoires ou auto-immunes, induit une forte activation et prolifération des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺. En effet, une forte expression d'IL-15 est retrouvée dans les maladies auto-immunes telles que l'arthrite, le diabète de type I et les maladies inflammatoires de l'intestin. L'IL-15 a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche et de développement de molécules antagonistes dans le but de comprendre son implication dans différents contextes pathologiques.

Mes travaux de thèse se sont focalisés sur le développement de nouveaux antagonistes de l'IL-15 qui permettront de mieux comprendre le fonctionnement de l'IL-15 *in vitro* et *in vivo*, et de tester leurs effets thérapeutiques dans deux modèles murins: l'arthrite induite par le collagène et le rejet de greffe de peau.

Deux stratégies d'inhibition ont mené au développement de deux antagonistes :

- le NANTIL-15 « Novel ANTagoniste of IL-15»
- le BiG «βγ inhibitor»

Ces deux inhibiteurs empêchent l'interaction de l'IL-15 avec ses récepteurs via deux mécanismes différents.

A. Le NANTIL-15

1. Stratégie d'inhibition et production du NANTIL-15

La molécule NANTIL-15 est un polypeptide mutant de l'IL-15, dans lequel 3 acides aminés sont mutés par substitution : la leucine en position 45 par un acide aspartique (L45D), l'asparagine en position 65 par la lysine (N65K) et la leucine en position 69 par une arginine (L69R).

Deux IL-15 mutées sont liées à un fragment Fc d'immunoglobuline IgG2 murine via des liens peptidiques (linkers) (**figure 20**). La partie Fc de l'immunoglobuline IgG2a est « non lytique » car les acides aminés cruciaux pour la liaison de la partie Fc avec les FcγR ou avec le composant C1q du complément ont été mutés. La partie Fc du NANTIL-15 servirait à augmenter sa demi-vie *in vivo*. Cette région sert également à faciliter sa production et sa purification.

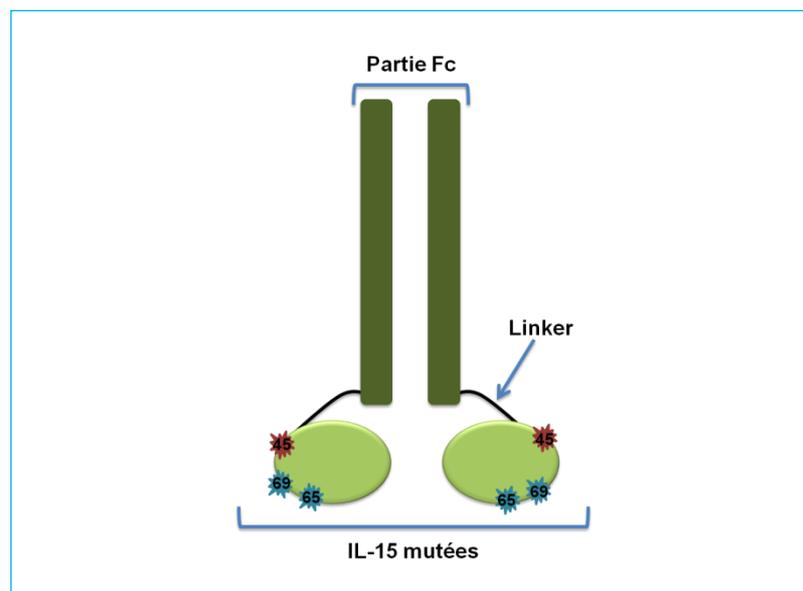


Figure 20: Schéma de la composition de l'antagoniste NANTIL-15 : l'antagoniste NANTIL-15 est composé de deux molécules d'IL-15 mutées reliées à une partie Fc d'une IgG murine par un linker. Les mutations de l'IL-15 sont en position L45, N65 et L69.

Les deux mutations en position 65 et 69 se situent dans l'interface d'interaction de l'IL-15 avec la chaîne IL-2/15R β (**figure 16**). Celles-ci empêchent le recrutement de la chaîne IL-2/15R β et ainsi le transduction du signal par le récepteur de moyenne affinité IL-15R $\beta\gamma$ et le récepteur de haute affinité IL-15R $\alpha\beta\gamma$ (**figure 21**). La mutation L45D améliore l'expression du NANTIL-15 sans altérer son activité biologique.

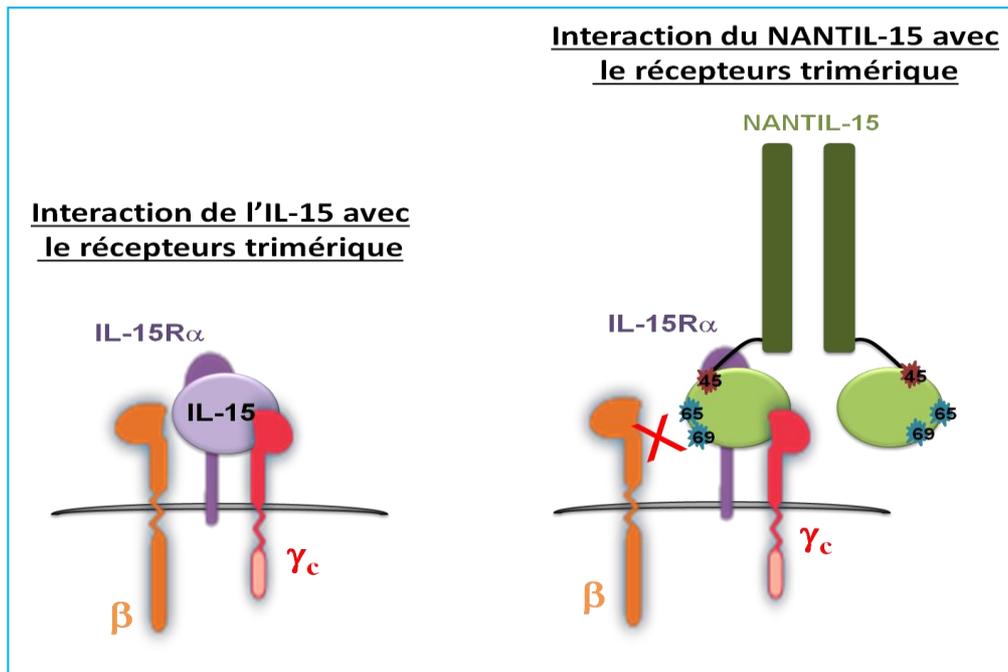


Figure 21 : Mode d'action du NANTIL-15 : le NANTIL-15 se fixe au récepteur trimérique IL-15R $\alpha\beta\gamma$ de la même manière que l'IL-15 sauvage. Les mutations N65K et L69R empêchent le recrutement de la chaîne IL-2/15R β .

Afin de déterminer les propriétés de fixation du NANTIL-15 aux récepteur IL-15R α et IL-2/15R β , nous avons utilisé la technique de Résonance Plasmonique de Surface (SPR), et les résultats ont montré que le NANTIL-15 se fixe à la chaîne IL-15R α avec une affinité ($KD = 25,4 \times 10^{-10}$ M) comparable à celle de l'IL-15 ($KD = 9,4 \times 10^{-10}$ M). Comme attendu les mutations N65K et L69R dans l'interface d'interaction avec la chaîne IL-2/15R β abroge la fixation du NANTIL-15 à la chaîne IL-2/15R β (**figure 22**).

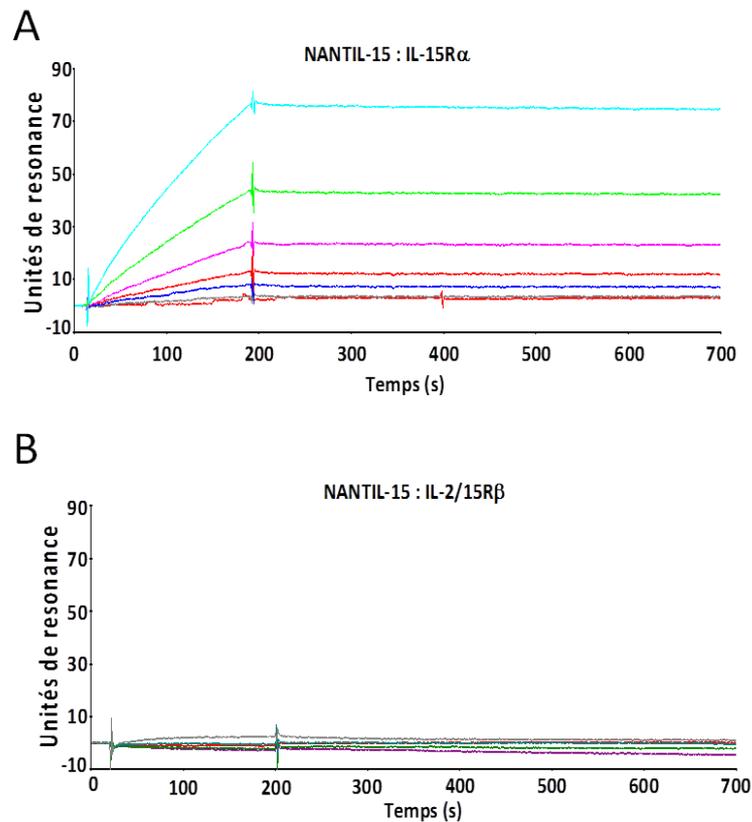


Figure 22 : Caractérisation du NANTIL-15. SPR sensorgramme de la fixation (phases d’association et de dissociation) de concentrations croissantes de NANTIL-15 sur (A) la chaîne IL-15R α ou (B) la chaîne IL-2/15R β immobilisées sur une puce CM5.

2. Caractérisation du NANTIL-15 *in vitro*

a) Spécificité d’inhibition du NANTIL-15

Pour tester l’efficacité du NANTIL-15, nous avons réalisé un test d’inhibition de prolifération induite par l’IL-15 ou l’IL-2 sur les cellules CTLL-2. Les cellules CTLL-2 murines expriment les récepteurs IL-15R α , IL-2R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ . Les cellules CTLL-2 sont cultivées en présence d’une concentration fixe d’IL-15 ou d’IL-2. Ces concentrations représentent les EC50 de prolifération de ces deux cytokines. L’inhibition de prolifération est effectuée avec des concentrations croissantes du NANTIL-15. Les résultats montrent que le NANTIL-15

inhibe la prolifération des cellules CTLL-2 induite par l'IL-15 avec une IC50 de 4 nM. A l'inverse le NANTIL-15 n'a aucun effet inhibiteur sur la prolifération induite par l'IL-2 sur les cellules CTLL-2 (**figure 23**).

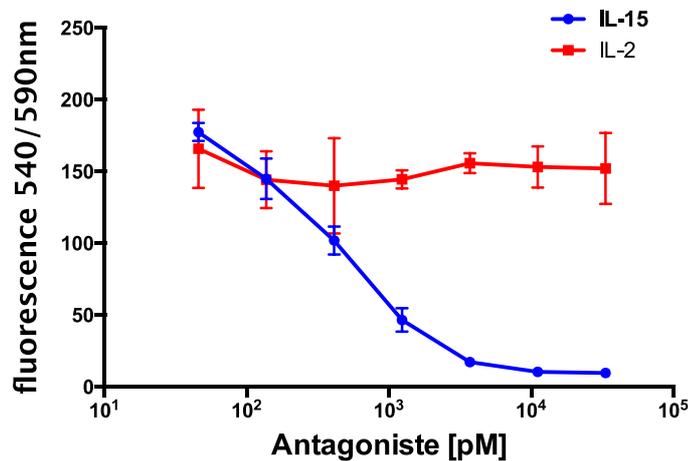


Figure 23 : Spécificité d'inhibition de la prolifération des cellules CTLL-2 par le NANTIL-15. Les cellules CTLL-2 sont cultivées en présence de 25pM d'IL-15 (ligne bleue) ou de 100pM d'IL-2 (ligne rouge) et de concentrations croissantes du NANTIL-15. La culture est réalisée durant trois jours et l'Alamar Blue est rajouté à J3 durant 6h puis la fluorescence est lue à 540-590 nm. (N=3).

b) L'effet du NANTIL-15 est dépendant de l'expression de la chaîne IL-15R α

Le même test d'inhibition de prolifération a été effectué sur la lignée cellulaire humaine Kit225 (**figure 24A**) et sur les cellules NK-92 (**figure 24B**) en présence d'une concentration fixe d'IL-15 et de NANTIL-15. Les résultats montrent que le NANTIL-15 n'inhibe pas la prolifération induite par l'IL-15 sur ces cellules.

Pour comprendre l'absence d'un effet inhibiteur du NANTIL-15 sur les lignées humaines, nous avons comparé son effet à celui de l'anticorps A41 anti- IL-2/15R β qui agit sur le récepteur de moyenne affinité IL-2/15R $\beta\gamma$ et pas sur le récepteur trimérique de forte affinité

IL-15R $\alpha\beta\gamma$ (Lehours et al., 2000). Les résultats montrent que l'A41 suffit pour inhiber la prolifération des cellules Kit225 et des cellules NK-92 en présence d'IL-15.

Un test d'inhibition de prolifération est également réalisé sur les PBMC humaines en présence de 50 pM d'IL-15 et de 100 nM de NANTIL-15. De manière similaire aux lignées humaines Kit225 et NK-92, le NANTIL-15 n'inhibe pas la prolifération induite par l'IL-15 sur les cellules NK et les cellules CD8⁺. Les résultats montrent également que la présence de l'A41 seul suffit pour inhiber la prolifération des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ (**figure 24C et 24D**). Aucun effet synergique entre le NANTIL-15 et l'A41 n'est montré. Ces résultats montrent que la prolifération des cellules NK et CD8⁺ est induite via le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$. L'ensemble de ces résultats indiquent que l'action du NANTIL-15 sur les cellules primaires et les lignées humaines est dépendante de la présence du récepteur trimérique à la surface des cellules IL-15R $\alpha\beta\gamma$.

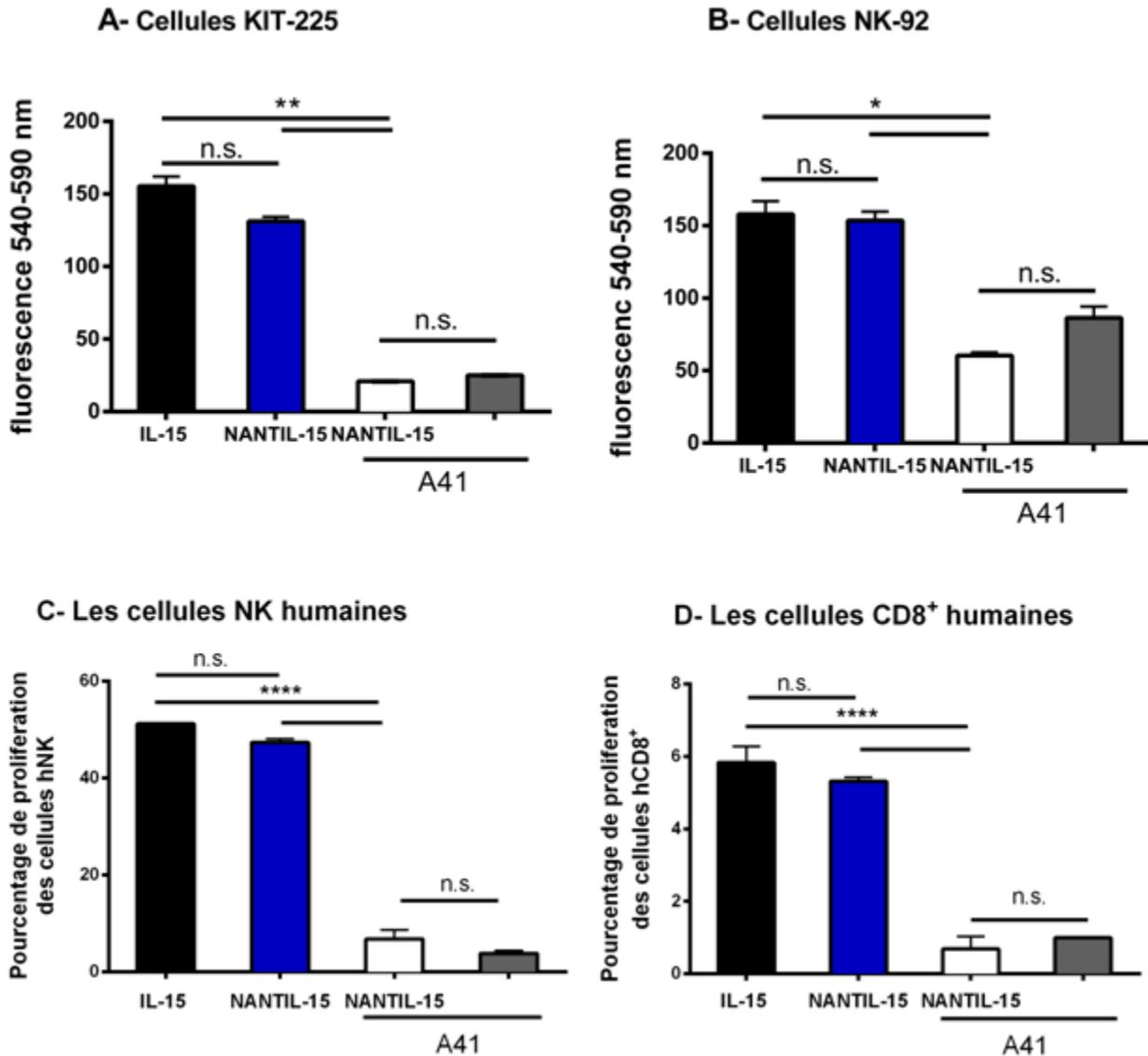


Figure 24 : Le NANTIL-15 ne présente pas d'effet inhibiteur sur les récepteurs dimérique IL-2/15R β . Les cellules Kit225 (A) ou les cellules NK-92 (B) sont cultivées en présence d'une concentration fixe d'IL-15 (25 pM) (histogramme noir). Une inhibition de prolifération induite par l'IL-15 est réalisée en présence de 100 nM de NANTIL-15 (histogramme bleu), de 10 μ g/ml d'anticorps A41 (histogramme gris) ou des deux inhibiteurs (A41 + NANTIL-15) (histogramme blanc). La culture est réalisée pendant trois jours et l'Alamar Blue est rajouté à J3 durant 6h puis la fluorescence à 540-590 nm est mesurée. Un même test d'inhibition est réalisé sur les PBMC humaines marquées au VPD450 en présence d'une concentration fixe de 50 pM d'IL-15 et les mêmes conditions d'inhibition. La culture est réalisée durant 6 jours, puis un marquage des cellules NK et CD8⁺ est réalisé par cytométrie en flux. Le pourcentage de prolifération des cellules NK (C) et des lymphocytes T CD8⁺ (D). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La comparaison est effectuée avec un test statistique one-way ANOVA. n.s., non significatif; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** < 0.001

Afin de montrer l'importance de la chaîne IL-15R α dans l'effet inhibiteur du NANTIL-15 sur la prolifération des cellules humaines Kit225 induite par l'IL-15, nous avons transfectées ces cellules avec la chaîne IL-15R α afin d'augmenter le taux d'expression du récepteur trimérique IL-15R $\alpha\beta\gamma$ à la surface de ces cellules puis nous avons testé l'effet inhibiteur du NANTIL-15 sur ces cellules.

Les résultats montrent que contrairement aux cellules Kit225 sauvages, le NANTIL-15 a un effet inhibiteur sur la prolifération induite par l'IL-15 sur les cellules Kit225 transfectées avec la chaîne IL-15R α (figure 25).

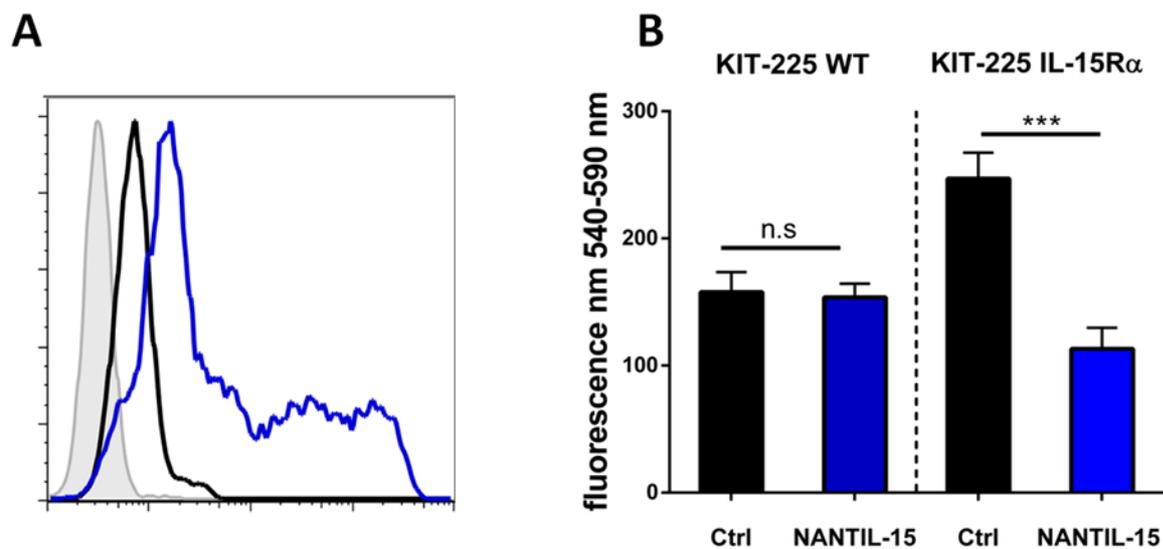


Figure 25 : L'effet inhibiteur du NANTIL-15 est tributaire de l'expression de la chaîne IL-15R α . (A) Les cellules Kit225 sauvages ou Kit225 transfectées avec la chaîne IL-15R α , et son expression vérifiée par cytométrie en flux. Isotype contrôle (ligne grise), cellules Kit225 sauvage (ligne noire) et les cellules transfectée (ligne bleue). (B) les deux types cellulaires sont cultivés en présence d'une concentration fixe d'IL-15 (25 pM) (histogramme noir). Une inhibition de prolifération est réalisée en présence 100 nM de NANTIL-15 (histogramme bleu). La culture est réalisée pendant trois jours et l'Alamar Blue est rajouté à J3 durant 6h puis la fluorescence à 540-590 nm est mesurée. Les résultats sont représentatifs de deux expériences individuelles. La comparaison est effectuée avec un test statistique t-test. n.s., non significatif; *** P < 0.001.

c) Effet du NANTIL-15 sur la *trans*-présentation

Pour étudier l'effet du NANTIL-15 sur la *trans*-présentation de l'IL-15, nous avons analysé la phosphorylation du STAT-5 intracellulaire des cellules répondeuses Kit225 après leur co-culture avec des cellules présentatrices de l'IL-15 : les HEK-293IL-15R α (cellules stablement transfectées). Trois conditions d'inhibition de la *trans*-présentation sont étudiées en fonction du moment de traitement avec le NANTIL-15 : **(i)** le traitement avec le NANTIL-15 s'effectue au moment de la co-culture **(ii)** les cellules répondeuses sont Prétraitées avec le NANTIL-15 avant la co-culture et **(iii)** les cellules HEK-293IL-15R α présentatrices sont prétraitées avec le NANTIL-15 avant le traitement en IL-15.

En absence d'IL-15, aucun signal pSTAT-5 n'est détecté dans les co-cultures. Lorsque les cellules HEK-293R α sont chargées préalablement avec l'IL-15, celles-ci la *trans*-présentent aux cellules répondeuses Kit225 et permettent ainsi la phosphorylation de STAT-5 intracellulaire.

Le traitement de la co-culture avec le NANTIL-15 (**figure 26A**) ne provoque pas l'inhibition de la phosphorylation de STAT-5 intracellulaire dans les cellules Kit225 et donc le NANTIL-15 n'inhibe pas la *trans*-présentation de l'IL-15 aux cellules Kit225. De manière similaire le traitement préalable des cellules répondeuses Kit225 avec le NANTIL-15 (**figure 26B**), ne permet pas d'inhiber la *trans*-présentation de l'IL-15 aux cellules Kit225. Dans le dernier cas, le traitement des cellules HEK-293R α présentatrices avec le NANTIL-15 est réalisé avant leur chargement avec l'IL-15 (**figure 26C**) et seulement lors de cette condition une inhibition d'environ 65% de la phosphorylation de STAT-5 intracellulaire est observée. L'ensemble de ces résultats montrent que l'efficacité du NANTIL-15 est tributaire de la

disponibilité de la chaîne IL-15R α , et confirme que celui-ci n'a aucun effet sur le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$.

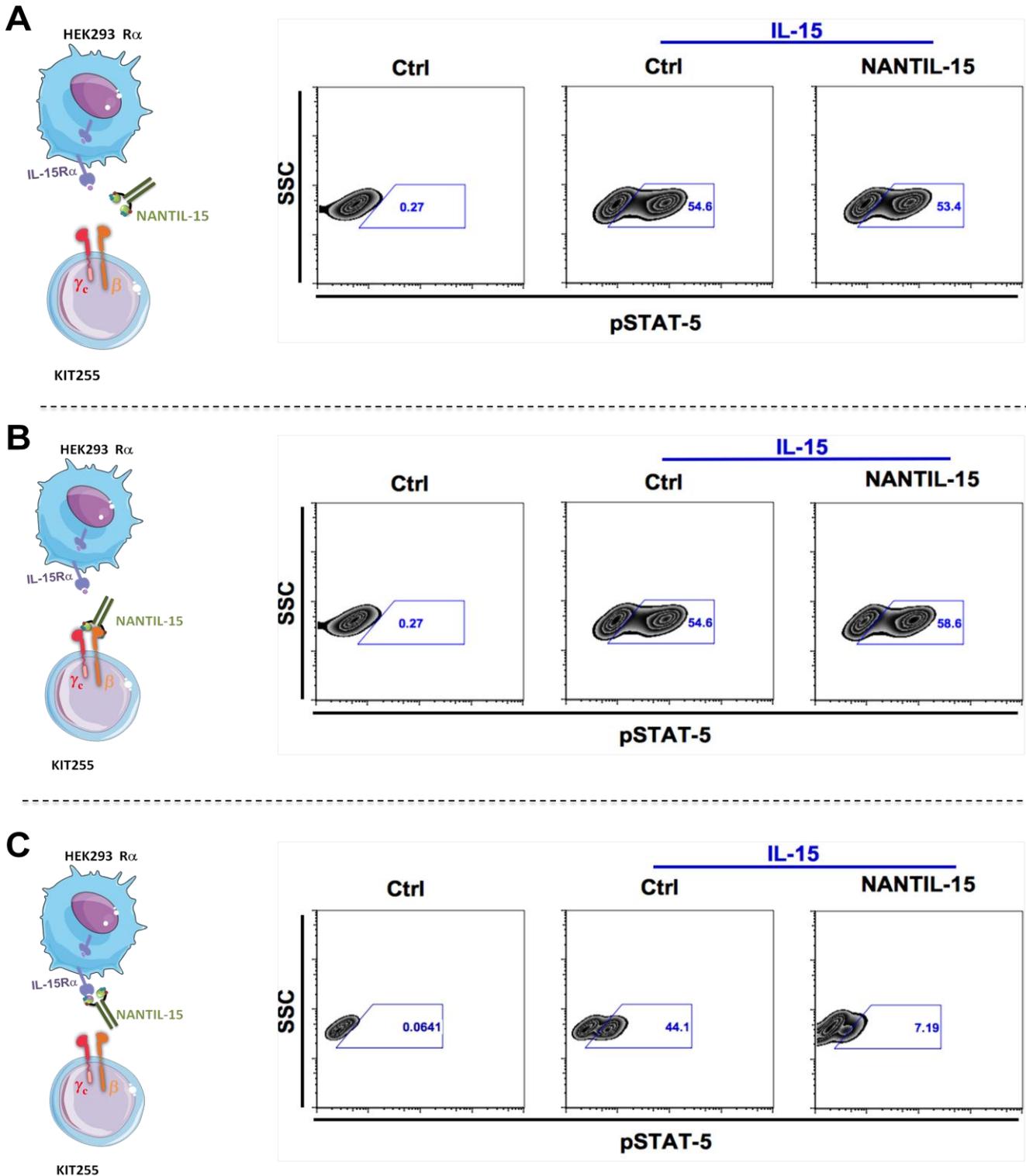


Figure 26 : Le NANTIL-15 n'inhibe pas la *trans*-présentation de l'IL-15. Chargement des cellules HEK-293 transfectées IL-15R α avec 50 pM d'IL-15. Les cellules répondeuses Kit225 sevrées sont mises en co-culture avec les cellules présentatrices HEK-293 durant 1h. **(A)** Traitement de la co-culture Kit225 et HEK293 avec 100 nM de NANTIL-15. **(B)** Prétraitement des cellules Kit225 avec 100 nM de NANTIL-15 durant 30 minutes avant la co-culture. **(C)** Traitement des cellules présentatrices avec le NANTIL-15 avant leur chargement en IL-15. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées et la phosphorylation de STAT-5 intracellulaire est analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont analysés sur le logiciel FlowJo et sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

3. Caractérisation de l'effet du NANTIL-15 *in vivo*

a) Etude de la pharmacocinétique

Afin de d'étudier les effets thérapeutiques du NANTIL-15 *in vivo*, nous avons d'abord réalisé une étude pharmacocinétique et déterminé sa demi-vie *in vivo*. Une forme de NANTIL-15 avec une partie Fc humaine (10 µg) a été injecté par voie intraveineuse à souris C57BL/6. Des prélèvements sanguins ont été effectués à différents temps et la présence du NANTIL-15 dans le sang a été mesurée par ELISA pour déterminer la cinétique d'élimination du NANTIL-15 du sang.

Les résultats montrent une cinétique d'élimination à un seul compartiment régit par l'équation mathématique suivante : $Y = A.e^{-bx}$

Cette équation a permis de calculer une demi-vie $T_{1/2} = 6h$ (figure 27).

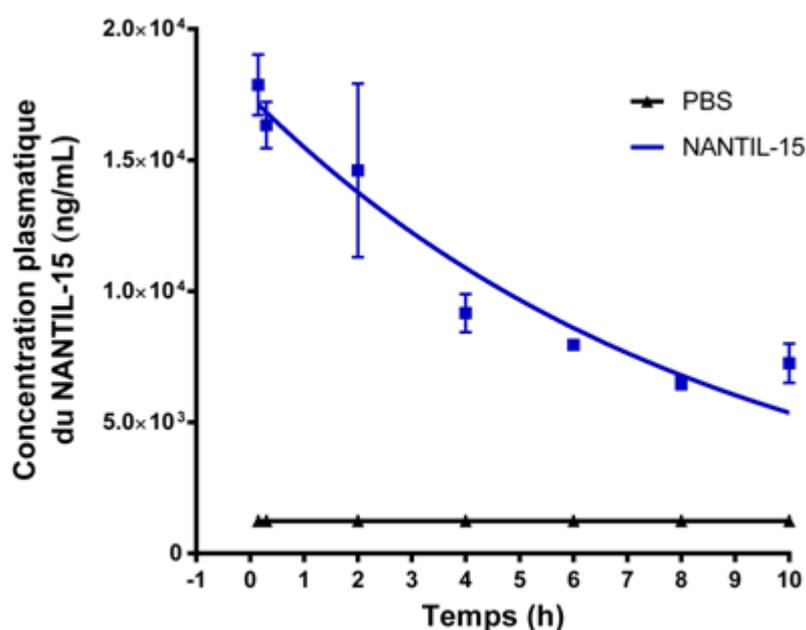


Figure 27 : Pharmacocinétique du NANTIL-15 *in vivo*. Les souris C57BL/6 ont été injectées par voie intraveineuse avec 10 µg de NANTIL-15. Plusieurs prélèvements sanguins ont été réalisés à différents temps et la concentration du NANTIL-15 (ligne bleue) dans le sérum a été évaluée par ELISA. La concentration plasmatique du NANTIL-15 dans le sang est représentée en fonction du temps. Un groupe PBS contrôle est également réalisé (ligne noire). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes incluant 3 souris pour chaque temps.

b) Effets du NANTIL-15 sur l'homéostasie des cellules NK et CD8⁺

Il a été précédemment montré chez les souris IL-15^{-/-}, une déficience des cellules NK et une réduction du nombre de cellules T CD8⁺ mémoires. Afin de caractériser les effets du NANTIL-15 sur l'homéostasie des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ *in vivo*, nous avons analysé deux modes d'administration chez la souris : une administration sur une période courte de quatre jours avec différentes doses de NANTIL-15 ou l'administration d'une dose quotidienne durant deux semaines (**Figure 28A**).

(1) Traitement court:

Afin de déterminer l'effet du NANTIL-15 sur l'homéostasie des cellules NK et des cellules CD8⁺, Les souris C57BL/6 ont reçu une injection par jour durant quatre jours avec différentes doses NANTIL-15 par voie intra-péritonéale (**figure 28A**). Au cinquième jour, les souris ont été sacrifiées et le pourcentage de cellules NK et CD8⁺ dans la rate a été mesurée en cytométrie de flux. Les cellules NK ont été caractérisées par l'expression du marqueur NK1.1⁺ et l'absence du marqueur de lymphocyte T CD3. Les cellules CD8⁺ ont été caractérisées par la présence des deux marqueurs CD8⁺ et CD3⁺. Les résultats montrent que le pourcentage des cellules NK spléniques chez les souris traitées avec le NANTIL-15 est comparable à celui des souris contrôles non-traitées (**figure 26A gauche**). Ce pourcentage ne varie pas quel que soit la dose de NANTIL-15 injectée. Les mêmes résultats sont obtenus pour le pourcentage des cellules T CD8⁺ spléniques (**figure 28A droite**). La maturation des cellules NK a été déterminée par l'expression membranaire des marqueurs CD27 et CD11b à leur surface. Les marqueurs CD62L et CD44 membranaires ont été utilisés pour suivre la maturation des cellules CD8⁺. La maturation des cellules NK et CD8⁺ (**figure 28B**) spléniques n'est pas affectée par le NANTIL-15 *in vivo*.

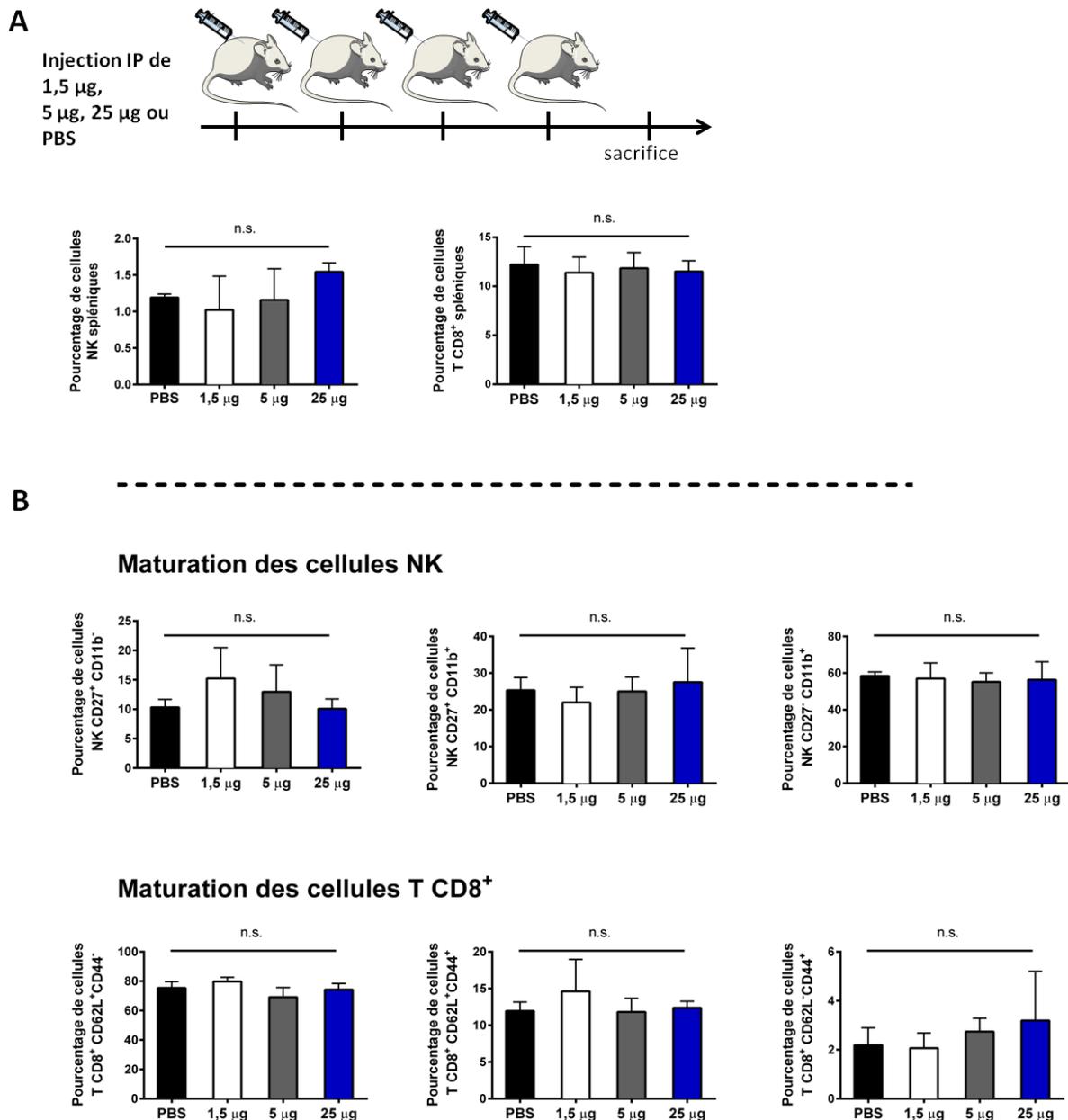


Figure 28 : Le court traitement par le NANTIL-15 n'affecte pas l'homéostasie des cellules NK et lymphocytes T CD8+ *in vivo*. (A) Les souris C57BL/6 sont traitées avec trois différentes doses de NANTIL-15 durant quatre jours par voie intra-péritonéale : 1,5 µg (histogramme blanc), 5 µg (histogramme gris) et 25µg (histogramme bleu), un groupe control injecté avec du PBS (histogramme noir) est réalisé et le pourcentage des cellules NK et de lymphocytes T CD8+ spléniques est évalué par cytométrie en flux. (B) L'expression des marqueurs de maturation CD27 et CD11b sur les cellules NK (panel du haut) et les marqueurs CD62L et CD44 sur les lymphocytes CD8+ (panel du bas) est analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatifs de deux expériences incluant 5 souris par groupe. Comparaison des groupes avec un test statistique Kruskal-Wallis. n.s., non significatif.

(2) **Traitement continu**

Afin de s'assurer que le NANTIL-15 n'influence pas l'homéostasie des cellules NK et T CD8⁺ chez la souris, nous avons évalué son effet sur le long terme. Une dose quotidienne de 5 µg de NANTIL-15 a été injectée par voie intra-péritonéale chez les souris C57BL/6 durant deux semaines (**figure 29A**). Une analyse du pourcentage de cellules NK et CD8⁺ spléniques est mesurée par cytométrie de flux. La maturation des cellules NK a été déterminée comme précédemment. Les résultats montrent que le traitement continu de deux semaines n'influence pas l'homéostasie des cellules NK et des cellules CD8⁺ spléniques. En effet le pourcentage des cellules CD8⁺ (**figure 29A droite**) et des cellules NK (**figure 29A gauche**) chez les souris traitées avec le NANTIL-15 est comparable aux souris contrôles. Seule la population de cellules T CD8⁺ matures double positives CD44⁺ CD62L⁺ spléniques est diminuée par le traitement par le NANTIL-15 (**figure 29B**).

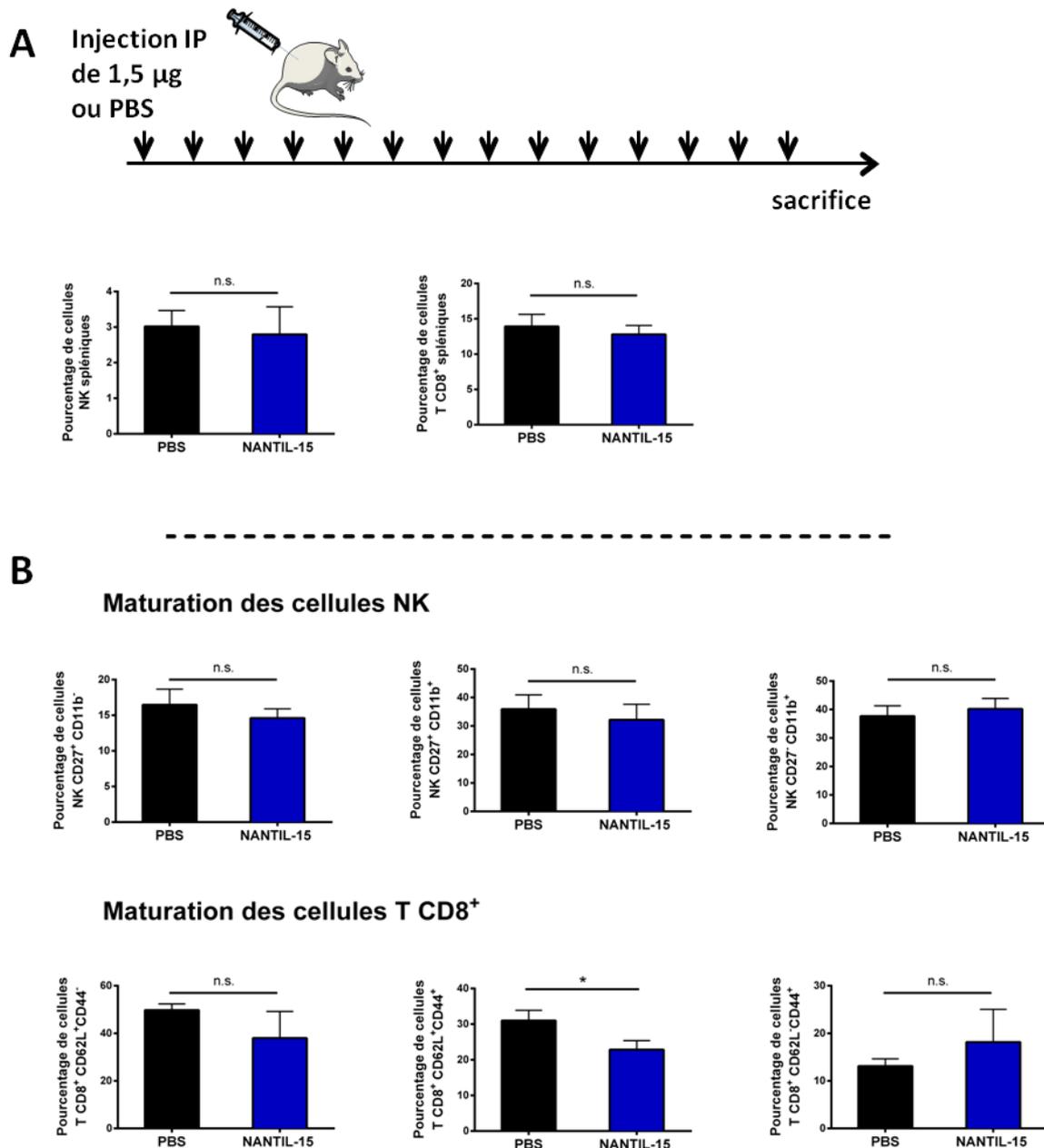


Figure 29 : Le traitement continu par le NANTIL-15 n'affecte pas l'homéostasie des cellules NK et lymphocytes T CD8⁺. (A) Les souris C57BL/6 sont traitées avec une dose quotidienne de 1,5 μg (histogramme bleu) de NANTIL-15 durant deux semaines par voie intra-péritonéale, un groupe control injecté avec du PBS (histogramme noir) est réalisé et le pourcentage des cellules NK et de lymphocytes T CD8⁺ spléniques est évalué par cytométrie en flux. (B) L'expression des marqueurs de maturation CD27 et CD11b sur les cellules NK (panel du haut) et les marqueurs CD62L et CD44 sur les lymphocytes CD8⁺ (panel du bas) est analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatifs de trois expériences incluant 5 souris par groupe. Comparaison des groupes avec un test statistique Mann-whitney. n.s., non significatif; * $P < 0.05$

c) Inhibition de l'effet induit par l'IL-15 exogène

Les résultats *in vitro* montrent que le NANTIL-15 est inhibiteur de la prolifération induite par l'IL-15 sur les cellules murines CTLL-2. Pour montrer son effet inhibiteur *in vivo*, nous avons réalisé une expérience d'inhibition de l'IL-15 exogène injectée chez la souris par le NANTIL-15. Les souris C57Bl/6 sont traitées avec une dose de 5 µg de NANTIL-15 6 h avant la première injection de 2 µg d'IL-15 à J1, puis à J2 et J3 le NANTIL-15 et l'IL-15 sont injectés simultanément par voie intra-péritonéale. Deux groupes contrôles ont été réalisés : un groupe de souris traitées avec le PBS et un groupe de souris traitées avec l'IL-15 seule (**figure 30A**). Le pourcentage de cellules NK spléniques a été évalué par cytométrie en flux.

Les résultats montrent que trois injections répétées de 2 µg d'IL-15 augmente le pourcentage de cellules NK spléniques de 4 fois plus comparé aux souris contrôles injectées avec le PBS. Le traitement simultané des souris avec le NANTIL-15 et l'IL-15 induit un retour du pourcentage des cellules NK spléniques au niveau du groupe PBS (**figure 30B**).

Ce résultat montre donc que le NANTIL-15 est efficace dans l'inhibition de prolifération des cellules NK induite par l'IL-15 *in vivo*.

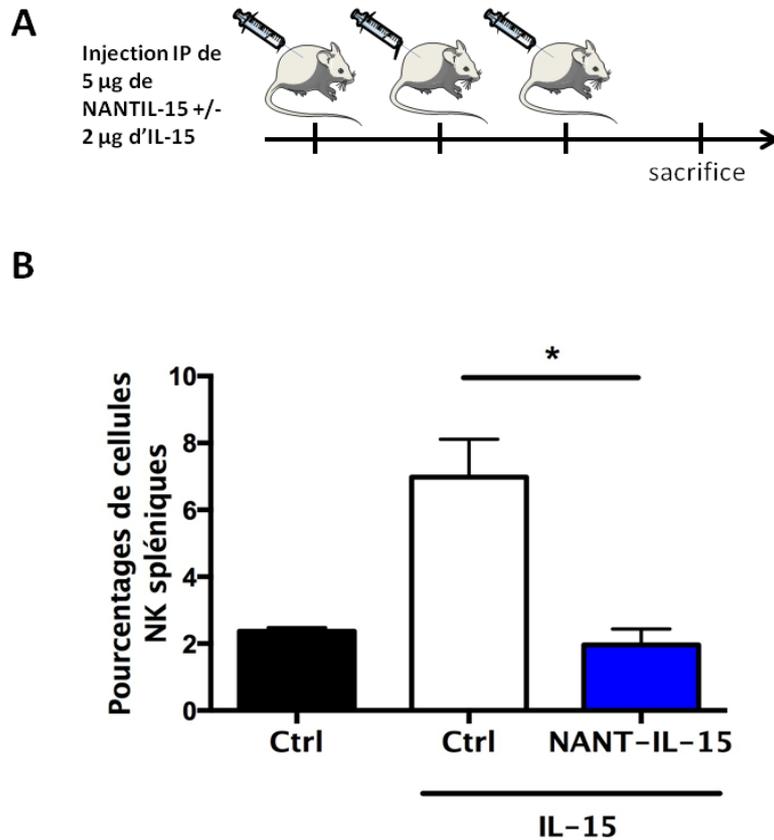


Figure 30 : Le NANTIL-15 inhibe l'activation des cellules NK induite par l'IL-15 exogène. (A) Une injection intra-péritonéale quotidienne de 2 μ g d'IL-15 accompagnée ou non d'une injection de 5 μ g de NANTIL-15 sont réalisées durant trois jours. Les souris sont ensuite sacrifiées à J4 pour évaluer le pourcentage de cellules NK spléniques. Un groupe contrôle PBS est également réalisé (n=5). (B) Le pourcentage de cellules NK spléniques CD3⁻NK1.1⁺ dans les groupes contrôle PBS (histogramme noire), IL-15 (histogramme rouge) et co-traitement IL-15+NANTIL-15 (histogramme bleu) est évalué par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes incluant 5 souris par groupe. Les résultats sont comparés avec un test statistique one-way ANOVA. n.s., non significatif; * P < 0.05.

d) Effet du NANTIL-15 sur l'évolution de l'arthrite

L'effet thérapeutique du NANTIL-15 a été testé dans un modèle murin auto-immun d'arthrite induite par le collagène. L'arthrite dans ce modèle est induite par une première immunisation des souris DBA/1 avec une émulsion composée de collagène bovin de type II et d'adjuvant complet de Freund. Cette émulsion est injectée à la base de la queue par voie intra-épidermique. Durant une période de trois semaines les souris développent une réponse immunitaire anti-collagène. Au bout des trois semaines, un rappel immunologique est effectué

avec une seconde émulsion composée du même collagène mais avec de l'adjuvant incomplet de Freund. La pathologie se développe très rapidement les jours suivant le rappel immunologique. Trois groupes expérimentaux ont été inclus : un groupe sans arthrite, un groupe avec l'arthrite non traitées témoin et un groupe traité avec le NANTIL-15. Le traitement avec le NANTIL-15 consiste en l'injection d'une dose quotidienne de 5 µg par voie intra-péritonéale durant deux semaines (quatorze injections au total). Le traitement avec le NANTIL-15 s'effectue concomitamment avec le rappel immunologique. Un suivi de l'évolution du score clinique de l'arthrite se fait tous les jours selon les conditions décrites dans la partie matériels et méthodes (**figure 31A**).

(1) Score Clinique

Les résultats montrent que le NANTIL-15 (courbe bleue) réduit significativement le développement de l'arthrite chez les souris DBA/1. Avant le rappel (période de J10 à J21) on peut observer une légère différence non significative entre les deux groupes qui est due à un début d'apparition aléatoire de la pathologie. Une première phase de J21 à J28 correspondant à la première semaine du traitement avec le NANTIL-15, où les deux groupes traité et non traité, manifestent une évolution de la pathologie mais celle-ci est freiné dans le groupe traité. Enfin, dans la deuxième phase de J28 à J37, le NANTIL-15 réduit de manière très nette et significative l'évolution de l'arthrite (**figure 31B**).

(2) Les auto-anticorps

L'effet du NANTIL-15 sur la production d'auto-anticorps anti-collagène a été également évalué dans le sérum sanguin. Le dosage du titre d'anticorps a été mesuré par ELISA, les résultats indiquent que le NANTIL-15 n'a aucun effet sur la production de ces auto-anticorps (**figure 31C**).

(3) Effet du NANTIL-15 sur les cellules NK et cellules CD8⁺

Les analyses des populations de cellules NK et lymphocytes T CD8⁺ spléniques dans ce contexte pathologique, montrent que le NANTIL-15 n'a aucun effet sur les cellules NK (**figure 31D**). En effet, le pourcentage de cellules NK dans la rate est comparable entre le groupe de souris traitées et le groupe non traité. Aucune différence n'est observée également pour les cellules T CD8⁺ (**figure 31E**).

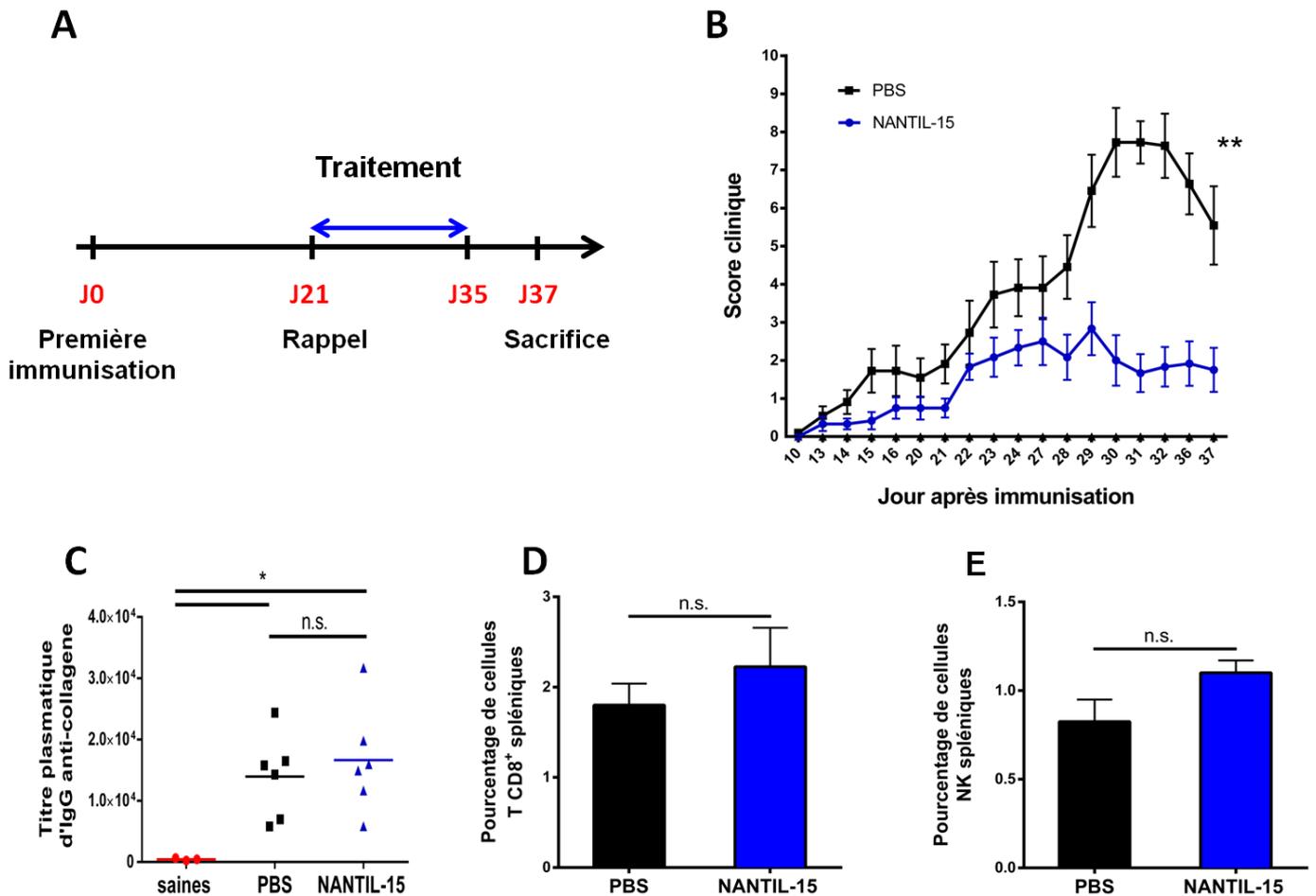


Figure 31 : effet du NANTIL-15 sur l'évolution de l'arthrite. (A) induite chez les souris DBA/1 par une première immunisation par injection intra-épidermique à la base de la queue avec du collagène bovin de type II émulsionné dans du CFA. Trois semaines après l'immunisation, un rappel est réalisé avec une émulsion composée de collagène de type II et d'IFA. Le traitement avec une injection quotidienne de 5 µg/souris de NANTIL-15 est réalisé durant deux semaines. (B) Le score clinique de l'arthrite est mesuré quotidiennement chez le groupe non traités (courbe noire) et les souris traitées avec le NANTIL-15 (courbe bleue). (C) Comparaison du titre plasmatique d'anticorps IgG anti-collagène développés par les souris saines (rouge), les souris non traitées (noir) et les souris traitées avec le NANTIL-15 (bleu). L'effet du traitement NANTIL-15 sur les populations de cellules NK (D) et lymphocytes T CD8⁺ (E) spléniques par un marquage de ces deux populations par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes incluant 5 souris par groupe. Les résultats sont comparés avec un test statistique Mann-Whitney (B), one-way ANOVA (C) et t-test (D et E). n.s., non significatif; * P < 0.05, ** P < 0.01.

(4) Effet du NANTIL-15 sur l'infiltrat immunitaire

Les résultats précédents ont montré que dans le contexte inflammatoire lors de l'arthrite induite par le collagène, le NANTIL-15 est capable de réduire significativement l'évolution de la pathologie sans influencer le pourcentage et la maturation des cellules NK et CD8⁺ spléniques. Ces deux résultats suggèrent que les effets du NANTIL-15 ne cible pas les cellules immunitaires périphériques mais agit localement sur l'infiltrat immunitaire des jonctions synoviales inflammées.

L'étude des coupes histologiques des doigts de souris DBA/1 montre que les souris non traitées présentent des jonctions élargies et fortement infiltrées par rapport aux souris contrôles (quadrants rouges). Les souris traitées présentent également un infiltrat dans la jonction mais moins important. Le marquage des cellules T CD8⁺ infiltrant dans ces jonctions montre leur forte présence chez les souris non traitées (cellules colorées en rouge). Cet infiltrat est présent également dans le groupe traité mais à un niveau moindre (**figure 32**).

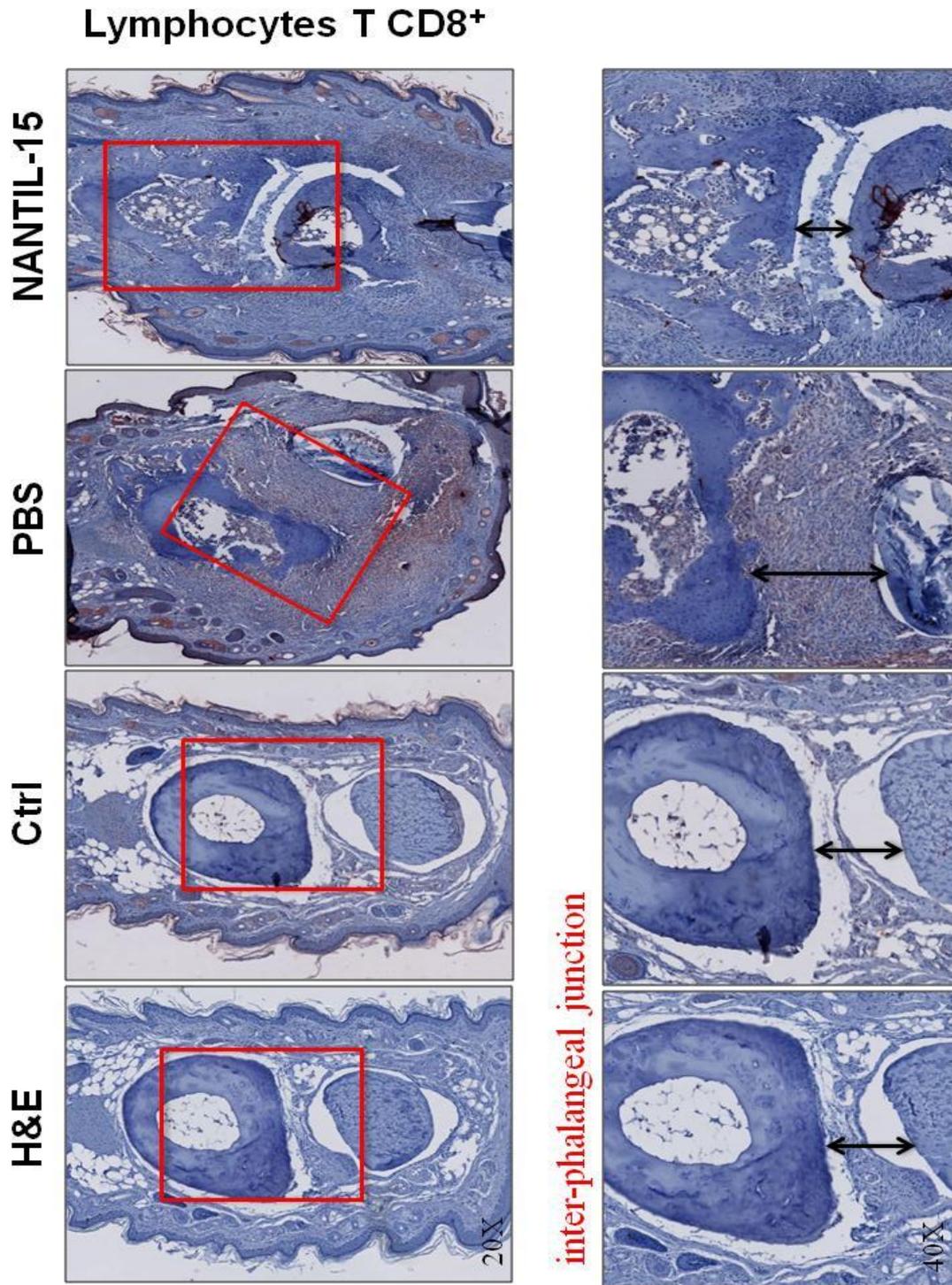


Figure 32 : Le traitement avec le NANTIL-15 réduit l'infiltrat dans les jonctions inter-phalangiennes. Les pattes des souris traitées et non traitées (n= 5) sont prélevées après sacrifice à J 37. Un marquage histologique des lymphocytes T CD8⁺ avec un contre marquage avec l'hématoxyline, a été réalisé sur les tissus décalcifiés et inclus en paraffine. Des sections représentatives des jonctions inter-phalangiennes sont représentées au grossissement 40X.

4. Discussion

L'IL-15 est une cytokine pouvant stimuler les cellules T et NK. L'ARNm de l'IL-15 est exprimé par plusieurs types cellulaires mais l'expression de la protéine est hautement régulée. Plusieurs études ont montré que les transcrits et la protéine de l'IL-15 sont augmentés dans diverses pathologies telles que l'arthrite, le diabète de type I, maladies cœliaque, psoriasis et le rejet de greffe. Compte tenu de son rôle dans l'activation des cellules NK et des lymphocytes T pendant l'inflammation, l'IL-15 représente une cible thérapeutique potentielle.

Nos études de l'effet du NANTIL-15 sur l'inhibition de prolifération induite par l'IL-15 et l'IL-2 sur les cellules murines CTLL-2 ont montré son efficacité dans l'inhibition de l'IL-15 et non de l'IL-2. L'absence d'effet l'IL-2 suggère que le NANTIL-15 n'agit pas sur le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ partagé par les deux cytokines. Par ailleurs, l'étude de la prolifération induite par l'IL-15 sur les lignées humaines Kit225 et NK-92, ne montre pas d'effet inhibiteur du NANTIL-15 malgré l'expression des trois chaînes IL-15 R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ . L'utilisation de l'anticorps A41 (anti-IL-2/15R β) (Lehours et al., 2000) inhibe la prolifération induite par l'IL-15 qui s'opère via le récepteur dimérique IL-15R $\beta\gamma$ et non par le récepteur trimérique IL-15R $\alpha\beta\gamma$. Des résultats similaires sont obtenus sur les cellules NK et CD8⁺ primaires humaines en présence de l'anticorps A41. Ce résultat corrobore avec le fait que les cellules primaires NK et lymphocytes T CD8⁺ non-activées issues du sang périphérique n'expriment pas la chaîne IL-15R α (Pillet et al., 2009). En effet les cellules NK n'expriment la chaîne IL-15R α qu'après trois jours de culture en présence d'IL-2 (figure 43 partie II *trans*-présentation homotypique). Les résultats de résonance plasmonique de surface ont également montré que le NANTIL-15 ne se fixe pas à la chaîne IL-2/15R β ce qui concorde avec son inefficacité sur le récepteur IL2/15R $\beta\gamma$. Le test

d'inhibition de la *trans*-présentation de l'IL-15 par le NANTIL-15 lorsque celui-ci est présent dans la co-culture ou sur les cellules répondeuses Kit225 a montré qu'il n'est pas inhibiteur.

L'ensemble des résultats suggèrent la nécessité de la chaîne IL-15R α pour l'action du NANTIL-15. En effet un effet inhibiteur du NANTIL-15 sur la prolifération induite par l'IL-15 est observé sur les cellules transfectées avec la chaîne IL-15R α et non sur les cellules sauvages. Par ailleurs les tests de *trans*-présentation *in vitro* ont montré que le NANTIL-15 est inhibiteur seulement si les cellules présentatrices HEK-293R α sont prétraitées avec le NANTIL-15 avant la fixation de l'IL-15. En effet le NANTIL-15 se fixe sur la chaîne IL-15R α avec une haute affinité et celui-ci n'est pas décroché par l'IL-15 sauvage. A l'inverse le NANTIL-15 n'est pas compétitif avec l'IL-15 préalablement fixé à sa chaîne IL-15R α . L'effet antagoniste du NANTIL-15 *in vitro* est limité par la présence et la disponibilité de la chaîne IL-15R α . Afin de compléter ces études sur les cellules NK et CD8⁺ humaines, et de comprendre les mécanismes du NANTIL-15, il serait intéressant de comparer son effet inhibiteur sur les cellules primaires non-activées et les cellules primaires activées avec un stimulus inducteur de l'expression de la chaîne IL-15R α tel que l'IL-2 (Pillet et al., 2009). Ainsi l'expression de la chaîne IL-15R α sur ces cellules permettrait au NANTIL-15 d'inhiber la prolifération induite via le récepteur IL-15R $\alpha\beta\gamma$.

Notre étude de l'effet du traitement court et continu par le NANTIL-15 sur l'homéostasie des cellules NK et lymphocytes T CD8⁺ *in vivo*, a montré que NANTIL-15 n'affecte pas l'homéostasie des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺, quel que soit le type de traitement réalisé, alors que une déficience des cellules NK et un défaut d'activation et de survie des cellules T CD8⁺ est observé en absence d'IL-15 ou des chaînes IL-15R α ou IL-2/15R β (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998). L'analyse de la maturation de ces deux

populations cellulaires a montré que le NANTIL-15 n'affecte pas la maturation des cellules NK. En revanche, le traitement continu induit une diminution des lymphocytes T CD8⁺ centraux mémoires CD44⁺CD62L⁺. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules T CD8⁺ expriment plus fortement la chaîne IL-15R α comparés aux cellules naïves (Berard et al., 2003). Ces résultats sont en adéquation avec le fait que la *trans*-présentation de l'IL-15 *in vivo* joue un rôle primordial dans l'homéostasie des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ (Burkett et al., 2004; Huntington et al., 2009) et nos précédents résultats montrant l'incapacité de NANTIL-15 à inhiber la *trans*-présentation *in vitro*. Par ailleurs, la *cis*-présentation serait absente dans les conditions physiologiques car la sécrétion de l'IL-15 sous sa forme libre est fortement régulée (Bamford et al., 1996; Ogasawara et al., 1998; Onu et al., 1997). En conséquence, le NANTIL-15 ne semble pas agir dans ces conditions.

Le traitement des souris avec de l'IL-15 soluble exogène, en co-traitement avec le NANTIL-15 montre que le NANTIL-15 inhibe la prolifération des cellules NK induite par cette IL-15 *in vivo*. Ce résultat confirme que le NANTIL-15 est capable d'inhiber la forme libre de l'IL-15 qui agit potentiellement en *cis*-présentation. L'inhibition, du signal pSTAT-5 induit par l'IL-15 *in vivo*, par NANTIL-15 ou par H9-RETR-Fc4, un antagoniste de l'IL-2 agissant sur le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ (Mitra et al., 2015) est similaire, ce qui suggère que les cellules NK murines expriment l'IL-15R α permettant ainsi l'action du NANTIL-15. De plus, l'injection du NANTIL-15, 6 h avant l'IL-15 permettrait d'occuper les récepteurs IL-15R α libres et d'inhiber la *trans*-présentation de l'IL-15 exogène. Une étude précédente a montré le rôle des stimuli tels que le LPS ou le Poly:IC dans la production de l'IL-15 *in vivo* (Mattei et al., 2001). Il serait intéressant de compléter les résultats précédents par l'étude du rôle antagoniste du NANTIL-15 sur les effets de l'IL-15 induite par ces stimuli.

L'utilisation du NANTIL-15 permettrait également de différencier le rôle qu'occupe la *cis*-présentation de celui de la *trans*-présentation de l'IL-15 dans la réponse à un stimulus *in vivo*.

L'évaluation de l'effet thérapeutique du NANTIL-15 dans un modèle murin d'arthrite, a montré que le NANTIL-15 réduit de manière significative l'évolution de la pathologie. L'effet obtenu avec le NANTIL-15 est comparable à celui obtenu par l'antagoniste CRB15 qui inhibe le recrutement de la chaîne IL-2/15R γ (Ferrari-Lacraz et al., 2004). L'utilisation de l'AMG714 (HuMax-IL-15), un anti-IL-15 qui se fixe dans l'interface l'IL-15 avec l'IL-2/15R γ , chez les patients atteints d'arthrite, inhibe l'expression de CD69 induite par l'IL-15 et améliore les signes cliniques de l'arthrite (Baslund et al., 2005). Ces différentes études montrent que les deux stratégies d'inhibition par l'abrogation du recrutement de l'une des deux chaînes transductrices du signal IL-2/15R β ou IL-2/15R γ , sont efficaces dans ce modèle pathologique. Différents travaux ont décrit le rôle de l'IL-15 dans la sécrétion des anticorps par les lymphocytes B (Armitage et al., 1995; Gill et al., 2009) mais nos résultats n'ont montré aucun effet du NANTIL-15 sur la production d'auto-anticorps anti-collagène à J37, alors qu'une diminution de ces anticorps est observée lorsque les souris sont traitées avec la chaîne IL-15R α soluble neutralisant l'IL-15 soluble (Ruchatz et al., 1998). L'absence d'effet du NANTIL-15 pourrait s'expliquer par l'absence de la chaîne IL-15R α sur les lymphocytes B. Néanmoins un dosage antérieur à J37 pourrait mettre en évidence un retard ou une diminution de leur production.

L'analyse des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ spléniques, n'a également montré aucun effet du NANTIL-15 sur ces populations. Pour montrer l'effet du NANTIL-15, il serait intéressant de réaliser des expériences d'inhibition de prolifération des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ activées *in vitro* par le collagène de type II et transférées *in vivo* (Ferrari-Lacraz et al., 2004). L'analyse histologique de l'infiltrat immunitaire au niveau des tissus

inflammatoires montre une réduction de l'infiltrat des lymphocytes T CD8⁺ chez les souris traitées par le NANTIL-15. Les coupes histologiques montrent également que le NANTIL-15 protège de l'érosion et de l'infiltration des jonctions inter-phalangiennes. En effet la forme protéique de l'IL-15 est détectée dans le fluide et les membranes synoviales (McInnes et al., 1996b; Wilkinson and Liew, 1995) et serait responsable du recrutement et de l'activation des lymphocytes T dans le site inflammatoire chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (McInnes et al., 1996c). L'effet du NANTIL-15 au niveau local est également équivalent à celui du CRB-15 induisant également la réduction de l'infiltrat de cellules T CD8⁺ (Ferrari-Lacraz et al., 2004) ainsi que dans d'autres modèles comme le rejet de greffe du cœur (Zheng et al., 2006). L'effet thérapeutique du NANTIL-15 mis en évidence par la réduction de l'arthrite suggère le rôle de la surexpression de la chaîne IL-15R α et le rôle de la *cis*-présentation de l'IL-15 dans ce modèle. En effet, la signalisation de l'IL-15 par la chaîne IL-15R α sur les cellules T CD8⁺ serait impliquée dans l'activation des ostéoclastes (Djaafar et al., 2010) et sa surexpression a été observée dans d'autres modèles pathologiques tels que le diabète de type I (Chen et al., 2014). Il serait nécessaire d'étudier l'expression de l'IL-15 et de l'IL15R α dans ce modèle d'arthrite pour comprendre le mécanisme du NANTIL-15.

En résumé, l'étude *in vitro* a montré que le NANTIL-15 inhibe spécifiquement la prolifération induite par l'IL-15 mais il est conditionné par la présence et la disponibilité de la chaîne IL-15R α sur les cellules. Nos études *in vivo* ont également montré que le NANTIL-15 n'affectait pas l'homéostasie des cellules NK et des cellules T CD8⁺, mais est capable d'inhiber leur prolifération dans un contexte de surexpression de l'IL-15 soluble. Le NANTIL-15 réduit localement l'infiltrat de lymphocytes T CD8⁺ dans lesquels l'IL-15 est potentiellement augmentée. La différence d'effet du NANTIL-15 entre le contexte inflammatoire et l'état physiologique peut être expliquée par (**figure 33**) :

- ✓ L'effet inhibiteur du NANTIL-15 sur la forme libre de l'IL-15 sécrétée durant l'inflammation.
- ✓ La surexpression de la chaîne IL-15R α par les cellules cibles permettant l'action inhibitrice du NANTIL-15.

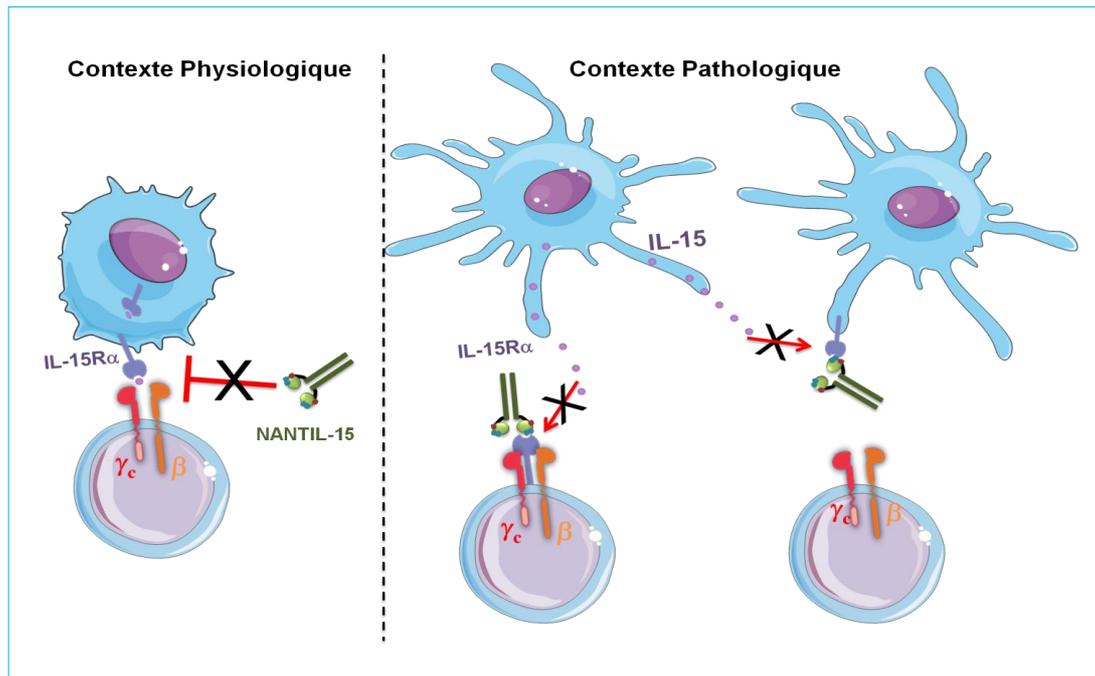


Figure 33 : Modèle hypothétique du mode d'action du NANTIL-15. Dans le contexte physiologique (**gauche**), le NANTIL-15 n'inhibe pas la trans-présentation de l'IL-15 et n'influence pas l'homéostasie des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺. Dans un contexte pathologique (**droite**) les cellules NK et CD8⁺ exprimeraient plus fortement la chaîne IL-15R α à leur surface et permettraient ainsi au NANTIL-15 d'inhiber l'IL-15. Le NANTIL-15 se fixerait également à l'IL-15R α exprimée par les cellules présentatrices et empêcherait ainsi la *trans*-présentation de l'IL-15 libre surexprimée durant l'inflammation.

La stratégie d'inhibition des effets de l'IL-15 par le ciblage du recrutement de la chaîne IL-2/15 β est efficace. La préservation de l'interaction à la chaîne IL-15R α et la spécificité d'action sur la *cis*-présentation et non sur la *trans*-présentation constituent de sérieux atouts pour le NANTIL-15 qui inhibe l'action «inflammatoire» sans altérer l'action «homéostatique» de l'IL-15. En revanche le NANTIL-15 n'aurait pas d'effet dans les étapes précoces de l'inflammation, avant l'induction de la chaîne IL-15R α .

B. BiG : inhibiteur du récepteur IL-2/15R $\beta\gamma$

1. Stratégie d'inhibition

Afin de s'affranchir de la dépendance du NANTIL-15 à la chaîne IL-15R α , nous avons développé un second antagoniste nommé BiG « IL-2/15R $\beta\gamma$ inhibiteur ». BiG est un polypeptide mutant de l'IL-15, lié au domaine sushi du récepteur soluble IL-15R α via un linker (**figure 34**). La liaison de ce mutant à la chaîne IL-15R α , lui permet de se fixer avec une haute affinité et de cibler uniquement le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ (**figure 35**). Un résidu glutamine en position 108 est substitué par un acide aspartique (Q108D) se trouvant dans l'interface d'interaction de l'IL-15 avec la chaîne IL-2/15R γ (**figure 16**). Cette mutation abroge le recrutement de la chaîne IL-2/15R γ (**figure 34**).

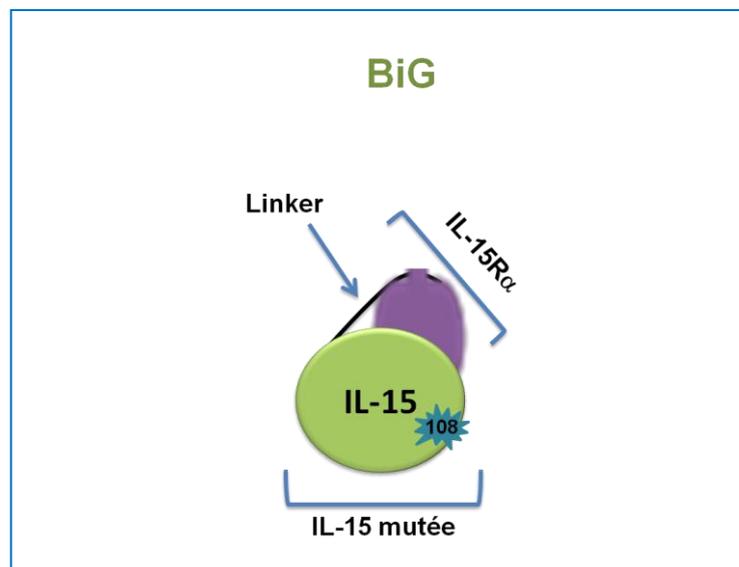


Figure 34 : Schéma de la composition de l'antagoniste BiG : l'antagoniste BiG est composé d'une molécule d'IL-15 mutée reliée au domaine Sushi du récepteur spécifique de haute affinité IL-15R α via un linker. La mutation de l'IL-15 est en position Q108D.

La chaîne IL-15R α augmente l'affinité de l'IL-15 avec la chaîne IL-2/15R β et d'autre part la mutation en position 108 est située dans l'interface d'interaction de l'IL-15 avec la chaîne IL-2/15R γ (**figure 16**) et empêche le recrutement du récepteur IL-15R γ (**figure 35**).

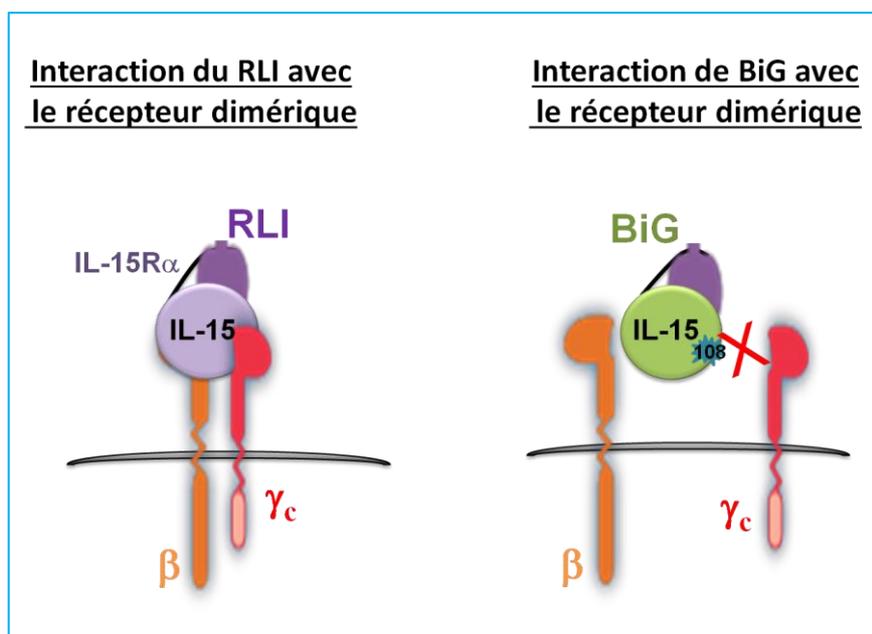


Figure 35: Mode d'action de BiG. BiG se fixe au récepteur dimérique IL-15R $\beta\gamma$ de la même manière que le RLI. La mutation Q108D empêche la transduction du signal via la chaîne IL-2/15R γ .

2. Article

Fine-Tuning of IL-2 and IL-15-Dependent Effector Cell Functions Toward Tolerance

Dihia Meghnam¹, Sébastien Morisseau^{1,2}, Kilian Trillet¹, Mike Maillason¹, Marie Frutoso¹, Isabelle Barbieux¹, Sarah Khaddage¹, Markus Hidlinger³, Agnès Quémener¹, Yannick Jacques¹, and Erwan Mortier^{1,*}

¹ CRCNA, CNRS, Inserm, University of Nantes ² CHU, Nantes Hospital, France ³ Evitria Company, Switzerland

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Interleukin (IL)-2 and IL-15 are two closely related cytokines, involved in the development, activation and proliferation of immune cells and being important actors in inflammatory and auto-immune diseases. They share in common the heterodimeric CD122/CD132 receptor to deliver their signals within target cells. The specificity of action of both cytokines is conferred by their IL-2R α and IL-15R α receptor chains. By combining an increased affinity for CD122 and an impaired recruitment of CD132, we have generated an original molecule named BiG, targeting the CD122/CD132 dimeric receptor. BiG efficiently inhibited IL-15 and IL-2 dependent effector functions of human and murine primary cells, including CD8 T and NK cells. We also report a differential dynamic of action of these cytokines by highlighting a major role played by the IL-2R α receptor (CD25). Interestingly, due to the action of the IL-2R α receptor, BiG had no impact on IL-2 dependent regulatory functions (T-reg) and improved graft survival in a skin transplantation model. Thus BiG is acting as an effector/regulator switch in the immune system, a unique property that emphasizes its interest to favor immune tolerance.

IL15 | IL2 | CD25 | T-reg | IL-15 trans-presentation

Introduction

IL-2 and IL-15 are two cytokines belonging to the family sharing the common gamma chain receptor and known to drive the *in vitro* proliferation and cytolytic activity of effector cells including T and NK cells. To deliver their signals, IL-2 and IL-15 bind a common heterodimeric receptor composed of the IL-2/15R β (CD122) and common γ (γ c or CD132) chains. The specificity of action of both cytokines is conferred by their corresponding alpha receptor chain, IL-2R α (CD25) and IL-15R α (CD215) (1). IL-2 has first been developed in therapy at high doses to boost the cytotoxic activity of immune effector cells against tumor cells. However, its use has been limited by the incidence of serious adverse toxic effects (2). Subsequent IL-2 knock out studies in mice and the discovery of regulatory T (T-reg) cells expressing high levels of CD25 have then indicated that IL-2's dominant function *in vivo* is to restrain T cell activation by selectively activating with high affinity the proliferation and function of CD25+ T-regs (3). This led to the rationale of low dose IL-2 treatment to induce tolerance, with recent promising results in the therapy of autoimmune and inflammatory diseases (4). IL-15-deficient mice, in sharp contrast to IL-2-deficient mice, exhibit mainly selective loss of NK cells, memory phenotype CD8 T cells and NK-T cells (5, 6). Regarding IL-15, detection of the protein is largely limited to antigen presenting cells, revealing a tight regulation of IL-15 expression (7). Indeed, IL-15 has been hypothesized to sit at the apex of a pyramid of pro-inflammatory cytokines and its uncontrolled expression would indeed result in the induction of autoimmunity (8). IL-15 also differs from IL-2 in its mode of action. Both cytokines can act in a classical mode, in which they bind in a soluble form to the shared CD122/CD132 dimeric receptor with an intermediate affinity, or they bind with high affinity to their specific trimeric receptor composed of CD122, CD132 and IL-2R α or IL-15R α . However, the dominant mechanism by which IL-15 delivers its signal is an original mechanism called

trans-presentation where membrane-anchored IL-15R α on APCs presents IL-15 in *trans* to CD122/CD132 dimers on neighboring NK and T cells (9). IL-15 is thus considered as an attractive agent to boost immune cells against cancer, with the advantage over IL-2 to elicit lower toxicity and spare T-reg induction (10).

Numerous strategies have been developed by academic and industrial entities to thwart IL-2 and IL-15 activation pathways with the aim to modulate T and NK cell activation, and to induce tolerance (11, 12). Soluble cytokine receptors naturally regulate cytokine functions. Our laboratory showed that soluble IL-15R α (sIL-15R α), generated by proteolytic cleavage, could act either as a potent antagonist on cell expressing the trimeric IL-15R α /CD122/CD132 receptor (13) or could potentiate IL-15 action, by reinforcing IL-15 binding capacity on the CD122/CD132 dimeric receptor (14). Cytokine activities could also be modulated by specific antibodies. For example, IL-2 associated with specific anti-IL-2 antibodies could preferentially stimulate expansion of Treg (JES6-1) or effector (S4B6) cells (15). Interestingly, JES6-1 antibody sterically blocked IL-2 interactions with CD122 and CD132 chains, but also allosterically increased the affinity of IL-2 for IL-2R α , therefore favoring T-reg expansion (16). The affinity of IL-2 and IL-15 for their receptor chains were also modified by molecular engineering. Initial site directed mutagenesis studies described cytokine variants with limited ranges of action (17, 18). However, a new class of muteins appeared by combining different types of mutations to generate "receptor signaling clamps" (19).

In this study, we have generated an original molecule targeting the CD122/CD132 dimeric receptor. On one hand, IL-15

Significance

Interleukin (IL)-2 and IL-15 are two crucial players of the immune system involved in inflammatory and auto-immune diseases. They share the CD122/CD132 receptor to deliver their signals within target cells. The specificity of action is conferred by their IL-2R α and IL-15R α receptor chains. While IL-15 is implicated in the development and activation of immune effector cells, IL-2's dominant function is to restrain cell activation by supporting regulatory T cells (T-reg). We have generated an original molecule, called BiG, that efficiently blocked signaling within effector cells through the CD122/CD132 receptor. Interestingly, we found that BiG inhibitory action was impaired by IL-2R α expressed by T-reg cells. Thus, BiG presents a unique property as an effector/regulator switch in the immune system favoring tolerance.

Reserved for Publication Footnotes

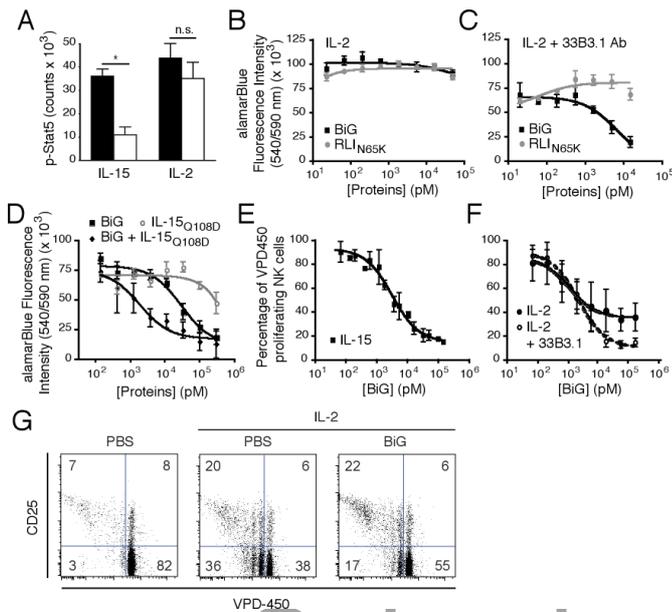


Fig. 3. IL-2R α impairs BiG inhibition of IL-2 signaling. (A) Inhibition assay of IL-15- and IL-2-induced Stat5 phosphorylation within Kit225 cells treated with BiG (white bars) for 1 h or not (black bars), revealed by alpha screen technology. (B) Proliferation assay of Kit225 cells cultured with a fixed concentration of IL-2 (80 pM) and increasing concentrations of BiG or RLI_{N65K}. (C) Proliferation assay of Kit225 cells cultured with a fixed concentration of IL-2 (80 pM) and 33B3.1 anti-CD25 mAb (66 nM) and increasing concentrations of BiG or RLI_{N65K}. (D) Proliferation assay of Kit225 cells cultured with a fixed concentration of IL-15 (40 pM) and increasing concentrations of BiG and/or IL-15_{Q108D}. (E) The proliferation of NK cells from human PBMCs was evaluated by flow cytometry. Isolated VPD-450-labeled PBMCs were cultured with a fixed concentration of IL-15 or (F) IL-2 in the presence or in the absence of 33B3.1 anti-CD25 mAb and increasing concentrations of BiG. NK cells were identified as CD3- NKp46+ cells. (G) IL-2-induced proliferation of CD4 T cells was evaluated by VPD-450 dilution over CD25 expression in the presence or in the absence of BiG. All data are representative of at least two separate experiments. Standard errors are shown on bar graphs. n.s., not significant; * $P < 0.05$.

S2A), with an IC₅₀ of 5 nM. No inhibitory activity of RLI_{N65K} was observed (Fig. 2A, 2B and S2A), reinforcing the interest of targeting CD132 recruitment, instead of CD122 recruitment.

Moreover, IL-15 *trans*-presentation by IL-15R α transfected Hela cells to CD122/CD132 on Kit225 cells was significantly abrogated by BiG revealing its potency to inhibit IL-15 signaling even during cell-cell interaction (Fig. 2C and S2B). By contrast, and most importantly, IL-15_{Q108D} was unable to exert such inhibitory effect (Fig. 2C), highlighting the importance of the increased affinity of BiG over IL-15_{Q108D} for targeting the CD122/CD132 dimer and exerting an inhibitory action.

To test BiG efficiency on IL-2 signaling through CD122/CD132 dimeric receptor, we used TF-1 β cells that express CD122 and CD132 but not IL-2R α . BiG efficiently inhibited IL-2-dependent TF-1 β cell proliferation with an IC₅₀ of 3 nM (Fig. 2D), a value similar to that observed for the inhibition of RLI-dependent TF-1 β proliferation (Fig. S2A) and comparable to that observed for the IL-2 variant H9-RETR antagonizing IL-2 and IL-15 with an IC₅₀ of around 5 nM (19). Then, we extended our analysis to human primary cells. VPD-450 labeled PBMCs were stimulated with IL-15 or IL-2 in the presence of BiG. We found that CD8 T cell proliferations in response to IL-15 and IL-2 were both inhibited by BiG (Fig. 2E, S2C and S2D).

The inhibitory efficiency of BiG was further confirmed *in vivo*. When BiG was administrated into mice prior to injection of wt.RLI, the level of Stat5 phosphorylation within splenic NK cells

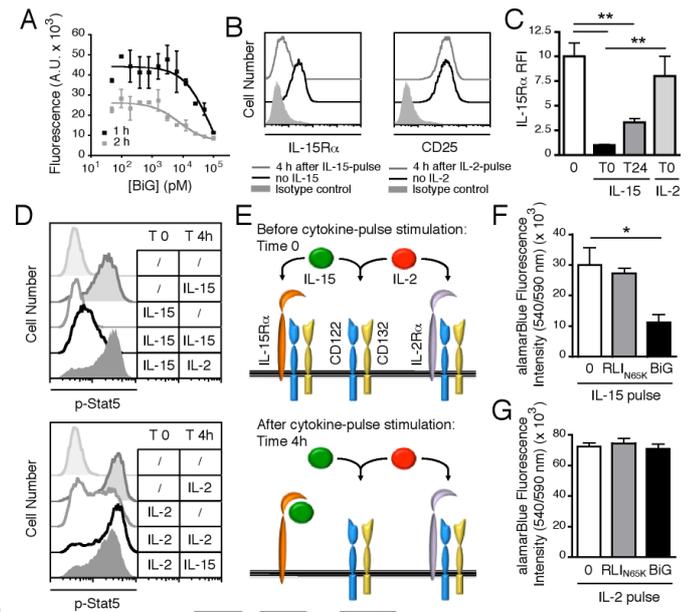


Fig. 4. Different dynamics of IL-2 and IL-15 signaling through trimeric receptors. (A) Dose response of increasing concentrations of BiG, for 1 or 2 h, on Stat5 phosphorylation within Kit225 cells, revealed by alpha screen technology. (B) Kit225 cells were incubated either with 1 nM of IL-15 or IL-2 for 30 min, washed, and cultured in cytokine-free medium for 4 h or (C) 24 h. Receptor alpha chains expression were evaluated by blocking M165 anti-IL-15R α (B, left panel and C) and 33B3.1 anti-CD25 mAb (B, right panel). (D) Four hours after initial stimulation, cells were re-stimulated with IL-15 (2.5 pM, top panel) or IL-2 (25 pM, bottom panel), and p-Stat5 expression was analyzed 30 min later by flow cytometry. (E) Proposed model of the different expression state of receptor chains for initial or re-stimulation with IL-15 or IL-2. (F) Proliferation of NK-92 cells was evaluated by alamarBlue assay. NK-92 cells were incubated either with 1 nM of IL-15 or (G) IL-2 for 30 min, washed, and cultured in the presence or in the absence of BiG or RLI_{N65K} for 24 h. Data are representative of at least two separate experiments. Standard errors are shown on bar graphs. n.s., not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

and CD8 T cell was found to be reduced as compared to that of NK cells from untreated mice (Fig. 2F and S2E). Thus, IL-2 and IL-15 signaling through the CD122/CD132 dimeric receptor was efficiently inhibited by BiG *in vitro* and *in vivo*.

IL-2R α impairs BiG inhibition of IL-2 signaling through its IL-2R α /CD122/CD132 trimeric receptor. To address the question whether IL-2R α and IL-15R α chains could impact the blocking effect of BiG, we again took advantage of Kit225, NK-92 and TF-1 β cells that respond to exogenous IL-2 and IL-15 through their specific trimeric receptor (IL-2R α /CD122/CD132 for IL-2 and IL-15R α /CD122/CD132 for IL-15; *cis*-presentation). Surprisingly, IL-15-induced, but not IL-2-induced, Stat5 phosphorylation in Kit225 cells was inhibited by BiG (Fig. 3A). Accordingly, BiG left IL-2-induced cell proliferation unaffected (Fig. 3B and S3B). Interestingly, an inhibitory activity of BiG on IL-2-induced cell proliferation was revealed when adding an antibody (33B3.1) that blocks IL-2 binding to CD25, suggesting that the presence of IL-2R α precluded BiG inhibitory action (Fig. 3C and S3C). In both assays, RLI_{N65K} was inactive (Fig. 3B and 3C). One possible explanation is that pre-formation of IL-2R α /CD122 complexes on resting T cells (20), may impede the binding of BiG to CD122 by an allosteric conformational change. These observations are in accordance with the results obtained with anti-CD122 antibodies (MiK-beta-1 or A41) that inhibits Kit225 proliferation only when a blocking anti-IL-2R α antibody (anti-Tac and 33B3.1, respectively) was simultaneously present (21, 22).

BiG inhibited IL-15-induced cell proliferation, with an IC₅₀ of 30 nM, 6-fold higher than that of RLI-induced proliferation.

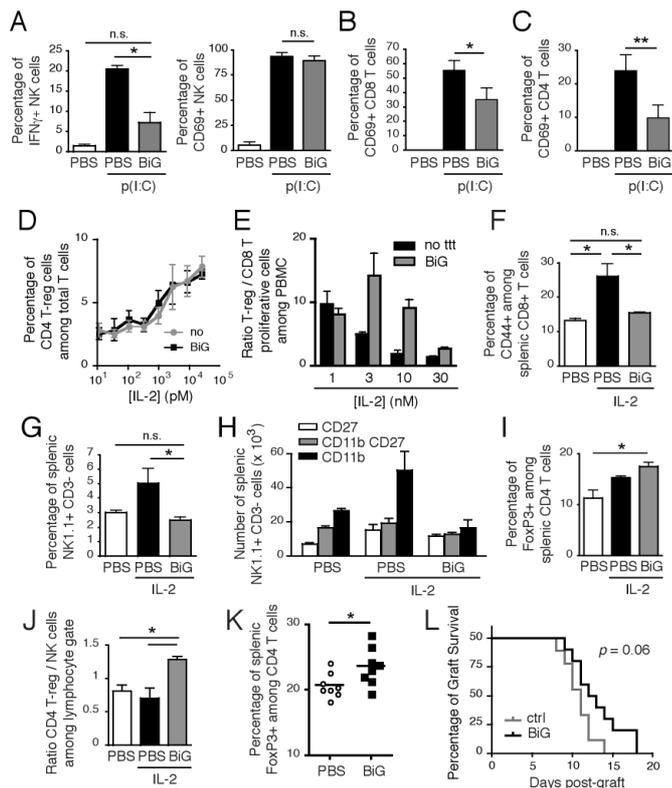


Fig. 5. Inhibition of CD122/CD132 dimeric receptor by BiG promotes tolerance over effector functions. (A) Mice were treated or not with BiG prior to administrating poly(I:C). NK cells in the blood from mice were analyzed for IFN γ and CD69 expression by flow cytometry. (B) Analysis of CD69 expression on CD8 and (C) CD4 T cells in the blood from mice treated as indicated. (D) Percentage of FoxP3+ CD25+ CD4 T cells among total CD4 T cells from human PBMCs was analyzed by flow cytometry. (E) Ratio of proliferative CD4 regulatory T-cells over CD8 T cells among human PBMCs stimulated with indicated concentrations of IL-2 in the presence or in the absence of BiG. (F) Splenic CD44+ CD8+ T cells or (G) CD3- NK1.1+ NK cells from mice treated as indicated were analyzed by flow cytometry. (H) Numbers of splenic NK cells at the indicated stages of maturation from mice treated as indicated. (I) Splenic FoxP3+ CD25+ CD4 T cells were analyzed by flow cytometry and (J) graph showing the ratio of CD4 regulatory T-cells over NK cells among lymphoid gate. (K) Twenty weeks old mice were treated with BiG and splenic FoxP3+ CD25+ CD4 T cells were analyzed. (L) Skin from Balb/c mice was grafted to DBA/2 recipient mice. Mice (n = 10, per conditions) were treated daily with 10 μ g of BiG and graft survival was monitored. Data are representative of at least two separate experiments including at least 3 mice per conditions. Standard errors are shown on bar graphs. n.s., not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Immobilized capture ligand Soluble interacting ligand

Moreover, we found that blocking IL-15 α by IL-15_{Q108D} enhanced BiG inhibitory activity (Fig. 3D and S3A). This indicates that BiG inhibitory activity was slightly impaired in the context of the trimeric receptor, and therefore that the presence of IL-15 α could affect its inhibitory action. That mechanism is distinct from the inhibition of IL-15 signaling by the Mik- β -1 anti-CD122 antibody that has been shown to block IL-15 *trans*-presentation, but not the action of IL-15 *cis*-signaling through the heterotrimeric receptor (23).

We extended our analysis to human primary cells. IL-15-induced NK cell proliferation was fully abrogated in the presence of BiG with an IC₅₀ of 5 nM similar to that observed on RLI stimulation of Kit225 cells through CD122/CD132, suggesting that in the context of human PBMCs, IL-15 was acting mostly through CD122/CD132 dimeric receptor on NK cells (Fig. 3E). By contrast, IL-2-induced NK cell proliferation was only partially inhibited by BiG, with a high degree of variability among ex-

periments. However, when the blocking anti-CD25 33B3.1 mAb was added to the culture, IL-2-induced NK cell proliferation by BiG was fully efficient, with a similar IC₅₀ as for inhibition of IL-15-induced proliferation (Fig. 3F). These results confirm the impairment of BiG action by IL-2 α and also suggest that within PBMCs, IL-2 α is expressed on a subset of NK cells. Accordingly to what observed previously, BiG inhibited the IL-2-induced proliferation of CD4 CD25- T cells, but not that of CD25 expressing conventional CD4 T cells (Fig. 3G, S4A and S4B). Taken together, these results indicate that BiG was less efficient in the context of the trimeric receptor, and therefore that the presence of IL-15 α can also affect its inhibitory action, although not as dramatically as IL-2 α .

IL-2 α and IL-15 α drive different dynamics of IL-2 and IL-15 signaling. IL-15 α binds IL-15 with high affinity (K_d = 100 pM), whereas isolated IL-2 α is a low affinity receptor for IL-2 (K_d = 10 nM) (1). To analyze how IL-15 α affects BiG inhibition of IL-15-induced signaling, we took advantage of the fact that Kit225 cells respond first to IL-15 through the IL-15 α /CD122/CD132 trimer, and then, after IL-15 α internalization, through CD122/CD132 (24). In a kinetic analysis of p-Stat5 induction, the IC₅₀ of BiG was found to decrease by 10-fold with time, from 75 nM at 1 h to 7.5 nM at 2 h (Fig. 4A), indicating that IL-15 α internalization reinforced BiG efficiency.

To further understand the differential susceptibility of IL-15 vs IL-2 signaling to inhibition by BiG, we analyzed the regulation of IL-15 α and IL-2 α at the cell surface of Kit225 cells following a transient cytokine treatment. We found that 4 h and even 24 h after a 30 min pulse with IL-15, IL-15 α chains were still occupied (as seen by the absence of binding of the blocking M165 mAb) (Fig. 4B, left and 4C). By contrast, IL-2 α re-expressed after a similar IL-2 pulse was fully accessible to exogenous IL-2 (as seen by the binding of the blocking 33B3.1 mAb) (Fig. 4B, right). Accordingly, an initial IL-15-pulse markedly dampened the p-Stat5 response upon re-stimulation by IL-15, but not by IL-2 (Fig. 4D, top panel). By contrast, an initial IL-2 pulse did not affect the response on re-stimulation either by IL-2 or IL-15 (Fig. 4D, bottom panel), suggesting a rapid and functional IL-2 α turn over to the cell surface (25). Then, we analyzed the metabolic activity of NK-92 cells 24 h after an IL-2 or an IL-15-pulse stimulation. According to what observed before, BiG efficiently inhibited IL-15-induced metabolic activity (Fig. 4F) whereas no inhibitory effect was observed in the IL-2 pulse (Fig. 4G). In both assays, RLI_{N65K} was inactive. These results suggest that IL-2 signaling is more dependent on the availability of IL-2 α than IL-15 for IL-15 α . They also suggest that the initial IL-15-pulse, by sequestering the IL-15 α chain, switched the second IL-15 stimulation mainly through CD122/CD132 dimer, allowing BiG inhibitory action (Fig. 4E).

Inhibition of CD122/CD132 dimeric receptor by BiG limits cell activation and promotes tolerance. IL-15 and IL-15 α are induced during inflammation. To further describe the potency of BiG to inhibit inflammation related cell activation, poly(I:C) was administrated to mice (26). IFN γ expression by NK cells from poly(I:C) stimulated mice was significantly impaired by BiG, without affecting CD69 expression at the cell surface (Fig. 5A). However, CD69 expression was decreased on CD8 and CD4 T cells when BiG was injected together with poly(I:C) (Fig. 5B and 5C). Thus, TLR stimulation *in vivo* requires CD122/CD132 dimeric receptor for supporting NK and T cells activation and is inhibited by BiG.

IL-15 α is broadly expressed independently of CD122 and CD132, whereas IL-2 α expression is restricted mainly to CD4 regulatory T cells (T-reg) and activated T cells. Accordingly to our observations, enrichment by IL-2 of CD4 T cells in FoxP3+ positive cells from human PBMCs was not affected by BiG (Fig. 5D). As a net result, BiG treatment shifted the T-reg over CD8 T

cell ratio in favor of T-regs (Fig. 5E), highlighting its potential in the promotion of tolerance.

In order to evaluate BiG efficiency *in vivo*, BiG was administered in mice together with IL-2. As expected, IL-2 injection led to an increase of CD44⁺ CD8⁺ T and NK cells that was completely abrogated by BiG (Fig. 5F and 5G). Moreover, by studying NK cell maturation, we found that the CD11b⁺ CD27⁻ mature NK cell population was dramatically decreased (Fig. 5H). Interestingly, the CD4⁺ T-reg population was not inhibited but even promoted by BiG when injected together with IL-2 (Fig. 5I), leading to a balance in favor of T-reg cells over NK cells in wild-type mice (Fig. 5J), confirming the results obtained with human PBMCs. This observation is in line with the idea that IL-2's availability can regulate the function of adaptative-innate lymphocyte cross talk (27). Interestingly, high amount of T-reg cells were found within aged mice (28), and injection of BiG by itself significantly enhanced splenic T-reg population (Fig. 5K).

Regulatory T cells prevent allogeneic graft rejection by inhibiting T cell activation. Low-dose IL-2 alone was inefficient in preventing rejection. However, combined with rapamycin, an immunosuppressive drug that prevents the activation of T and B cells efficiently prevented allogeneic skin graft rejection (29). Thus, we wondered whether BiG, that favors by it-self tolerance over cell activation, could present a potential therapeutical benefit using a transplantation model in which skin from Balb/c mice was grafted to DBA/2 recipient. We found that all untreated mice rejected the allogeneic skin graft by day 14. However, a daily treatment with BiG post-graft resulted in an increase of graft survival (Fig. 5L), supporting the idea that BiG could favor tolerance.

In summary, by targeting the common CD122/CD132 receptor, shared by IL-2 and IL-15, we have generated an original molecule, that we named BiG, which combines both increased affinity for CD122 and impaired recruitment for CD132. We showed that BiG efficiently blocked IL-15 *trans*-presentation as well as IL-2 signaling through CD122/CD132 heterodimeric receptor expressed on both human and murine primary cells. In consequence, BiG significantly decreased poly(I:C)-induced NK and T cell activations. However, IL-2R α expression fully impaired BiG inhibition of IL-2 action through IL-2R α /CD122/CD132 heterotrimeric receptor expressed mainly by regulatory T cells. Thus, BiG acts as an effector/regulator switch in the immune system. Accordingly, BiG improved graft survival in a skin transplantation model. Taken together, these findings extend our understanding of the differential modes of action between IL-2 and IL-15, and highlight how, while sharing the CD122/CD132 receptor, they elicit so different immune actions. Moreover, targeting the shared

CD122/CD132 dimeric receptor represents a promising strategy in order to favor immune tolerance.

Materials and Methods

Cell lines, recombinant proteins and antibodies

The Kit225, NK92 and TF-1 β (30) cell lines were used in that study. Healthy donor blood samples were collected from the French blood bank (Etablissement Français du Sang (EFS)). Recombinant 6xHis tagged hIL-15, Fc-hIL-15R α -sushi, wt.RLI, IL-15_{Q108D}, BiG and RLI_{N65K} were produced by Evitria Company (Switzerland). Anti-CD122 (CF-1) antibody was obtained from Beckman Coulter and anti-CD25 33B3.1 antibody was described previously (31). See *SI Material and Methods*.

Molecular Modeling

The structure of IL-15 in complex with CD122/CD132 was extracted from the X-ray crystallographic structure of the human tetrameric complex of IL-15/IL-15R α /CD122/CD132 published by Ring *et al* (32, Protein Data Bank code 4GS7). The structure model of the mutated fusion protein "BiG" was obtained starting from the model of RLI previously described (33). The RLI structure model was prepared using the Prepare Protein tool of Discovery Studio 4.0 (DS4.0) of Accelrys with the CHARMM Polar H forcefield, and residue Q108 was then mutated in D using the Build Mutants tool of DS 4.0. See *SI Material and Methods*.

Surface Plasmonic Resonance studies

The SPR experiments were performed with a BIAcore 3000 biosensor (BIAcore, Uppsala, Sweden). Recombinant proteins (hCD122, hCD132, Fc-IL-15R α) were covalently linked to CM5 sensor chips, and the binding of increasing concentrations of ligands (IL-15, IL-15_{Q108D}, RLI, BiG, RLI_{N65K}) was monitored. Analysis of sensorgrams was performed using BIAlogue kinetics evaluation software.

Flow cytometry

Analyses of Stat5 and Stat3 phosphorylations were performed following the protocol of the manufacturer using Lyse/Fix Buffer and Perm Buffer III (BD Biosciences). FoxP3 staining was performed following the protocol outlined in the Foxp3 kit (eBioscience). Samples were acquired on an 8-colors FACS Canto II cytometer (BD bioscience). Analyses were performed using FlowJo software 9.9 (Beckman Coulter). For Proliferation assay of human PBMC, cells were isolated on a Ficoll gradient and stained with BD Horizon™ Dye 450 (VPD-450, BD Biosciences). See *SI Material and Methods*.

In vivo models

C57BL/6, Balb/c, and DBA/2 mice were purchased from the Janvier Laboratory. All mice were usually used between the age of 6 and 12 weeks. All animal experiments were approved by the Regional Ethics Committee in Animal experimentation (Pays de la Loire, France) and performed according to European Union Guidelines (authorization number no. B44-278). See *SI Material and Methods*.

Acknowledgments

We thank Averil Ma and Barbara Malynn for critically reading this manuscript, and Impact, UTE, CytoCell facilities for technical assistance. This work was supported by CNRS, Inserm, Inserm Transfert (R13079NS) and was realized in the context of the IHU-Cesti (ANR-10-IBHU-005) project which received French government financial support managed by the National Research Agency and supported by Nantes Métropole and Pays de la Loire Region. DM was supported by a specific thesis allocation from the IHU-Cesti. The authors have no conflicting financial interests. **Abbreviations** BiG, IL-2R β /gamma (CD122/CD132) inhibitor; RLI, IL-15R α -Linker-IL-15; T-reg, regulatory T cell.

- Ma A, Koka R, Burkett P (2006) Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 24:657-67
- Siegel JP, Puri RK (1991) Interleukin-2 toxicity. *J. Clin. Oncol.* 9(4):694-704.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155(3):1151-1164.
- Klatzmann D, Abbas AK (2015) The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 15(5):283-294.
- Lodolce JP, *et al.* (1998) IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9(5):669-676.
- Kennedy MK, *et al.* (2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191(5):771-780.
- Grabstein (1994) Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 264(5161):965-8.
- Waldmann et Tagaya. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* (1999) vol. 17 pp. 19-49
- Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y (2002) IL-15R α recycles and presents IL-15 in *trans* to neighboring cells. *Immunity* 17(5):537-547.
- Waldmann TA (2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6(8):595-601.
- Waldmann TA (2004) Targeting the interleukin-15/interleukin-15 receptor system in inflammatory autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* 6(4):174-7.
- Waldmann TA (2002) The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. *J. Clin. Immunol.* 22(2):51-6.
- Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y (2004) Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J. Immunol.* 173 (3):1681-8.
- Mortier E, *et al.* (2006) Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R α)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R β /gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R α fusion proteins. *J Biol Chem* 281(3):1612-1619.
- Boymann O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J (2006) Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science.* 311(5769):1924-7.
- Splangler JB, *et al.* (2015) Antibodies to Interleukin-2 Elicit Selective T Cell Subset Potentiation through Distinct Conformational Mechanisms. *Immunity.* 42(5):815-825.
- Bernard J, *et al.* (2004) Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *J. Biol. Chem.* 279(23):24313-24322.
- Pettit DK, *et al.* (1997) Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J. Biol. Chem.* 272, 272(4):2312-2318.
- Mitra S, *et al.* (2015) Interleukin-2 activity can be fine tuned with engineered receptor signaling clamps. *Immunity* 42(5):826-838.
- Damjanovich S, *et al.* (1997) Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(24):13134-13139.
- Tsuda M, Kitamura F, Miyasaka M, (1989) Characterization of the interleukin 2 receptor β chain using three distinct monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:1982-1986.

681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748

22. Francois C, Boeffard F, Kaluza B, Weidle UH, Jacques Y. (1993) Construction of a bispecific antibody reacting with the beta chain of human IL-2 receptor. Inhibition of IL-2 activity by cross-linking and high anti-proliferative efficiency. *J. Immunol.* 150(10):4610-4619.

23. Waldmann T, et al. (2013) Phase 1 trial of IL-15 trans presentation blockade using humanized Mik-Beta-1 mAb in patients with T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Blood.* 121:476-84.

24. Perdreau H, et al. (2010) Different dynamics of IL-15R activation following IL-15 cis- or trans-presentation. *Eur Cytokine Neww* 21(4):297-307.

25. Hemar A, et al. (1995) Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. *J. Cell. Biol.* 129(1):55-64.

26. Mortier E, Woo T, Advincula R, Gozalo S, Ma A (2008) IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 205(5):1213-1225.

27. Gasteiger G, et al. (2013) IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 210(6):1167-1178.

28. Lages CS, et al. (2008) Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote resolution of acute infection. *J. Mol. Biol.* 381(2):485-498.

29. Pilon CB, et al. (2014) Administration of Low Doses of IL-2 Combined to Rapamycin Promotes Allogeneic Skin Graft Survival in Mice. *Am. J. Transplant.* 14(12):2874-2882.

30. Farner N, et al. (1997) Alteration of the CD34+ TF-1 beta cell line profile in response to long-term exposure to IL-15. *Cytokine.* 9(5):316-327.

31. Jacques Y, et al. (1986) Regulation of interleukin 2 receptor expression on a human cytotoxic T lymphocyte clone, synergism between alloantigenic stimulation and interleukin 2. *J. Immunol.* 136(5):1693-1699.

32. Ring AM, et al. (2012) Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol* 13(12):1187-1195.

33. Bouchaud G, et al. (2008) The exon-3-encoded domain of IL-15Ralpha contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15Ralpha. *J. Mol. Biol.* 382(1):1-12.

749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816

Submission PDF

IL-15 mutée/IL-15R α , ciblant le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$. Par la technique de résonance plasmatique de surface nous avons montré que l'affinité de BiG pour la chaîne IL-15R β est augmentée par la chaîne IL-15R α comparée à celle de l'IL-15_{Q108D} seul et que la mutation Q108D atténue sa liaison à la chaîne IL-15R γ . Une stratégie similaire a été utilisée pour le développement de plusieurs antagonistes de l'IL-2 (dont H9-RETR), en renforçant la liaison de l'IL-2 à la chaîne IL-2/15R β et abrogeant la liaison à la chaîne IL-2/15R γ par plusieurs mutations dont une en position Q126T, qui est équivalente à la mutation Q108D dans la structure de l'IL-15 (Mitra et al., 2015).

La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec l'antagoniste de l'IL-2, montrent que le ciblage du récepteur IL-2/15R $\beta\gamma$ ne permet pas de discriminer entre les deux cytokines IL-2 et IL-15. Les deux antagonistes inhibent la signalisation et la prolifération induite par les deux cytokines via le récepteur dimérique. En revanche, contrairement à l'antagoniste H9-RETR (Mitra et al., 2015), l'inhibition de l'IL-2 par BiG est dépendante de l'expression de la chaîne IL-2R α sur les cellules. En effet, BiG inhibe l'action de l'IL-2 et de l'IL-15 sur les cellules effectrices CD8⁺CD44⁺ et les cellules NK, mais en présence de l'IL-2R α BiG n'inhibe pas l'action de l'IL-2 *in vitro*. De plus BiG n'inhibe pas l'expansion des T-reg par l'IL-2 *in vivo*.

L'étude de la régulation des chaînes IL-15R α et IL-2R α à la surface des cellules Kit255, a montré que la chaîne IL-2R α reste détectable après un traitement avec l'IL-2 et la chaîne IL-15R α est indétectable après un traitement avec l'IL-15. Cette différence de régulation influence la sensibilité des cellules à une re-stimulation avec l'IL-2 ou l'IL-15. La constante présence de la chaîne IL-2R α à la surface des cellules Kit225 évoque le pré-assemblage du récepteur trimérique de l'IL-2 (Damjanovich et al., 1997; Wu et al., 1995). En

effet son inhibition avec l'anti-IL-2R α (33B3.1) permet à BiG d'inhiber l'action de l'IL-2, montrant ainsi que l'action antagoniste de BiG est bloquée par la chaîne IL-2R α . L'IL-15R α a un moindre effet sur l'action de BiG puisqu'elle est indétectable à la surface membranaire des cellules Kit225 à cause de son internalisation ou sa fixation à l'IL-15.

L'action inhibitrice de BiG *in vivo* sur les cellules effectrices (CD8⁺ et NK) et l'absence d'inhibition des cellules T-reg, montre une régulation de la balance régulation/effecteur du système immunitaire. En effet, l'inhibition du récepteur dimérique par BiG induit l'augmentation du pourcentage des T-reg, en rendant l'IL-2 plus disponible. De nombreuses études ont précédemment montré qu'un déséquilibre quantitatif ou qualitatif dans cette balance immunitaire « régulation/activation » ou des cellules T-régulatrices engendre des maladies auto-immunes (Moraes-Vasconcelos et al., 2008). Nous avons également montré que BiG seul était capable d'augmenter le pourcentage de cellules T-reg chez les souris âgées. Ces souris âgées présentent plus de T-reg CD25⁺ que les souris jeunes (Lages et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggèrent que BiG agirait de manière similaire à une faible dose d'IL-2. Cette fine régulation de la balance immunitaire « régulation/activation » offre un réel potentiel thérapeutique des maladies auto-immunes par BiG. En effet plusieurs travaux ont montré l'intérêt de l'utilisation de faible dose d'IL-2 en thérapie (Klatzmann and Abbas, 2015; Yu et al., 2009), améliorant le rejet de greffe (Koreth et al., 2011) et le diabète de type I (Yu et al., 2015). Nos travaux ont pu montrer dans un modèle murin d'incompatibilité mineure de greffe de peau de souris BALB/c sur les souris DBA/2, que BiG améliore la survie des greffons de quelques jours. Néanmoins, une augmentation de la demi-vie de BiG en le couplant un fragment Fc par exemple, permettrait d'améliorer son effet thérapeutique.

Partie II

Trans-présentation homotypique de l'IL-15 entre les cellules NK.

IX. Trans-présentation homotypique de l'IL-15

Nous avons montré que la cinétique de phosphorylation de pSTAT-5 par la lignée NK-92 est prolongée comparée à celle de la lignée T Kit225, suite à une stimulation avec l'IL-15 durant 30 minutes (**figure 36**). Les cellules NK-92 et cellules Kit225 exprimant de manière similaire les trois chaînes réceptrices de l'IL-15 et qu'elles phosphorylent STAT-5 de manière équivalente lors de la *trans*-présentation par des cellules présentatrices, nous avons émis l'hypothèse que les cellules NK-92, contrairement aux cellules Kit225, ont un mécanisme de prolongation du signal dépendant de l'IL-15.

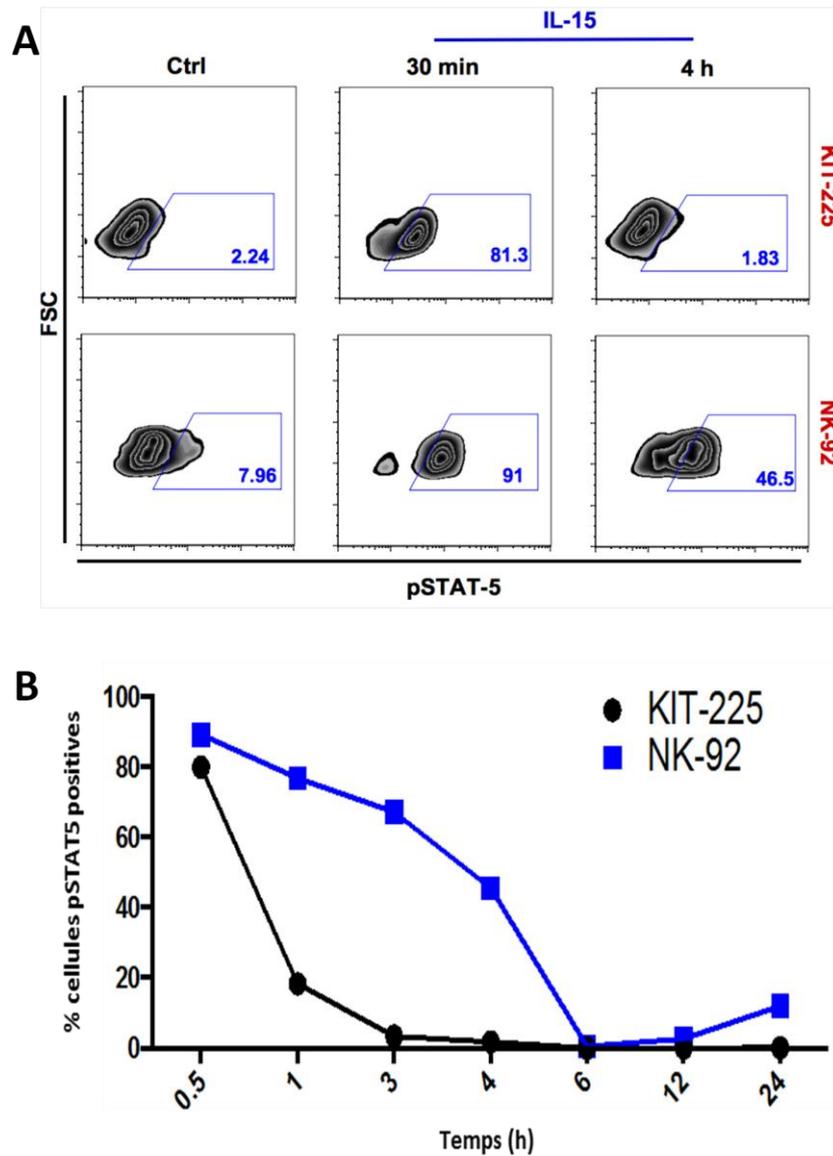


Figure 36 : Cinétique du signal pSTAT-5 dans les cellules NK-92 et Kit225. Après un traitement transitoire avec 1 nM d'IL-15 durant 30 minutes les cellules Kit225, NK-92 sont cultivées dans un milieu sans cytokines et la phosphorylation de STAT-5 intracellulaire est mesurée par cytométrie en flux. **(A)** Comparaison de la cinétique de phosphorylation de STAT-5 entre les cellules Ki225 et les cellules NK-92 à T 30min et T 4h **(B)** Représentation de l'ensemble de la cinétique jusqu'à T 24h. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

A. Mise en évidence de la *trans*-présentation homotypique

1. Propagation du signal parmi les cellules NK-92

Afin de vérifier notre hypothèse et de montrer que le signal pSTAT-5 persistant au sein des cellules NK-92, nous avons conçu un modèle de *trans*-présentation de l'IL-15 entre les cellules NK-92 ou entre les cellules Kit225. Afin de différencier les cellules NK-92 répondeuses des cellules NK-92 présentatrices, nous avons marqué les cellules répondeuses avec le VPD450 qui permet leurs visualisations par cytométrie en flux. Les cellules présentatrices sont chargées ou non avec l'IL-15 et non marquées au VPD450. Les mêmes expériences sont réalisées sur les cellules Kit225.

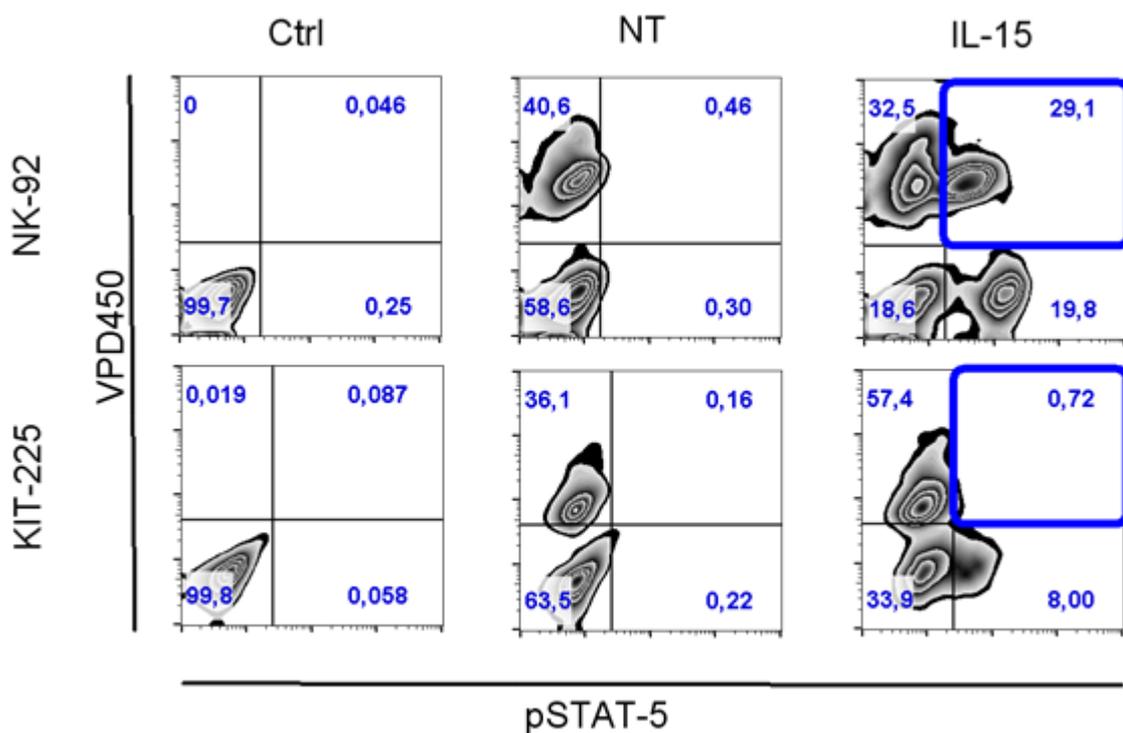


Figure 37 : Étude de la propagation du signal parmi les cellules Kit225 et les cellules NK-92. Les cellules répondeuses NK-92 (**haut**) ou les Kit225 (**bas**), marquées au VPD 450 sont cultivées durant 2 heures en présence des cellules présentatrices, chargées avec l'IL-15 (1 nM) ou non (NT). La phosphorylation de STAT-5 intracellulaire est mesurée par cytométrie en flux (n= 3).

En absence d'IL-15, aucune phosphorylation intracellulaire de STAT-5 n'est pas observée dans la co-culture des cellules NK-92 ou Kit225. Lorsque les cellules présentatrices sont préalablement chargées en IL-15, une phosphorylation du STAT-5, due à la fixation de l'IL-15, est observée au sein des cellules présentatrices NK-92 VPD 450⁻ et les cellules Kit225 VPD 450⁻. Dans la co-culture des cellules NK-92, la phosphorylation de STAT5 intracellulaire est détectée dans 47% des cellules répondeuses VPD 450⁺. Dans la co-culture des cellules Kit225, seulement 1% des cellules répondeuses VPD 450⁺ présentent une phosphorylation intracellulaire du pSTAT-5. Ces résultats montrent une propagation du signal entre les cellules NK-92 présentatrices et les cellules NK-92 répondeuses. Cette propagation de signal n'est pas retrouvée au sein des cellules Kit225 ce qui montre que cette lignée cellulaire ne réagit pas de la même manière au traitement avec l'IL-15 (**figure 37**).

2. La propagation du signal est spécifique de l'IL-15

L'IL-15 et l'IL-2 partagent le récepteur dimérique de moyenne affinité IL-2/15Rβγ, ce qui explique une certaine redondance dans leurs fonctions. Afin de déterminer si la propagation du signal parmi les cellules NK-92 est spécifique de l'IL-15, nous l'avons réalisé les mêmes expériences en présence de l'IL-15 ou de l'IL2 et les résultats ont été analysés par cytométrie en flux.

Les résultats de la cytométrie en flux montrent que contrairement à la condition « IL-15 », lorsque les cellules présentatrices sont chargées en IL-2, seulement 11% des cellules répondeuses présentent une phosphorylation de STAT-5. Dans les mêmes conditions la visualisation de la phosphorylation de STAT-5 par « imaging flow cytometry (AMNIS) », est réalisée sur les doublets de cellules NK-92 répondeuses VPD450⁻ en interaction avec les cellules NK-92 VPD⁺ présentatrices. Les images montrent une faible phosphorylation de STAT-5 en absence de cytokine. Lorsque les cellules NK-92 présentatrices sont chargées

avec de l'IL-15 on observe une phosphorylation de STAT-5 au sein des cellules répondeuses. A l'inverse les cellules NK-92 présentatrices chargées en IL-2 n'induisent pas la phosphorylation de STAT-5 dans les cellules répondeuses. Ce qui confirme les résultats obtenus par cytométrie en flux (**figure 38**).

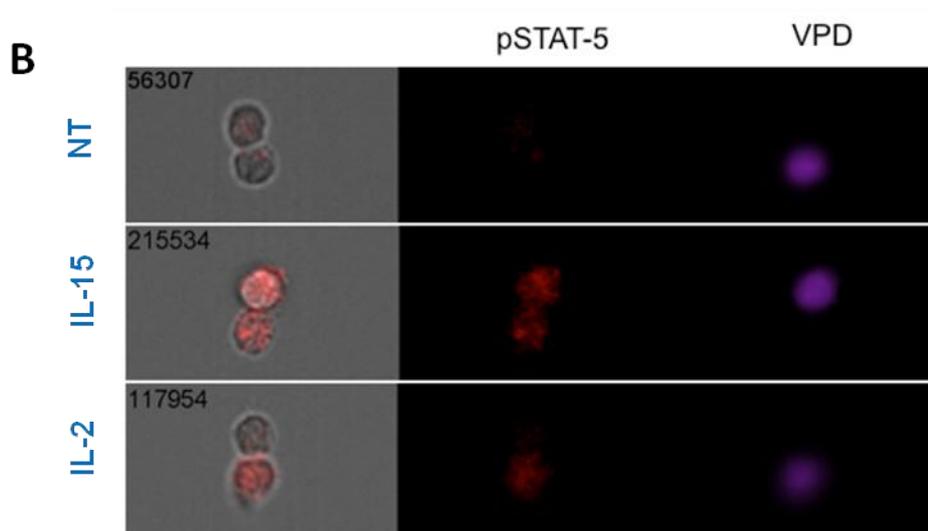
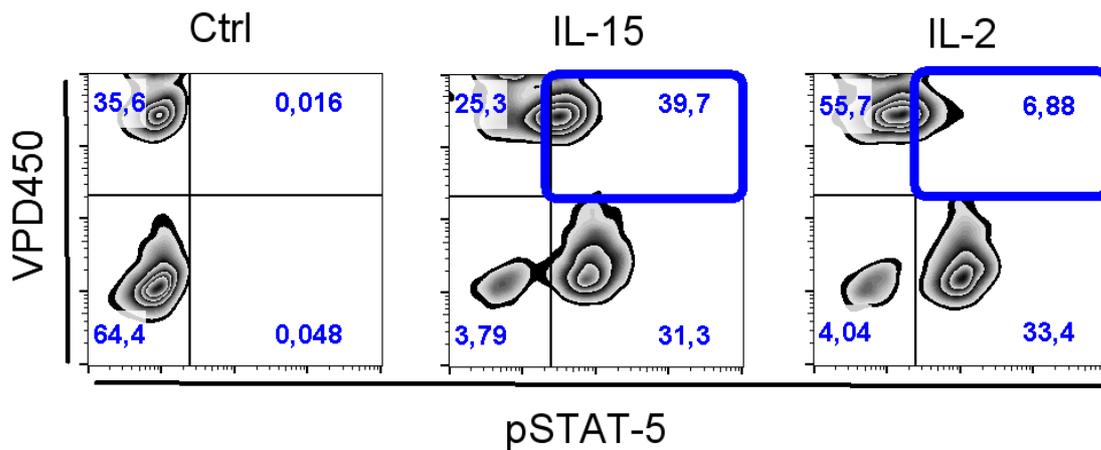


Figure 38 : La transmission du signal entre les cellules NK-92 est spécifique de l'IL-15. (A) Les cellules NK-92 présentatrices sont chargées en IL-15 ou en IL-2 durant 30 minutes et les cellules NK-92 répondeuses sont marquées au VPD 450. Les deux types de NK-92 sont mis en co-culture durant 2h. La mesure de pSTAT-5 intracellulaire s'effectue par cytométrie en flux (n=3). (B) Seul les cellules NK-92 présentatrices sont marquées avec le VPD 450⁺. La phosphorylation de STAT-5 au sein des cellules NK-92 est mesurée dans les doublets cellulaires par l'AMNIS (Imaging Flow Cytometry) (n=2).

3. La propagation du signal est dépendante du contact physique

L'observation de doublets cellulaires par la technique d'imaging flow cytometry suggère la formation de synapses entre les cellules NK-92. De plus la nécessité de la formation d'une synapse et du contact physique entre les cellules présentatrices de l'IL-15 et les cellules répondeuses a précédemment été montrée (Tamzalit et al., 2014). Des expériences similaires sont réalisées en présence d'une membrane poreuse (Transwell®, pores 4 µm) perméable aux facteurs solubles et séparant physiquement les cellules présentatrices chargées avec l'IL-15 des cellules répondeuses VPD450⁺. Les résultats montrent que la rupture du contact cellulaire par cette membrane inhibe totalement la transmission de signal pSTAT-5 entre les cellules présentatrices et les cellules répondeuses. La phosphorylation de STAT-5 est présente dans 70% des cellules répondeuses VPD 450⁺ comme montré précédemment puis baisse jusqu'à 4% en présence de la membrane poreuse. Ce résultat montre que la propagation du signal entre les cellules NK-92 est dépendante du contact physique entre les cellules présentatrices et les cellules répondeuses et n'est pas due à un décrochage de l'IL-15 qui activerait les cellules répondeuses en *Cis* (figure 39).

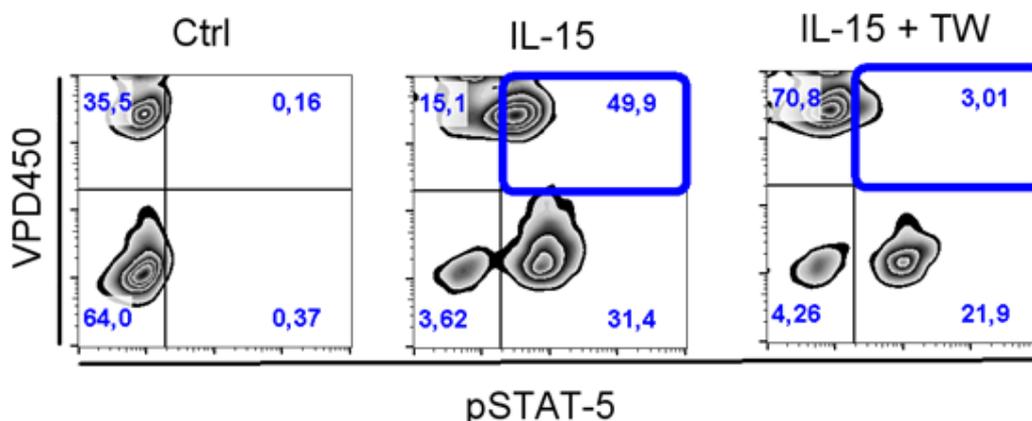


Figure 39 : La transmission du signal pSTAT-5 entre cellules NK-92 est dépendante du contact cellulaire. Test de *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre cellules NK-92, en présence ou non d'une membrane poreuse séparant les cellules présentatrices des cellules répondeuses. Le signal pSTAT5 intracellulaire est analysé par cytométrie en flux (n=3).

4. Inhibition de la propagation du signal par BiG

Les résultats précédents, ont montré que la propagation du signal parmi les cellules NK-92 est dépendante de l'IL-15 et non de l'IL-2, ce qui suggère l'usage des récepteurs à l'IL-15 par les cellules répondeuses. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tiré avantage de notre antagoniste BiG pour montrer la nature de cette propagation du signal. En effet BiG se fixe sur le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ des cellules répondeuses et empêcherait ainsi la propagation du signal vers les cellules répondeuses.

Le traitement de la co-culture des cellules NK-92 avec BiG inhibe la transmission du signal pSTAT-5 entre les cellules présentatrices chargées en IL-15 et les cellules répondeuses. En absence d'inhibiteur, la phosphorylation du STAT-5 est détectée dans 50% des cellules répondeuses. BiG inhibe la propagation du signal entre les cellules NK-92 (**Figure 40**). Ce résultat indique la nécessité du récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$. L'ensemble de ces observations permettent de déduire que l'IL-15 est *trans*-présentée de manière homotypique entre les cellules NK-92.

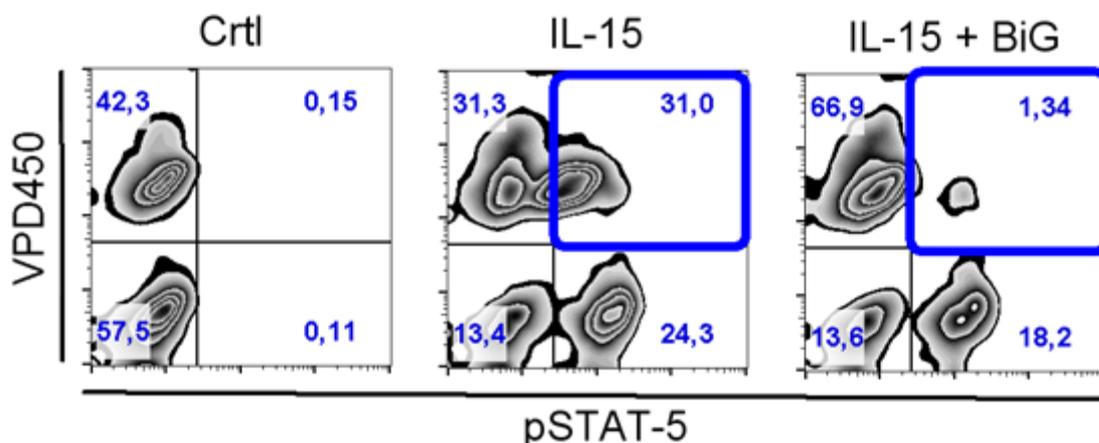


Figure 40 : Inhibition de la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre cellules NK-92 par BiG. Test de *trans*-présentation de l'IL-15 entre cellules NK-92, en présence ou non d'un inhibiteur de la *trans*-présentation (100 nM) dans la co-culture. Le signal pSTAT5 intracellulaire est analysé par cytométrie en flux (n=3).

5. Implication des molécules d'adhésion dans la *trans*-présentation homotypique

a) Expression membranaire des molécules d'adhésion

La dépendance de la *trans*-présentation homotypique du contact physique lors de la transmission du signal entre cellules NK-92 suggère l'implication des molécules d'adhésion dans la formation des synapses entre les cellules NK-92. Nous avons comparé l'expression de molécules d'adhésion LFA-1, ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3 à la surface des cellules NK-92 et des cellules Kit225 par cytométrie en flux.

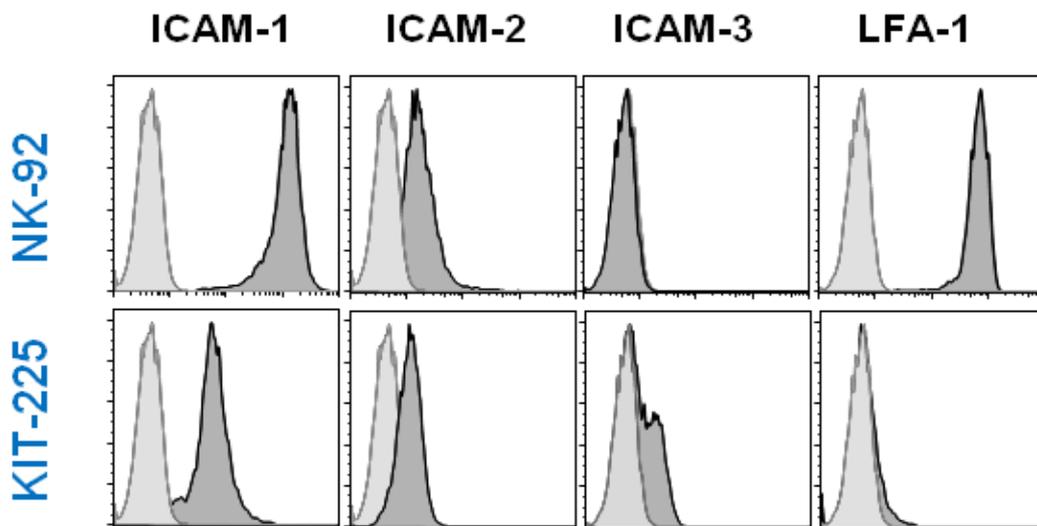


Figure 41 : Expression des molécules d'adhésion. L'expression de LFA-1 et ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3 à la surface des cellules NK-92 et Kit225 est évaluée par cytométrie en flux. Ces résultats sont représentatifs de plusieurs expériences individuelles (n=3).

La comparaison de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 montre une première différence entre les cellules NK-92 et les cellules Kit225. En effet les cellules NK-92 expriment plus fortement la molécule ICAM-1 que les cellules Kit225. La molécule ICAM-2 n'est pas exprimée différemment par les deux types cellulaires. La molécule d'adhésion ICAM-3 exprimée faiblement sur les cellules Kit225, est absente de surface des

cellules NK-92. Enfin l'analyse de l'expression de la molécule d'adhésion LFA-1, montre qu'elle est fortement exprimée par les cellules NK-92 alors qu'elle est absente à la surface des cellules Kit225. En résumé ces résultats montrent que les cellules NK-92 expriment fortement le couple de molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1 comparées aux cellules Kit225 (**figure 41**).

b) Inhibition des molécules d'adhésion lors de la *trans*-présentation homotypique

Pour tester l'implication de molécule d'adhésion LFA-1 lors de la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre les cellules NK-92, les cellules NK-92 ont été traitées avec un anticorps anti-LFA-1. Une co-culture de 24h a été réalisée car la co-culture de 2h n'est pas suffisante pour une inhibition de la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 (résultats non montrés) probablement due à une *trans*-présentation très rapide comparée à la fixation de l'anti-LFA-1 sur les cellules NK-92.

L'analyse de la phosphorylation de STAT-5 intracellulaire, au sein des cellules NK-92 au bout de 24h de co-culture, montre d'une part la persistance de 30% de signal pSTAT-5 au sein des cellules NK-92, ce qui confirme les précédents résultats (**Figure 36**). D'autre part ce résultat montre 97% d'inhibition de la propagation du signal entre les cellules NK-92 présentatrices et les cellules répondeuses par l'anticorps anti-LFA-1 (**figure 42**).

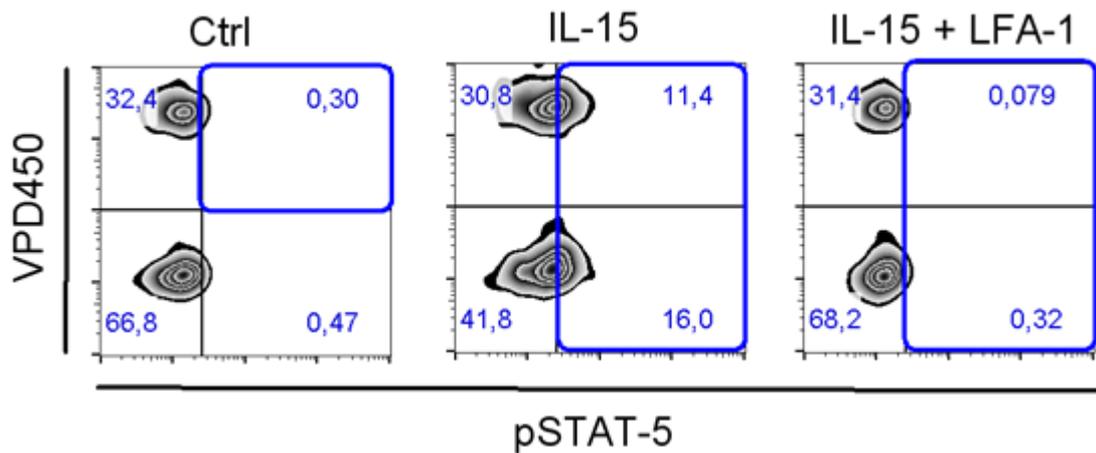


Figure 42 : implication de la molécule d'adhésion LFA-1 dans la propagation du signal parmi les cellules NK-92. Test de *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre cellules NK-92, en présence ou non d'un anticorps bloquant anti-LFA-1 (10 µg/ml) dans la co-culture de 24h. Le signal pSTAT5 intracellulaire est analysé par cytométrie en flux (n=3).

B. *Trans*-présentation homotypique sur les cellules NK primaires

humaines

Afin de valider nos observations sur les cellules NK humaines primaires, nous avons dans un premier temps étudié leur l'expression des chaînes réceptrices de l'IL-15 et des molécules d'adhésion. Les PBMC sont cultivées en présence d'IL-2 durant 6 jours et des marquages extracellulaires des récepteurs et des molécules d'adhésions sont effectués à J0, J3 et J6.

1. Expression des chaînes réceptrices de l'IL-15 sur les cellules NK

L'étude de l'expression des trois chaînes réceptrices de l'IL-15, IL-15R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ par cytométrie en flux montre que les deux chaînes IL-15R α et l'IL-2/15R γ ne sont pas détectables à la surface des cellules NK primaires naïves à J0 mais qu'ils expriment la chaîne IL-2/15R β . Le traitement des cellules PBMC avec l'IL-2 induit l'expression des de la chaînes l'IL-2/15R γ dès J3, Celle-ci mais n'est pas maintenue jusqu'à J6. L'expression de la chaîne IL-2/15R α persiste jusqu'à J6 (**figure 43**).

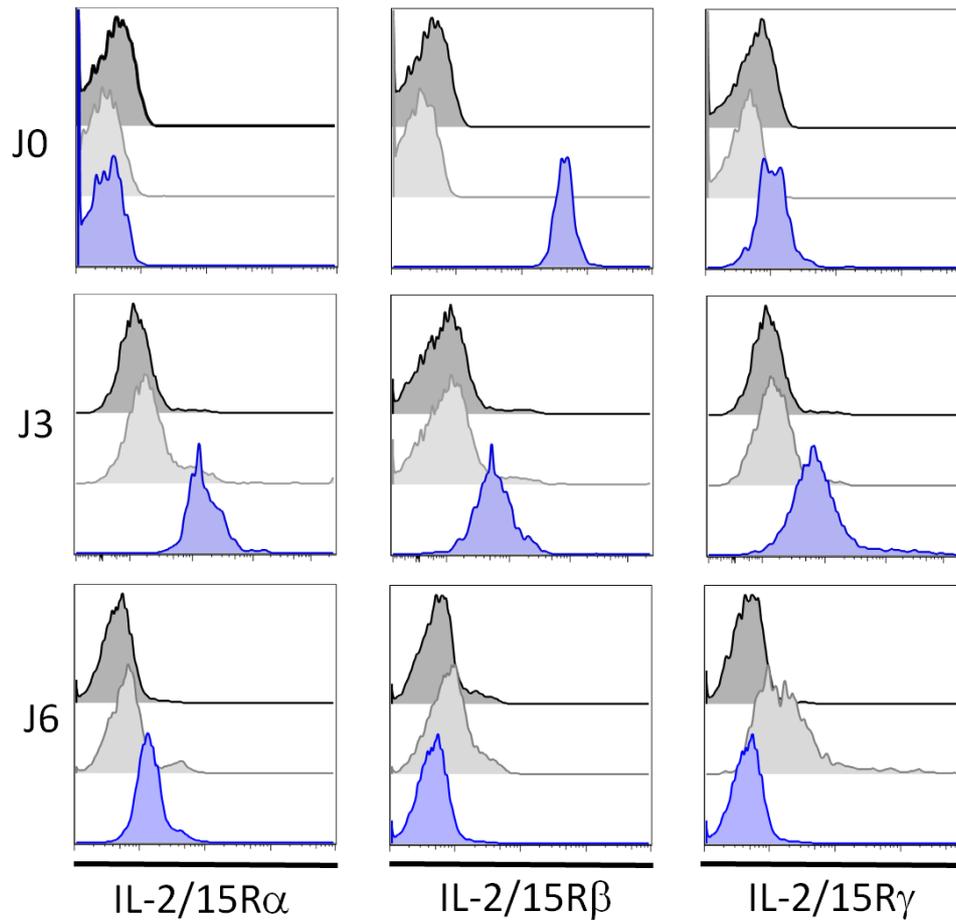


Figure 43 : Expression des chaînes réceptrices de l'IL-15 à la surface des cellules NK humaines. Les PBMC sont cultivés en présence d'IL-2 et l'expression des chaînes réceptrices de l'IL-15 est mesurée par cytométrie en flux à J0, J3 et J6 sur PBMC totaux. Les cellules sont cultivées en milieu RPMI en présence d'IL-2 et de sérum humain. Control sans marquage (**ligne noire**), contrôle isotypique (**ligne grise**) et marquages des différentes chaînes (**ligne bleue**). Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

2. Expression des molécules d'adhésion

L'expression des molécules d'adhésion : ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et LFA-1, a été également étudiée par cytométrie en flux. Les cellules NK humaines naïves expriment les trois molécules d'adhésion ICAM-1, ICAM-3 et LFA-1 et faiblement la molécule ICAM-2 à J0. Après le traitement avec l'IL-2, l'expression des quatre molécules persiste à J3 et seule ICAM-2 n'est pas détectée à J6 (**figure 44**).

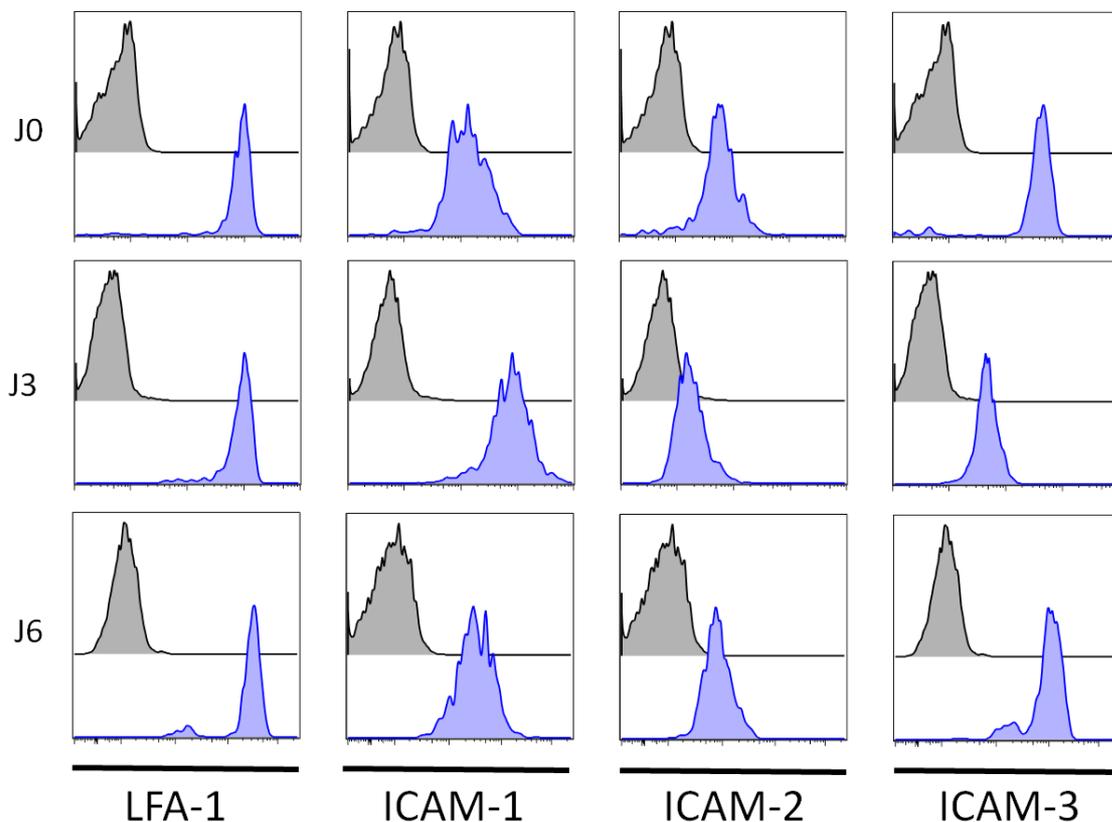


Figure 44 : Expression des molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1/-2/-3 à la surface des cellules NK humaines. Les cellules PBMC, après isolation du sang par gradient de densité, sont cultivées en milieu RPMI en présence d'IL-2 et de sérum humain. Les marquages membranaires des différentes molécules d'adhésion LFA-1, ICAM-1/2/3 (**ligne bleue**) sont réalisés par cytométrie en flux. Les isotypes contrôles sont représentés par l'histogramme gris. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

La caractérisation de l'expression des chaînes réceptrices de l'IL-15 et des molécules d'adhésion sur les cellules NK humaines a permis de déterminer le moment où les cellules

NK exprimaient les récepteurs nécessaires pour un test de *trans*-présentation homotypique. Ces conditions sont réunies à J3.

3. Test de *trans*-présentation homotypique

Les cellules NK humaines sont purifiées à J3 par tri négatif, et le taux d'enrichissement est évalué par cytométrie en flux avant de réaliser le test de *trans*-présentation homotypique. La population de cellules NK utilisée a une pureté de 85% (**figure 45A**).

En présence d'IL-15, une phosphorylation de 80% de STAT-5 intracellulaire est détectée au sein des cellules NK humaines présentatrices, due à la fixation de l'IL-15. Une phosphorylation de STAT-5 dans 30% des cellules NK humaines répondeuses est également observée en présence d'IL-15. Ce signal au sein des cellules répondeuses est abrogé en présence de BiG ou la membrane poreuse (signal < 1% de pSTAT-5) (**figure 45B**).

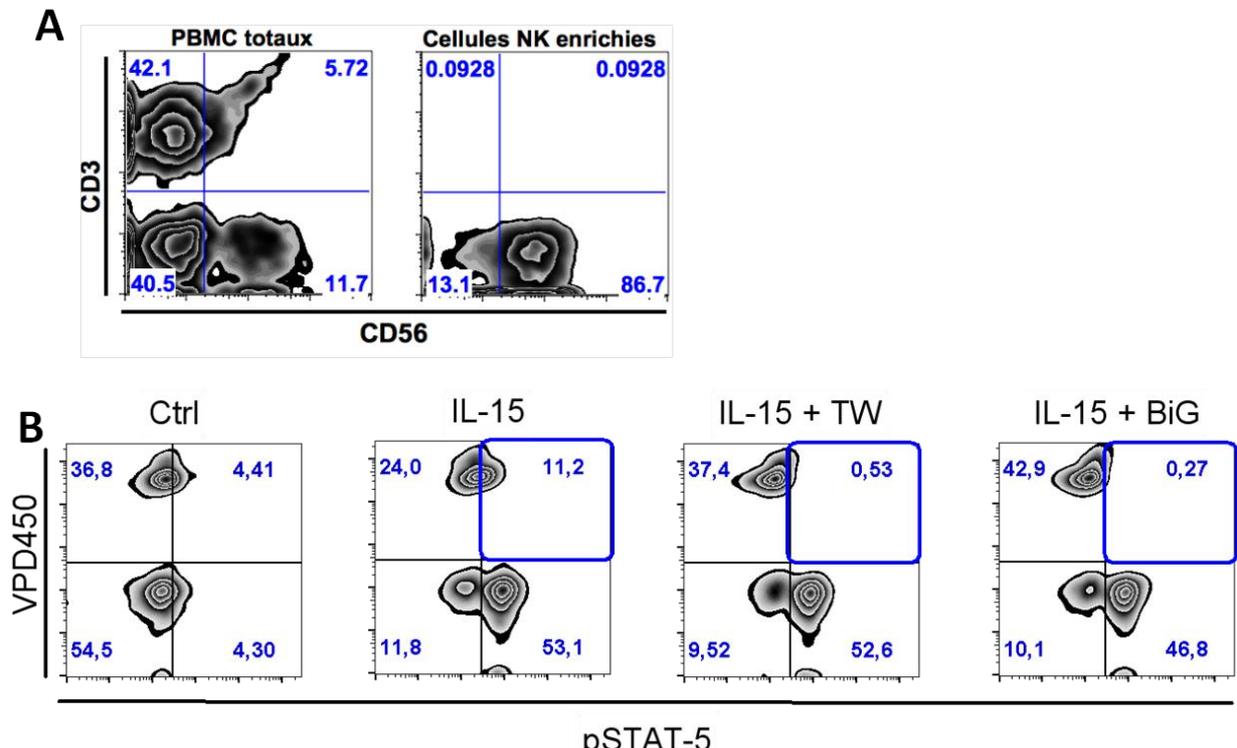


Figure 45 : Enrichissement des cellules NK humaines et inhibition de la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre cellules NK. (A) Contrôle de purification des cellules NK par cytométrie en flux. Les cellules NK sont représentées par la sous-population CD3⁺CD56⁺ (B) Test de *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre cellules NK, en présence ou non d'un inhibiteur de la *trans*-présentation BiG (100 nM) ou d'une membrane poreuse (TW) qui sépare les cellules répondeuses des cellules présentatrices. Le signal pSTAT5 intracellulaire est analysé par cytométrie en flux (n=2).

C. Discussion

Nous avons montré dans cette étude que les cellules NK-92 et les cellules Kit225 répondent différemment à l'IL-15. En effet, la cinétique de phosphorylation de STAT-5 par la lignée NK-92 est prolongée comparée à celle de la lignée T Kit225. Les cellules NK-92 chargées avec l'IL-15 sont en mesure d'activer les cellules NK-92 voisines, entraînant ainsi une persistance du signal pSTAT-5 après le chargement avec l'IL-15. Ce signal prolongé est dû à la *trans*-présentation de l'IL-15 de manière homotypique entre ces cellules NK-92. Cette *trans*-présentation homotypique par les cellules NK s'opèrerait après recyclage et expression du complexe IL-15/IL-15R α à leur surface de la même façon que les monocytes (Dubois et al., 2002). D'autres études ont également montré une rétention de l'IL-15 par la chaîne IL-15R α à la surface des cellules T CD8⁺ (Sato et al., 2007). L'IL-15 recyclée ou retenue par la chaîne IL-15R α à la surface cellulaire serait ainsi *trans*-présentée. Nos résultats ont montré que les cellules Kit225 ne *trans*-présentent pas l'IL-15 de façon homotypique, mais il serait intéressant d'étudier la cinétique de phosphorylation de STAT-5 au sein des cellules Kit225 en présence de cellules NK-92 présentatrices.

Notre étude a également montré que la propagation de signal entre les cellules NK-92 est spécifique de l'IL-15. Les expériences de co-culture homotypique de l'IL-2, montrent que seule une faible propagation de signal est induite. Cette faible propagation peut être expliquée par l'action paracrine de l'IL-2. Ce phénomène a déjà été décrit au sein des lymphocytes T CD8⁺ (Sabatos et al., 2008). En effet, la faible affinité de l'IL-2 à son récepteur IL-2R α permettrait son décrochage de l'IL-2 des cellules présentatrices et sa fixation sur les cellules répondeuses. A l'inverse, la forte affinité de l'IL-15 à son récepteur IL-15R α , ne permettrait pas son décrochage et son action paracrine.

Le traitement des cellules répondeuses NK-92 par l'antagoniste BiG, qui cible spécifiquement le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ nécessaire aux cellules répondeuses lors de la *trans*-présentation, inhibe la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre les cellules NK-92. Afin de valider ces observations, il serait important de refaire les expériences précédentes en bloquant les chaînes réceptrices IL-15R α et IL-2R α sur les cellules répondeuses, ce qui ne devrait pas influencer la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 mais diminuerait l'action paracrine de l'IL-2.

Nos résultats ont également montré que la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre les cellules NK-92 est dépendante du contact physique entre les cellules. En effet la séparation des cellules présentatrices des cellules répondeuses par une membrane poreuse empêchant le contact physique, ou un anticorps anti-LFA-1 impliqué dans les interactions cellulaires, entraîne une abrogation de la propagation de signal entre ces cellules. Ce résultat montre la nécessité du contact cellulaire durant la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15. En effet des études ont précédemment montré l'importance de la formation d'une synapse immunologique entre les cellules T durant leur interaction homotypique (Gérard et al., 2013). De plus, plusieurs molécules d'adhésion participant à la formation de contact homotypique ont également été décrites : LFA-1 (Sabatos et al., 2008), ICAM-1 (Zumwalde et al., 2013), 2B4 et CD48 (Kim et al., 2014). Les molécules d'adhésion 2B4 et CD48 sont impliquées dans la formation de synapses entre les cellules NK au sein desquelles sont polarisés les récepteurs IL-2R α , IL-2/15R β et IL-2/15R γ favorisant ainsi l'action paracrine de l'IL-2 (Kim et al., 2014). La formation de synapses entre les cellules NK et les cellules dendritiques est également cruciale durant la *trans*-présentation de l'IL-15 et la survie des cellules NK (Brilot et al., 2007).

Les travaux réalisés sur les cellules NK primaires, nous ont permis de montrer que les cellules NK primaires non-activées (J0) n'expriment pas la chaîne IL-15R α et que l'activation par l'IL-2 durant trois jours induit son expression. Par ailleurs ces cellules expriment les quatre molécules d'adhésion étudiées ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et LFA-1. Le test de *trans*-présentation homotypique sur les cellules NK activées a montré une faible *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 entre les cellules NK humaines primaires. Néanmoins celle-ci est inhibée par la présence de la membrane poreuse et le traitement avec BiG. Ces résultats appuient l'existence de la *trans*-présentation homotypique chez les cellules NK humaines.

Afin de renforcer ces résultats, il serait nécessaire de réaliser une cinétique de *trans*-présentation homotypique entre les cellules NK primaires. En effet nos expériences actuelles sont effectuées dans les mêmes conditions que les cellules NK-92 (à 2h de co-culture, ratio 1:1 entre cellules présentatrices et répondeuses) et il serait donc intéressant de faire varier le ratio de cellules ainsi que le temps de co-culture afin de montrer une meilleure *trans*-présentation. Une purification des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺ est également envisageable pour évaluer leur capacité à *trans*-présenter l'IL-15 de façon homotypique. Il serait intéressant de réaliser un test *trans*-présentation croisé entre les lymphocytes NK et cellules T CD4⁺ ou les lymphocytes CD8⁺ primaires humaines. Ce type d'expériences montrerait une potentielle *trans*-présentation de l'IL-15 entre cellules NK et lymphocytes T.

Conclusions et perspectives

Développement d'antagoniste de l'IL-15 :

Au cours de cette étude nous avons développé deux antagonistes de l'IL-15 avec deux stratégies différentes d'inhibition. La comparaison des deux antagonistes NANTIL-15 et BiG montre d'une part que le ciblage de la chaîne IL-2/15R β (mutation N65K) nécessite le maintien de l'interaction avec la chaîne IL-15R α puisque comme montré dans nos travaux, le RLI_{N65K} (même format que BiG) n'a aucun effet inhibiteur. La dépendance du NANTIL-15 de l'expression et la disponibilité de la chaîne IL-15R α limite son effet sur les cellules humaines, puisque l'IL-15R α n'est pas exprimée sur les cellules non-activées et est non disponible par son pré-couplage à l'IL-15 durant la *trans*-présentation *in vivo*. L'inefficacité du RLI_{N65K} et la nécessité de l'interaction avec la l'IL-15R α , évoque le recrutement séquentiel des chaînes IL-15R α , IL-2/15R β et ensuite IL-15R γ (Bodnár et al., 2008) et donc le ciblage de l'une des chaînes de l'IL-15 dans le développement d'un antagoniste nécessiterait le renforcement de son interaction avec la chaîne qui précède, c'est la stratégie employée dans le développement de l'antagoniste BiG.

L'étude de la régulation de la chaîne IL-15R α à la surface des cellules après un court traitement par l'IL-15, que cette chaîne reste longtemps indétectable (internalisée ou occupée par l'IL-15 recyclée) à la surface des cellules comparée à la chaîne IL-2R α . Cette particularité explique d'une part l'inefficacité d'inhibition du NANTIL-15 sur les lignées humaines utilisées et appuie d'autre part l'intérêt du ciblage du récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ par la molécule BiG au lieu de IL-15R $\alpha\beta\gamma$. De plus, à l'inverse du NANTIL-15, le ciblage du récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ par BiG permet une inhibition de l'action de l'IL-2.

Cette étude a également permis de montrer une différence fondamentale entre la biologie de l'IL-15 et celle de l'IL-2. En effet l'inefficacité de BiG à inhiber l'action de l'IL-2 lorsque la chaîne IL-2R α est exprimée à la surface des cellules, suggère un pré-assemblage du récepteur trimérique IL-2R $\alpha\beta\gamma$ à la surface des cellules (Damjanovich et al., 1997). Ce pré-assemblage du récepteur trimérique IL-2R $\alpha\beta\gamma$ se trouvant sur les cellules T-reg représente un réel avantage pour l'action antagoniste de BiG. En effet BiG n'inhibe pas l'action de l'IL-2 sur les cellules T régulatrices et permet également une expansion des T-reg chez les souris âgées *in vivo*. Cette expansion pouvant s'expliquer par une meilleure disponibilité de l'IL-2 pour les cellules T-reg (IL-2/15R $\alpha\beta\gamma$) en présence de BiG qui inhibe sa fixation sur les récepteurs IL-2/15R $\beta\gamma$.

L'étude de l'inhibition de l'action de l'IL-15 et de l'IL-2 *in vitro*, montre que BiG a un meilleur effet inhibiteur que le NANTIL-15, notamment sur les cellules NK et T CD8⁺ humaines primaires. Contrairement au NANTIL-15, BiG est également inhibiteur de la trans-présentation de l'IL-15. *In vivo*, dans un contexte d'up-régulation de l'IL-15 (mimé par l'injection d'IL-15 ou RLI exogène) l'effet de BiG et du NANTIL-15 sont comparables puisque les deux inhibent l'activation des cellules NK et des cellules CD8⁺.

Ce travail de thèse a permis de développer deux molécules antagonistes agissant différemment ce qui représente de très bon outils pour comprendre les fonctions de l'IL-15. En effet, tester ces deux molécules dans un même modèle pathologique, exemple du modèle d'arthrite induite par le collagène, permettrait de comprendre le rôle de la signalisation via le récepteur trimérique IL-15R $\alpha\beta\gamma$ (*cis*-présentation) en utilisant le NANTIL-15 et via le récepteur dimérique IL-2/15R $\beta\gamma$ en utilisant BiG. Un co-traitement avec le NANTIL-15 et BiG dans ce modèle permettrait de montrer un éventuel effet additif ou synergique entre les deux antagonistes.

La régulation du système immunitaire en faveur de la tolérance que permet l'antagoniste BiG, donne à cet antagoniste un réel potentiel en thérapie, il serait donc intéressant de continuer à l'améliorer en augmentant sa demi-vie par exemple et caractériser son rôle sur les autres cellules du système immunitaire dépendantes de l'IL-15 telles que les cellules NK-T et les lymphocytes T $\gamma\delta$. En plus de son effet sur l'expansion des cellules T-reg, il Il serait également important d'évaluer l'effet de BiG sur l'activité régulatrice des cellules T-reg sur l'activation des lymphocytes T CD8+ *in vitro*.

Trans-présentation homotypique de l'IL-15 :

Cette étude a permis de montrer l'existence d'un de la *trans*-présentation homotypique de l'IL-15 utilisé par les cellules NK impliquant les molécules d'adhésion telles que LFA-1. Plusieurs travaux ont montré ce type d'interaction homotypique grâce à l'action paracrine de l'IL-2 mais non décrit pour l'IL-15. Ce travail permet de reconsidérer le comportement des cellules NK en présence de l'IL-15, qui préalablement était assimilé à une *cis*-présentation de l'IL-15.

Une étude plus approfondie de la survie, activation ou prolifération suite aux signaux de *trans*-présentation homotypique serait nécessaire pour identifier l'importance de cette interaction. Ce type d'étude serait également très important pour exploiter cette interaction pour activer les cellules NK par d'autres NK dans l'objectif d'une thérapie anti-tumorale par exemple. Il serait envisageable d'étudier l'existence de ce phénomène *in vivo* dans un premier temps par un transfert de cellules deux population présentatrices et répondeuses dans des souris SCID et étudier l'activation et la prolifération des cellules répondeuses. Il serait également intéressant d'étudier cette *trans*-présentation homotypique par les cellules NK murines *in vitro* ou *in vivo* par le transfert de cellules NK de souris congénique CD45.2

activés par l'IL-15 à des une souris congénique CD45.1 et étudier l'activation des cellules NK et des cellules T CD8⁺ CD45.1.

Matériels et méthodes

Les lignées cellulaires

Les cellules NK-92: sont des cellules non-adhérentes issues d'un lymphome malin non-Hodgkinien humain et sont cultivées en milieu RPMI-1640, sérum humain (8%) et hIL-2 (5ng/mL) à 37°C.

Les cellules Kit225: sont des cellules non-adhérentes issues d'un lymphome leucémique T humain et sont cultivées en milieu RPMI-1640, SVF (6%) et hIL-2 (5ng/mL) à 37°C.

Les cellules CTLL-2: sont des cellules non-adhérentes. Ces cellules sont un clone de lymphocytes T cytotoxiques dérivées de souris C57BL/6. Elles sont cultivées dans un milieu RPMI-1640, SVF (6%) et hIL-2 (5ng/mL) à 37°C.

Partie I : développement de l'antagoniste NANTIL-15

Inhibition de prolifération

Les cellules NK-92, CTLL-2 et les cellules Kit225 sont sevrées dans un milieu complet en absence de cytokines sur la nuit. Les cellules sont ensuite cultivées durant 72 heures à une concentration de 10^4 cellules dans 100 μ l en présence d'une concentration fixe d'IL-15 de 25 pM ou 100 pM d'IL-2 et de concentrations croissantes de NANTIL-15. Au bout des 72 heures de culture, les cellules sont traitées avec 10 μ l d'AlmarBlue par puits durant 6 heures. La prolifération est ensuite estimée par la mesure de la fluorescence à 550/590 nm.

Inhibition de la trans-présentation

Les cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec la chaîne IL-15R α ont été incubées avec l'IL-15 durant 1 heure à 37°C pour permettre la fixation de l'IL-15 sur la chaîne IL-15 R α , puis les cellules sont lavées pour éliminer l'IL-15 non fixée. Les cellules Kit225 sont sevrées dans un milieu sans IL-2 pendant 12 heures. Les cellules répondeuses Kit225 sont mises en co-culture avec les cellules présentatrices HEK-293R α durant 1 heure.

Pour étudier l'inhibition par le NANTIL-15 de la *trans*-présentation de l'IL-15, trois conditions ont été testées : (i) traitement des cellules Kit225 avec 100 nM de NANTIL-15

durant 30 minutes avant la co-culture, **(ii)** traitement de la co-culture Kit225 et HEK293R α avec 100 nM de NANTIL-15 durant 1heure, **(iii)** traitement des cellules présentatrices avec le NANTIL-15 avant leur chargement en IL-15. Les cellules sont ensuite fixées durant 10 minutes avec le tampon de fixation (BD Phosflow Fix Buffer I) puis sont perméabilisées durant 20 minutes avec le tampon de perméabilisations (BD Phosflow Perm Buffer III). La phosphorylation de STAT-5 intracellulaire est analysée par cryométrie en flux (FACS Calibur ou FACS Canto II, BD Biosciences). Les résultats sont analysés sur le logiciel FlowJo.

Modèle arthrite

Le modèle d'arthrite est induite par immunisation des souris DBA/1, âgées de 7 à 8 semaines, avec du collagène bovin de type II émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA) par injection intra-épidermique à la base de la queue. Une immunisation de rappel est effectuée 3 semaine après la première immunisation, avec le collagène de type II émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA). Trois à quatre semaines après l'immunisation, l'inflammation se développe dans les pattes de souris. Le score clinique est déterminé tous les jours en suivant cette grille d'évaluation :

	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Paramètres visuels	Etat normal	1 doigt inflammé	> 1 doigt inflammé mais tarse normal	Tarse inflammé	Fortement inflammé et ankylosé
Epaisseur des pattes avant (mm)	$E \leq 2$	$2 < E < 2,75$	$2,75 < E < 3,50$	$E > 3,50$	ankylose
Epaisseur des pattes arrière (mm)	$E \leq 3$	$3 < E < 3,75$	$3,75 < E < 4,25$	$E > 4,25$	ankylose

Cytométrie

L'expression des marqueurs mCD8 (53-6.7), mCD3 (145-2C11), mCD4 (GK1.5), mNK1.1 (PK136), mCD27 (LG.3A10), mCD11b (M1/70), mCD44 (IM7), mCD62L (MEL 14). Les cellules murines sont incubées avec un anticorps anti-CD16/CD32 durant 15 minutes à 4°C pour bloquer les récepteurs Fc le marquage extracellulaire est ensuite effectué durant 30

minutes à 4°C puis est analysée par cytométrie en flux (FACS Calibur ou FACS Canto II, BD Biosciences). Les résultats sont analysés sur le logiciel FlowJo.

Demi-vie

Les souris C57BL/6 ont été injectées par voie intraveineuse avec 10 µg de NANTIL-15. Des prélèvements sanguins sont effectués à différents temps. La concentration du NANTIL-15 dans le sang est ensuite mesurée dans le sérum par ELISA.

Transfection

Les cellules Kit225 ont été transfectées à l'aide du kit Amaxa Nucleofactor (10⁶) avec 10 µg de plasmide IL-15Rα suivant le protocole standard Amaxa. Au bout de 24 heures le milieu de culture est remplacé et l'efficacité de la transfection est évaluée par cytométrie en flux.

Histochimie

Les pattes de souris ont été prélevées à J37 et ont été fixées dans du formol 4% pendant deux jours puis sont décalcifiées et incluses en paraffine. Les coupes histologiques sont plongées durant 3 minutes dans 3 bains de xylène puis 3 bains de méthanol successifs pour permettre le decirage et la réhydratation. Le démasquage de l'antigène est ensuite réalisé en plaçant les lames dans une solution de trisodium citrate de pH 6 à une température de 98°C dans un bain-marie durant 15 minutes. Les lames sont lavées avec de la TBS 0,025 % triton et sont par la suite saturées avec un sérum murin durant 2h. Le marquage est réalisé avec un anticorps anti-mCD8⁺ couplé HRP dilué au 50^{ème} à 4°C dans une chambre humide durant une nuit. Après plusieurs lavages avec du TBS et une incubation de 30 minutes avec une eau oxygénée 1.6% et plusieurs lavages à l'eau, un développement avec un chromogène AEC durant 10 minutes est réalisé. Les lames sont lavées durant 10 minutes avec une eau abondante avant d'effectuer une contre coloration avec l'hématoxyline. Les lames sont visualisées avec le Nanozoomer et les images analysées avec le logiciel NDP VIEW.

ELISA

Mesure des concentrations plasmatiques du NANTIL-15 :

Un anticorps primaire anti-hIgG dilué au 100^{ème} dans du PBS tween 0.05% est fixé de manière aspécifique sur une plaque Maxi-Sorp à 4°C durant une nuit. Les puits sont ensuite saturés avec un tampon de saturation durant 1 heure à température ambiante. Une gamme de sérum murin issu de souris traitées avec le NANTIL-15 est déposée dans les puits durant 2 heures à température ambiante. Plusieurs lavages sont réalisés avec une solution PBS-Tween 0.01% puis l'anticorps secondaire anti-hIgG couplé HRP dilué au 1000^{ème} est déposé dans les puits durant 2 heures à température ambiante. Après plusieurs lavages le substrat TMB est rajouté et l'absorbance est lue à 450/570 nm.

Dosage des auto-anticorps anti-collagène :

Cinq µg de collagène dilué dans du PBS tween 0.05% est fixé de manière aspécifique sur une plaque Maxi-Sorp à 4°C durant une nuit. Les puits sont ensuite saturés avec un tampon de saturation durant 1 heure à température ambiante. Une gamme de sérum murin issu de souris atteintes d'arthrite traitées ou non traitées avec le NANTIL-15 est déposée dans les puits durant 2 heures à température ambiante. Plusieurs lavages sont réalisés avec une solution PBS-Tween 0.01% puis l'anticorps secondaire anti-mIgG couplé HRP dilué au 1000^{ème} est déposé dans les puits durant 2 heures à température ambiante. Après plusieurs lavages le substrat TMB est rajouté et l'absorbance est lue à 450 – 570 nm.

Partie II: Transprésentation homotypique de l'IL-15

Anticorps

L'expression des marqueurs hICAM1 (CD54), hICAM2 (CD102), hICAM3 (CD50), hLFA-1 (CD11a), hCD3, hNKp46 (CD335), hCD8, hCD56, hCD132 (IL-15R γ), hCD215 (IL-15R α clone AF247), hCD122 et pSTAT5 (pY694) à la surface des cellules NK-92, Kit225 ou des cellules NK primaires humaines est analysée par cytométrie en flux (FACS Calibur ou FACS Canto II, BD Biosciences). Les résultats sont analysés sur le logiciel FlowJo.

Isolement de cellules NK humaines à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)

Le sang est récupéré à partir de patients atteints d'hémochromatose, soignés au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Les PBMC sont ensuite isolés par gradient de

concentration Ficoll puis lavés en milieu RPMI-1640. Les PBMCs sont mis en culture en présence d'IL-2 (3000 UI : 0,18 µg/mL) et de 8% de sérum humain pendant 3 jours.

Enrichissement des cellules NK

L'enrichissement des cellules NK est réalisé par une sélection négative grâce au *NK Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec). Un test de purification est réalisé par cytométrie en flux (FACS Calibur ou FACS Canto II, BD Biosciences). Les résultats sont analysés sur le logiciel FlowJo.

Test de *trans*-présentation homotypique

Les cellules NK préalablement sevrées O/N ont été préparées. Les NK présentatrices sont chargées avec 1 nM d'IL-15 durant 30 minutes à 37°C, puis lavées au PBS pour éliminer l'IL-15 non-fixée ; les NK répondeuses ont été marquées au VPD 450 (Violet Proliferation Dye – BD Biosciences ; 1 µM pour 10 à 30 M de cellules) pendant 10 minutes à 37°C, puis lavées au PBS SVF 10%. Le VPD 450 permet de différencier les cellules répondeuses des cellules présentatrices par cytométrie en flux. La co-culture de ces deux sous-populations (ratio 1:1) est réalisée, pendant 2 heures en présence d'une membrane poreuse (Transwell®, pores 4 µm) ou d'antagoniste BiG de l'IL-15 (100 nM). Les cellules sont fixées pendant 10 minutes à 30°C (BD Phosflow Fix Buffer I, BD Biosciences) puis perméabilisées durant 20 minutes à 4°C (BD Phosflow Perm Buffer III, BD Biosciences). La phosphorylation de STAT5 intracellulaire est alors mesurée par cytométrie en flux (FACS Calibur ou FACS Canto II, BD Biosciences). Les résultats sont analysés sur le logiciel FlowJo.

Références

- Allavena, P., Giardina, G., Bianchi, G., and Mantovani, A. (1997). IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J. Leukoc. Biol.* *61*, 729–735.
- Alleva, D.G., Kaser, S.B., Monroy, M.A., Fenton, M.J., and Beller, D.I. (1997). IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J. Immunol.* *159*, 2941–2951.
- Anderson, D.M., Johnson, L., Glaccum, M.B., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Valentine, V., Kirstein, M.N., Shapiro, D.N., and Morris, S.W. (1995a). Chromosomal assignment and genomic structure of Il15. *Genomics* *25*, 701–706.
- Anderson, D.M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., and Jenkins, N.A. (1995b). Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* *270*, 29862–29869.
- Anderson, D.M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., and Jenkins, N.A. (1995c). Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* *270*, 29862–29869.
- Angiolillo, A.L., Kanegane, H., Sgadari, C., Reaman, G.H., and Tosato, G. (1997). Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *233*, 231–237.
- Armitage, R.J., Macduff, B.M., Eisenman, J., Paxton, R., and Grabstein, K.H. (1995). IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 483–490.
- Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U., and Waldmann, T.A. (1998). Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF- κ B site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2452–2457.
- Bagley, C.J., Woodcock, J.M., Stomski, F.C., and Lopez, A.F. (1997). The Structural and Functional Basis of Cytokine Receptor Activation: Lessons From the Common β Subunit of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Interleukin-3 (IL-3), and IL-5 Receptors. *Blood* *89*, 1471–1482.
- Bahri, R., Pateras, I.S., D’Orlando, O., Goyeneche-Patino, D.A., Campbell, M., Polansky, J.K., Sandig, H., Papaioannou, M., Evangelou, K., Foukas, P.G., et al. (2015). IL-15 suppresses colitis-associated colon carcinogenesis by inducing antitumor immunity. *Oncoimmunology* *4*, e1002721.
- Baker, P.E., Gillis, S., Ferm, M.M., and Smith, K.A. (1978). The effect of T cell growth factor on the generation of cytolytic T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *121*, 2168–2173.
- Baker, S.J., Rane, S.G., and Reddy, E.P. (2007). Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* *26*, 6724–6737.
- Bamford, R.N., Battiata, A.P., Burton, J.D., Sharma, H., and Waldmann, T.A. (1996). Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell

lymphotrophic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2897–2902.

Bamford, R.N., DeFilippis, A.P., Azimi, N., Kurys, G., and Waldmann, T.A. (1998). The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 4418–4426.

Barao, I., Hudig, D., and Ascensao, J.L. (2003). IL-15-mediated induction of LFA-1 is a late step required for cytotoxic differentiation of human NK cells from CD34+Lin- bone marrow cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 683–690.

Baslund, B., Tvede, N., Danneskiold-Samsøe, B., Larsson, P., Panayi, G., Petersen, J., Petersen, L.J., Beurskens, F.J.M., Schuurman, J., van de Winkel, J.G.J., et al. (2005). Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 52, 2686–2692.

Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S., and Tough, D.F. (2003). IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 5018–5026.

Bergamaschi, C., Jalah, R., Kulkarni, V., Rosati, M., Zhang, G.-M., Alicea, C., Zolotukhin, A.S., Felber, B.K., and Pavlakis, G.N. (2009). Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3064–3072.

Bessard, A., Solé, V., Bouchaud, G., Quémener, A., and Jacques, Y. (2009). High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2736–2745.

Bettelli, E., Dastrange, M., and Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5138–5143.

Bodnár, A., Nizsalóczy, E., Mocsár, G., Szalóki, N., Waldmann, T.A., Damjanovich, S., and Vámosi, G. (2008). A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol. Lett.* 116, 117–125.

Bottenus, R.E., Ichinose, A., and Davie, E.W. (1990). Nucleotide sequence of the gene for the b subunit of human factor XIII. *Biochemistry (Mosc.)* 29, 11195–11209.

Bouchaud, G., Gehrke, S., Krieg, C., Kolios, A., Hafner, J., Navarini, A.A., French, L.E., and Boyman, O. (2013). Epidermal IL-15R α acts as an endogenous antagonist of psoriasiform inflammation in mouse and man. *J. Exp. Med.* 210, 2105–2117.

Boulanger, M.J., and Garcia, K.C. (2004). Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv. Protein Chem.* 68, 107–146.

Brilot, F., Strowig, T., Roberts, S.M., Arrey, F., and Münz, C. (2007). NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15R α . *J. Clin. Invest.* 117, 3316–3329.

Brounais-Le Royer, B., Pierroz, D.D., Velin, D., Frossard, C., Zheng, X.X., Lehr, H.-A., Ferrari-Lacraz, S., and Ferrari, S.L. (2013). Effects of an interleukin-15 antagonist on systemic and skeletal alterations in mice with DSS-induced colitis. *Am. J. Pathol.* 182, 2155–2167.

Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Ludwig, A., Rose-John, S., Saftig, P., Borden, E.C., and Bulfone-Paus, S. (2004). Natural soluble interleukin-15R α is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17). *J. Biol. Chem.* 279, 40368–40375.

- Burkett, P.R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Boone, D.L., and Ma, A. (2004). Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15R α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* *200*, 825–834.
- Burton, J.D., Bamford, R.N., Peters, C., Grant, A.J., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T.A. (1994). A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4935–4939.
- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. (1994a). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* *180*, 1395–1403.
- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. (1994b). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* *180*, 1395–1403.
- Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H., and Caligiuri, M.A. (1997). A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.* *99*, 937–943.
- Chang, C.-L., Lai, Y.-G., Hou, M.-S., Huang, P.-L., and Liao, N.-S. (2011). IL-15R α of Radiation-Resistant Cells Is Necessary and Sufficient for Thymic Invariant NKT Cell Survival and Functional Maturation. *J. Immunol.* *187*, 1235–1242.
- Chen, J., Feigenbaum, L., Awasthi, P., Butcher, D.O., Anver, M.R., Golubeva, Y.G., Bamford, R., Zhang, X., Claire, M.B.S., Thomas, C.J., et al. (2013). Insulin-dependent diabetes induced by pancreatic beta cell expression of IL-15 and IL-15R α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13534–13539.
- Chen, J., Feigenbaum, L., Awasthi, P., Butcher, D., Anver, M., Golubeva, Y., Bamford, R., Zhang, X., Claire, M.S., Thomas, C., et al. (2014). Increased expression of IL-15 and IL-15R α in the islets of patients with T1D (CCR3P.217). *J. Immunol.* *192*, 115.14–115.14.
- Chiossone, L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., and Walzer, T. (2009). Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* *113*, 5488–5496.
- Conlon, K.C., Lugli, E., Welles, H.C., Rosenberg, S.A., Fojo, A.T., Morris, J.C., Fleisher, T.A., Dubois, S.P., Perera, L.P., Stewart, D.M., et al. (2015). Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 74–82.
- Crispín, J.C., and Tsokos, G.C. (2009). Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* *8*, 190–195.
- Damjanovich, S., Bene, L., Matkó, J., Alileche, A., Goldman, C.K., Sharrow, S., and Waldmann, T.A. (1997). Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: A fluorescence resonance energy transfer study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13134–13139.
- Demaison, C., Fiette, L., Blanchetière, V., Schimpl, A., Thèze, J., and Froussard, P. (1998). IL-2 receptor alpha-chain expression is independently regulated in primary and secondary lymphoid organs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 1977–1982.
- Devos, R., Plaetinck, G., Cheroutre, H., Simons, G., Degraeve, W., Tavernier, J., Remaut, E., and Fiers, W. (1983). Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* *11*, 4307–4323.

- Djaafar, S., Pierroz, D.D., Chicheportiche, R., Zheng, X.X., Ferrari, S.L., and Ferrari-Lacraz, S. (2010). Inhibition of T cell-dependent and RANKL-dependent osteoclastogenic processes associated with high levels of bone mass in interleukin-15 receptor-deficient mice. *Arthritis Rheum.* *62*, 3300–3310.
- Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raheer, S., Bernard, J., Boisteau, O., Leroy, S., Minvielle, S., Godard, A., and Jacques, Y. (1999). Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J. Biol. Chem.* *274*, 26978–26984.
- Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2002). IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* *17*, 537–547.
- Eberly, M.D., Kader, M., Hassan, W., Rogers, K.A., Zhou, J., Mueller, Y.M., Mattapallil, M.J., Piatak, M., Lifson, J.D., Katsikis, P.D., et al. (2009). Increased IL-15 Production Is Associated with Higher Susceptibility of Memory CD4 T Cells to Simian Immunodeficiency Virus during Acute Infection. *J. Immunol.* *182*, 1439–1448.
- Epron, G., Ame-Thomas, P., Le Priol, J., Pangault, C., Dulong, J., Lamy, T., Fest, T., and Tarte, K. (2012). Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* *26*, 139–148.
- d’Ettorre, G., Forcina, G., Lichtner, M., Mengoni, F., D’Agostino, C., Massetti, A.P., Mastroianni, C.M., and Vullo, V. (2002). Interleukin-15 in HIV infection: immunological and virological interactions in antiretroviral-naive and -treated patients. *AIDS Lond. Engl.* *16*, 181–188.
- Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* *97*, 14–32.
- Fehniger, T.A., Herbein, G., Yu, H., Para, M.I., Bernstein, Z.P., O’Brien, W.A., and Caligiuri, M.A. (1998). Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 6433–6438.
- Ferrari-Lacraz, S., Zanelli, E., Neuberg, M., Donskoy, E., Kim, Y.S., Zheng, X.X., Hancock, W.W., Maslinski, W., Li, X.C., Strom, T.B., et al. (2004). Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 5818–5826.
- García, V.E., Jullien, D., Song, M., Uyemura, K., Shuai, K., Morita, C.T., and Modlin, R.L. (1998). IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 4322–4329.
- Gérard, A., Khan, O., Beemiller, P., Oswald, E., Hu, J., Matloubian, M., and Krummel, M.F. (2013). Secondary T cell-T cell synaptic interactions drive the differentiation of protective CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* *14*, 356–363.
- Gill, N., Paltser, G., and Ashkar, A.A. (2009). Interleukin-15 expression affects homeostasis and function of B cells through NK cell-derived interferon-gamma. *Cell. Immunol.* *258*, 59–64.
- Gillgrass, A., Gill, N., Babian, A., and Ashkar, A.A. (2014). The absence or overexpression of IL-15 drastically alters breast cancer metastasis via effects on NK cells, CD4 T cells, and macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 6184–6191.
- Giri, J.G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L.S., Cosman, D., and Anderson, D. (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* *13*, 2822–2830.

- Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L.S., and Anderson, D.M. (1995). Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.* *14*, 3654–3663.
- Gordy, L.E., Bezbradica, J.S., Flyak, A.I., Spencer, C.T., Dunkle, A., Sun, J., Stanic, A.K., Boothby, M.R., He, Y.-W., Zhao, Z., et al. (2011). IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 6335–6345.
- Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., and Ahdieh, M. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* *264*, 965–968.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* *2*, 882–888.
- Guo, Y., Luan, L., Rabacal, W., Bohannon, J.K., Fensterheim, B.A., Hernandez, A., and Sherwood, E.R. (2015). IL-15 Superagonist-Mediated Immunotoxicity: Role of NK Cells and IFN- γ . *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 2353–2364.
- Han, K., Zhu, X., Liu, B., Jeng, E., Kong, L., Yovandich, J.L., Vyas, V.V., Marcus, W.D., Chavaillaz, P.-A., Romero, C.A., et al. (2011). IL-15:IL-15 receptor alpha superagonist complex: High-level co-expression in recombinant mammalian cells, purification and characterization. *Cytokine* *56*, 804–810.
- Hayakawa, Y., Huntington, N.D., Nutt, S.L., and Smyth, M.J. (2006). Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol. Rev.* *214*, 47–55.
- Hirose, K., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitani, A., Washizu, J., Matsuguchi, T., and Yoshikai, Y. (1998). Interleukin-15 May Be Responsible for Early Activation of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes after Oral Infection with *Listeria monocytogenes* in Rats. *Infect. Immun.* *66*, 5677–5683.
- Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* *206*, 25–34.
- Jiang, S., Game, D.S., Davies, D., Lombardi, G., and Lechler, R.I. (2005). Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? *Eur. J. Immunol.* *35*, 1193–1200.
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Suzuki, T., Miyagi, T., and Hayashi, N. (2003). Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 5423–5429.
- Karmakar, S., Kay, J., and Gravallesse, E.M. (2010). Bone Damage in Rheumatoid Arthritis – Mechanistic Insights and Approaches to Prevention. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* *36*, 385–404.
- Kato, H., and Enjyoji, K. (1991). Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine beta 2 glycoprotein I: the presence of five Sushi domains. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 11687–11694.
- Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* *191*, 771–780.
- Kim, H.P., Imbert, J., and Leonard, W.J. (2006). Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* *17*, 349–366.

- Kim, T.-J., Kim, M., Kim, H.M., Lim, S.A., Kim, E.-O., Kim, K., Song, K.H., Kim, J., Kumar, V., Yee, C., et al. (2014). Homotypic NK cell-to-cell communication controls cytokine responsiveness of innate immune NK cells. *Sci. Rep.* *4*, 7157.
- Kim, Y.S., Maslinski, W., Zheng, X.X., Stevens, A.C., Li, X.C., Tesch, G.H., Kelley, V.R., and Strom, T.B. (1998). Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc gamma2a protein blocks delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 5742–5748.
- Kirman, I., and Nielsen, O.H. (1996). Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* *91*, 1789–1794.
- Klatzmann, D., and Abbas, A.K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 283–294.
- Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H.T., McDonough, S.M., Bindra, B., Alyea, E.P., Armand, P., Cutler, C., Ho, V.T., Treister, N.S., et al. (2011). Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2055–2066.
- Kroemer, A., Xiao, X., Degauque, N., Edtinger, K., Wei, H., Demirci, G., and Li, X.C. (2008). The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 7818–7826.
- Kündig, T.M., Schorle, H., Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., and Horak, I. (1993). Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* *262*, 1059–1061.
- Kuziel, W.A., and Greene, W.C. (1990). Interleukin-2 and the IL-2 receptor: new insights into structure and function. *J. Invest. Dermatol.* *94*, 27S–32S.
- Lages, C.S., Suffia, I., Velilla, P.A., Huang, B., Warshaw, G., Hildeman, D.A., Belkaid, Y., and Chougnet, C. (2008). Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 1835–1848.
- Lebrec, H., Horner, M.J., Gorski, K.S., Tsuji, W., Xia, D., Pan, W.-J., Means, G., Pietz, G., Li, N., Retter, M., et al. (2013). Homeostasis of human NK cells is not IL-15 dependent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 5551–5558.
- van Leeuwen, E.M.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (2009). Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 167–172.
- Lefrancois, L. (1991). Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *147*, 1746–1751.
- Lehours, P., Raher, S., Dubois, S., Guo, J., Godard, A., and Jacques, Y. (2000). Subunit structure of the high and low affinity human interleukin-15 receptors. *Eur. Cytokine Netw.* *11*, 207–215.
- Leroy, S., Dubois, S., Tenaud, I., Chebassier, N., Godard, A., Jacques, Y., and Dréno, B. (2001). Interleukin-15 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *Br. J. Dermatol.* *144*, 1016–1023.
- Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K.T., Bembas, K., Tao, R., Basu, S., Riley, J.L., Hancock, W.W., Shen, Y., et al. (2007). FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4571–4576.
- Liu, Z., Geboes, K., Colpaert, S., D’Haens, G.R., Rutgeerts, P., and Ceuppens, J.L. (2000). IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 3608–3615.

- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669–676.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503–517.
- Ma, A., Koka, R., and Burkett, P. (2006). Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 657–679.
- Ma, L.J., Acero, L.F., Zal, T., and Schluns, K.S. (2009). Trans-presentation of IL-15 by intestinal epithelial cells drives development of CD8 α IELs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 1044–1054.
- Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannerée, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J.-J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E.A., et al. (2010). IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* 120, 2131–2143.
- Malkovský, M., and Sondel, P.M. (1987). Interleukin 2 and its receptor: structure, function and therapeutic potential. *Blood Rev.* 1, 254–266.
- Matikainen, S., Sareneva, T., Ronni, T., Lehtonen, A., Koskinen, P.J., and Julkunen, I. (1999). Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2R α , c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood* 93, 1980–1991.
- Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 1179–1187.
- McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S., and Cassatella, M.A. (1998). Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 92, 4828–4835.
- McInnes, I.B., al-Mughales, J., Field, M., Leung, B.P., Huang, F.P., Dixon, R., Sturrock, R.D., Wilkinson, P.C., and Liew, F.Y. (1996a). The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2, 175–182.
- McInnes, I.B., Al-Mughales, J., Field, M., Leung, B.P., Huang, F., Dixon, R., Sturrock, R.D., Wilkinson, P.C., and Liew, F.Y. (1996b). The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2, 175–182.
- McInnes, I.B., Al-Mughales, J., Field, M., Leung, B.P., Huang, F., Dixon, R., Sturrock, R.D., Wilkinson, P.C., and Liew, F.Y. (1996c). The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2, 175–182.
- Meazza, R., Verdiani, S., Biassoni, R., Coppolecchia, M., Gaggero, A., Orengo, A.M., Colombo, M.P., Azzarone, B., and Ferrini, S. (1996). Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 12, 2187–2192.
- Meazza, R., Lollini, P.L., Nanni, P., De Giovanni, C., Gaggero, A., Comes, A., Cilli, M., Di Carlo, E., Ferrini, S., and Musiani, P. (2000). Gene transfer of a secretable form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response. *Int. J. Cancer* 87, 574–581.
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., et al. (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D

signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21, 357–366.

Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., and Taniguchi, T. (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 245–268.

Miranda-Carús, M.-E., Benito-Miguel, M., Balsa, A., Cobo-Ibáñez, T., Pérez De Ayala, C., Pascual-Salcedo, D., and Martín-Mola, E. (2006). Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum.* 54, 1151–1164.

Mishra, A., Liu, S., Sams, G.H., Curphey, D.P., Santhanam, R., Rush, L.J., Schaefer, D., Falkenberg, L.G., Sullivan, L., Jaronyk, L., et al. (2012). Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell* 22, 645–655.

Mitra, S., Ring, A.M., Amarnath, S., Spangler, J.B., Li, P., Ju, W., Fischer, S., Oh, J., Spolski, R., Weiskopf, K., et al. (2015). Interleukin-2 activity can be fine tuned with engineered receptor signaling clamps. *Immunity* 42, 826–838.

Moraes-Vasconcelos, D., Costa-Carvalho, B.T., Torgerson, T.R., and Ochs, H.D. (2008). Primary immune deficiency disorders presenting as autoimmune diseases: IPEX and APECED. *J. Clin. Immunol.* 28 *Suppl 1*, S11-19.

Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., and Gallo, R. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007–1008.

Mortier, E., Bernard, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2004). Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 1681–1688.

Mortier, E., Quémener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grötzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2006). Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 281, 1612–1619.

Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S., and Ma, A. (2008). IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J. Exp. Med.* 205, 1213–1225.

Mrózek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M.A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 2632–2640.

Mueller, Y.M., Do, D.H., Altork, S.R., Artlett, C.M., Gracely, E.J., Katsetos, C.D., Legido, A., Villinger, F., Altman, J.D., Brown, C.R., et al. (2008). IL-15 treatment during acute SIV infection increases viral set point and accelerates disease progression despite the induction of stronger SIV-specific CD8+ T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 350–360.

Musso, T., Calosso, L., Zucca, M., Millesimo, M., Ravarino, D., Giovarelli, M., Malavasi, F., Ponzi, A.N., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. (1999). Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 93, 3531–3539.

Nishimura, H., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Grabstein, K.H., Paxton, R., Sugamura, K., Bluestone, J.A., and Yoshikai, Y. (1996). IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 156, 663–669.

- Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W., and Leonard, W.J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73, 147–157.
- Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T.A., Taniguchi, T., and Taki, S. (1998). Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391, 700–703.
- Ogata, Y., Kukita, A., Kukita, T., Komine, M., Miyahara, A., Miyazaki, S., and Kohashi, O. (1999). A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 2754–2760.
- Onu, A., Pohl, T., Krause, H., and Bulfone-Paus, S. (1997). Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 158, 255–262.
- Oppenheimer-Marks, N., Brezinschek, R.I., Mohamadzadeh, M., Vita, R., and Lipsky, P.E. (1998). Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo. *J. Clin. Invest.* 101, 1261–1272.
- Ozaki, K., and Leonard, W.J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J. Biol. Chem.* 277, 29355–29358.
- Park, C.-S., Yoon, S.-O., Armitage, R.J., and Choi, Y.S. (2004). Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 6676–6683.
- Park, M.K., Her, Y.-M., Cho, M.L., Oh, H.-J., Park, E.-M., Kwok, S.-K., Ju, J.H., Park, K.S., Min, D.-S., Kim, H.-Y., et al. (2011). IL-15 promotes osteoclastogenesis via the PLD pathway in rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* 139, 42–51.
- Pei, Y., Zhu, P., Dang, Y., Wu, J., Yang, X., Wan, B., Liu, J.O., Yi, Q., and Yu, L. (2008). Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser647 in response to CD28 costimulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 222–229.
- Perera, P.-Y., Lichy, J.H., Waldmann, T.A., and Perera, L.P. (2012). The role of Interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 14, 247–261.
- Pillet, A.-H., Bugault, F., Thèze, J., Chakrabarti, L.A., and Rose, T. (2009). A programmed switch from IL-15- to IL-2-dependent activation in human NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 6267–6277.
- Ratthe, C. (2004). Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15R chain. *J. Leukoc. Biol.* 76, 162–168.
- Reinecker, H.C., MacDermott, R.P., Mirau, S., Dignass, A., and Podolsky, D.K. (1996). Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 111, 1706–1713.
- Rhode, P.R., Egan, J.O., Xu, W., Hong, H., Webb, G.M., Chen, X., Liu, B., Zhu, X., Wen, J., You, L., et al. (2016). Comparison of the Superagonist Complex, ALT-803, to IL15 as Cancer Immunotherapeutics in Animal Models. *Cancer Immunol. Res.* 4, 49–60.
- Ring, A.M., Lin, J.-X., Feng, D., Mitra, S., Rickert, M., Bowman, G.R., Pande, V.S., Li, P., Moraga, I., Spolski, R., et al. (2012). Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat. Immunol.* 13, 1187–1195.

- Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715–6723.
- Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., and Jabri, B. (2001). NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 5527–5530.
- Rodriguez, A.R., Arulanandam, B.P., Hodara, V.L., McClure, H.M., Cobb, E.K., Salas, M.T., White, R., and Murthy, K.K. (2007). Influence of interleukin-15 on CD8+ natural killer cells in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees. *J. Gen. Virol.* 88, 641–651.
- Rubinstein, M.P., Kovar, M., Purton, J.F., Cho, J.-H., Boyman, O., Surh, C.D., and Sprent, J. (2006). Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9166–9171.
- Ruchatz, H., Leung, B.P., Wei, X.Q., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (1998). Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 5654–5660.
- Russell, S.M., Johnston, J.A., Noguchi, M., Kawamura, M., Bacon, C.M., Friedmann, M., Berg, M., McVicar, D.W., Witthuhn, B.A., and Silvennoinen, O. (1994). Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* 266, 1042–1045.
- Sabatos, C.A., Doh, J., Chakravarti, S., Friedman, R.S., Pandurangi, P.G., Tooley, A.J., and Krummel, M.F. (2008). A Synaptic Basis for Paracrine Interleukin-2 Signaling during homotypic T cell interaction. *Immunity* 29, 238–248.
- Saikh, K.U., Khan, A.S., Kissner, T., and Ulrich, R.G. (2001). IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 126, 447–455.
- Sakai, T., Kusugami, K., Nishimura, H., Ando, T., Yamaguchi, T., Ohsuga, M., Ina, K., Enomoto, A., Kimura, Y., and Yoshikai, Y. (1998). Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 114, 1237–1243.
- Sato, N., Patel, H.J., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2007). The IL-15/IL-15R α on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 588–593.
- Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X., and Lefrançois, L. (2002). Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 4827–4831.
- Schluns, K.S., Nowak, E.C., Cabrera-Hernandez, A., Puddington, L., Lefrançois, L., and Aguila, H.L. (2004). Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor α expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5616–5621.
- Schorle, H., Holtschke, T., Hünig, T., Schimpl, A., and Horak, I. (1991a). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352, 621–624.
- Schorle, H., Holtschke, T., Hünig, T., Schimpl, A., and Horak, I. (1991b). Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 352, 621–624.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–136.
- Shi, R., Yang, J., Jaramillo, A., Steward, N.S., Aloush, A., Trulock, E.P., Alexander Patterson, G., Suthanthiran, M., and Mohanakumar, T. (2004). Correlation between interleukin-15 and granzyme B expression and acute lung allograft rejection. *Transpl. Immunol.* 12, 103–108.

- Shibuya, H., Yoneyama, M., Nakamura, Y., Harada, H., Hatakeyama, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., White, R., and Taniguchi, T. (1990). The human interleukin-2 receptor beta-chain gene: genomic organization, promoter analysis and chromosomal assignment. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3697–3703.
- Shinozaki, M., Hirahashi, J., Lebedeva, T., Liew, F.Y., Salant, D.J., Maron, R., and Kelley, V.R. (2002). IL-15, a survival factor for kidney epithelial cells, counteracts apoptosis and inflammation during nephritis. *J. Clin. Invest.* *109*, 951–960.
- Smith, M.R., and Greene, W.C. (1989). The same 50-kDa cellular protein binds to the negative regulatory elements of the interleukin 2 receptor alpha-chain gene and the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 8526–8530.
- Smith, X.G., Bolton, E.M., Ruchatz, H., Wei, X., Liew, F.Y., and Bradley, J.A. (2000). Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 3444–3450.
- Sneller, M.C., Kopp, W.C., Engelke, K.J., Yovandich, J.L., Creekmore, S.P., Waldmann, T.A., and Lane, H.C. (2011). IL-15 administered by continuous infusion to rhesus macaques induces massive expansion of CD8+ T effector memory population in peripheral blood. *Blood* *118*, 6845–6848.
- Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., et al. (2009). Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.* *83*, 3719–3733.
- Steinke, J.W., and Borish, L. (2006). 3. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* *117*, S441–445.
- Stoklasek, T.A., Schluns, K.S., and Lefrançois, L. (2006). Combined IL-15/IL-15R α Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 6072–6080.
- Strehlau, J., Pavlakis, M., Lipman, M., Maslinski, W., Shapiro, M., and Strom, T.B. (1996). The intra-graft gene activation of markers reflecting T-cell-activation and -cytotoxicity analyzed by quantitative RT-PCR in renal transplantation. *Clin. Nephrol.* *46*, 30–33.
- Sun, H., and Liu, D. (2016). IL-15/sIL-15R α gene transfer suppresses Lewis lung cancer growth in the lungs, liver and kidneys. *Cancer Gene Ther.* *23*, 54–60.
- Suzuki, H., Duncan, G.S., Takimoto, H., and Mak, T.W. (1997). Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J. Exp. Med.* *185*, 499–505.
- Tagaya, Y., Bamford, R.N., DeFilippis, A.P., and Waldmann, T.A. (1996). IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* *4*, 329–336.
- Takano, M., Nishimura, H., Kimura, Y., Mokuno, Y., Washizu, J., Itohara, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y. (1998). Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in *Escherichia coli* infection in mice. *Infect. Immun.* *66*, 3270–3278.
- Tamzalit, F., Barbieux, I., Plet, A., Heim, J., Nedellec, S., Morisseau, S., Jacques, Y., and Mortier, E. (2014). IL-15/IL-15R α complex shedding following trans-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 8565–8570.

- Tanaka, T., Nagasaka, Y., Kitamura, F., Kuida, K., Suwa, H., and Miyasaka, M. (1993). The role of the interleukin-2 (IL-2)/IL-2 receptor pathway in MRL/lpr lymphadenopathy: the expanded CD4-8- T cell subset completely lacks functional IL-2 receptors. *Eur. J. Immunol.* *23*, 1378–1380.
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., and Hamuro, J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* *302*, 305–310.
- Tavernier, J., Tuypens, T., Verhee, A., Plaetinck, G., Devos, R., Van der Heyden, J., Guisez, Y., and Oefner, C. (1995). Identification of receptor-binding domains on human interleukin 5 and design of an interleukin 5-derived receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5194–5198.
- de Toter, D., Meazza, R., Capaia, M., Fabbi, M., Azzarone, B., Balleari, E., Gobbi, M., Cutrona, G., Ferrarini, M., and Ferrini, S. (2008). The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways. *Blood* *111*, 517–524.
- Tourkova, I.L., Yurkovetsky, Z.R., Gambotto, A., Makarenkova, V.P., Perez, L., Balkir, L., Robbins, P.D., Shurin, M.R., and Shurin, G.V. (2002). Increased function and survival of IL-15-transduced human dendritic cells are mediated by up-regulation of IL-15R α and Bcl-2. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 1037–1045.
- Trentin, L., Cerutti, A., Zambello, R., Sancretta, R., Tassinari, C., Facco, M., Adami, F., Rodeghiero, F., Agostini, C., and Semenzato, G. (1996). Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood* *87*, 3327–3335.
- Tsai, E.Y., Jain, J., Pesavento, P.A., Rao, A., and Goldfeld, A.E. (1996). Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 459–467.
- Van Beneden, K., De Creus, A., Stevenaert, F., Debacker, V., Plum, J., and Leclercq, G. (2002). Expression of inhibitory receptors Ly49E and CD94/NKG2 on fetal thymic and adult epidermal TCR V gamma 3 lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 3295–3302.
- Vázquez, N., Walsh, T.J., Friedman, D., Chanock, S.J., and Lyman, C.A. (1998). Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect. Immun.* *66*, 145–150.
- Villadsen, L.S., Schuurman, J., Beurskens, F., Dam, T.N., Dagnæs-Hansen, F., Skov, L., Rygaard, J., Voorhorst-Ogink, M.M., Gerritsen, A.F., van Dijk, M.A., et al. (2003). Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J. Clin. Invest.* *112*, 1571–1580.
- Vincent, M., Quémener, A., and Jacques, Y. (2013). Antitumor activity of an immunocytokine composed of an anti-GD2 antibody and the IL-15 superagonist RLI. *Oncoimmunology* *2*.
- Vosshenrich, C.A.J., Ranson, T., Samson, S.I., Corcuff, E., Colucci, F., Rosmaraki, E.E., and Di Santo, J.P. (2005). Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 1213–1221.
- Waldmann, T.A. (1989). The Multi-Subunit Interleukin-2 Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* *58*, 875–905.
- Waldmann, T.A. (2015). The shared and contrasting roles of IL2 and IL15 in the life and death of normal and neoplastic lymphocytes: implications for cancer therapy. *Cancer Immunol. Res.* *3*, 219–227.
- Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 19–49.

- Waldmann, T.A., Conlon, K.C., Stewart, D.M., Worthy, T.A., Janik, J.E., Fleisher, T.A., Albert, P.S., Figg, W.D., Spencer, S.D., Raffeld, M., et al. (2013). Phase 1 trial of IL-15 trans presentation blockade using humanized Mik-Beta-1 mAb in patients with T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Blood* *121*, 476–484.
- Walsh, S.T.R. (2012). Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. *Immunol. Rev.* *250*, 303–316.
- Wei Xq, null, Orchardson, M., Gracie, J.A., Leung, B.P., Gao Bm, null, Guan, H., Niedbala, W., Paterson, G.K., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2001). The Sushi domain of soluble IL-15 receptor alpha is essential for binding IL-15 and inhibiting inflammatory and allogenic responses in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *167*, 277–282.
- Wilkinson, P.C., and Liew, F.Y. (1995). Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J. Exp. Med.* *181*, 1255–1259.
- Winn, R.M., Gil-Lamaignere, C., Roilides, E., Simitsopoulou, M., Lyman, C.A., Maloukou, A., and Walsh, T.J. (2003). Selective effects of interleukin (IL)-15 on antifungal activity and IL-8 release by polymorphonuclear leukocytes in response to hyphae of *Aspergillus* species. *J. Infect. Dis.* *188*, 585–590.
- Wong, H.C., Jeng, E.K., and Rhode, P.R. (2013). The IL-15-based superagonist ALT-803 promotes the antigen-independent conversion of memory CD8(+) T cells into innate-like effector cells with antitumor activity. *Oncoimmunology* *2*, e26442.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., et al. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* *126*, 375–387.
- Wu, Z., Johnson, K.W., Goldstein, B., Choi, Y., Eaton, S.F., Laue, T.M., and Ciardelli, T.L. (1995). Solution assembly of a soluble, heteromeric, high affinity interleukin-2 receptor complex. *J. Biol. Chem.* *270*, 16039–16044.
- Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengère, L.E., Wakeham, A.C., Bouchard, D., Kong, Y.Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., et al. (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* *8*, 115–124.
- Yoshihara, K., Yajima, T., Kubo, C., and Yoshikai, Y. (2006). Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Gut* *55*, 334–341.
- Yu, A., Zhu, L., Altman, N.H., and Malek, T.R. (2009). A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* *30*, 204–217.
- Yu, A., Snowwhite, I., Vendrame, F., Rosenzweig, M., Klatzmann, D., Pugliese, A., and Malek, T.R. (2015). Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Diabetes* *64*, 2172–2183.
- Zambello, R., Facco, M., Trentin, L., Sancetta, R., Tassinari, C., Perin, A., Milani, A., Pizzolo, G., Rodeghiero, F., Agostini, C., et al. (1997). Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* *89*, 201–211.
- Zhang, T., Bai, X., and Mao, X. (2013). Systemic delivery of small interfering RNA targeting the interleukin-2/15 receptor β chain prevents disease progression in experimental arthritis. *PLoS One* *8*, e78619.

Zheng, X.X., Gao, W., Donskoy, E., Neuberg, M., Ruediger, M., Strom, T.B., and Moll, T. (2006). An Antagonist Mutant IL-15/Fc Promotes Transplant Tolerance. *Transplantation* 81, 109–116.

Zumwalde, N.A., Domaie, E., Mescher, M.F., and Shimizu, Y. (2013). ICAM-1-dependent homotypic aggregates regulate CD8 T cell effector function and differentiation during T cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 3681–3693.

Annexe

Auteurs du brevet : Erwan MORTIER (25%), Yannick JACQUES (25%), Sébastien MORISSEAU (25%) et Dihia MEGHNEM (25%)



Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000311196	
Application number	EP15306418.3	
File No. to be used for priority declarations	EP15306418	
Date of receipt	16 September 2015	
Your reference	MORTIER15227MC	
Applicant	INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	
Country	FR	
Title	SPECIFIC INTERLEUKIN-15 (IL-15) ANTAGONIST POLYPEPTIDE AND USES THEREOF FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY AND AUTO-IMMUNE DISEASES	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdfText_15227EP.pdf (27 p.) SEQLTXT.txtSequencesASCII_15227EP_ST25.txt	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdfDrawings_15227EP.pdf (10 p.)
Submitted by	EMAIL=propriete@inserm-transfert.fr,CN=Denise HIRSCH,O=INSERM TRANSFERT,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	16 September 2015, 10:20:03 (CEST)	
Official Digest of Submission	2F:C5:87:BF:44:B1:F5:EF:D8:F9:B0:B2:8F:CA:C7:62:9A:CF:51:3C	

/INPI, section dépôt/

Thèse de Doctorat

Dihia MEGHNEM

Développement de nouveaux antagonistes de l'interleukine-15

Development of new antagonists of interleukin-15

Résumé

L'IL-15 et l'IL-2 sont deux cytokines fonctionnellement très proches et sont nécessaires à l'activation et la prolifération des cellules immunitaires telles que les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. Le rôle activateur de l'IL-15 et de l'IL-2 fait de celles-ci deux acteurs importants dans les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires. Dans cette étude, nous avons développé un premier antagoniste nommé NANTIL-15 qui se fixe au récepteur IL-15Ra mais ne recrute pas la chaîne IL-15Rb et inhibe spécifiquement l'IL-15. Le NANTIL-15 n'affecte pas l'homéostasie des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ chez la souris. Dans un modèle murin d'arthrite, le NANTIL-15 réduit les signes cliniques et le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ dans le site inflammatoire. Le deuxième antagoniste développé est nommé BiG et se fixe au récepteur IL-2/15Rb avec une haute affinité mais ne recrute pas la chaîne IL-2/15Rg. BiG inhibe les fonctions effectrices de l'IL-15 et de l'IL-2 sur les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. En présence de la chaîne IL-2Ra, BiG n'a aucun impact sur les fonctions de l'IL-2 sur les cellules T-reg. Ainsi BiG favorise le ratio régulateur/effecteur du système immunitaire. Dans un modèle murin de greffe de peau, BiG permet de ralentir le rejet des greffons. Enfin des travaux réalisés sur la lignée de cellules humaines NK-92 et les cellules NK humaines primaires, ont permis de mettre en évidence une « *trans*-présentation homotypique » de l'IL-15. En effet les cellules NK chargées avec l'IL-15 et non l'IL-2, *trans*-présentent cette IL-15 aux cellules NK voisines. Ce travail a également montré que cette *trans*-présentation homotypique est dépendante du contact physique entre les cellules et impliquerait les molécules d'adhésion tel que LFA-1.

Mots clés

cytokines, interleukine-15, interleukine-2, *trans*-présentation, inflammation, tolérance, *trans*-présentation homotypique, molécule d'adhésion.

Abstract

IL-15 and IL-2 are cytokines which, functionally speaking, are very close. They are necessary for the activation and proliferation of immune cells such as NK cells and CD8⁺ T lymphocytes. The activator role of IL-15 and IL-2 is a major player in the autoimmune and inflammatory diseases. In this study, we developed a first antagonist named NANTIL-15, which binds to IL-15Ra receptor but does not recruit the IL-2/15Rb chain and specifically inhibits IL-15 induced activation. NANTIL-15 has no effect on the homeostasis of NK cells and CD8⁺ T cells in mice. In a mouse model of arthritis, NANTIL-15 reduced the clinical signs and the recruitment of CD8⁺ T cells into the inflammatory site. The second antagonist we developed, called BiG, binds to the IL-2/15Rb receptor with high affinity but does not recruit the IL-2/15Rg chain. BiG inhibits the effector functions of IL-15 and IL-2 on NK cells and CD8⁺ T lymphocytes. In the presence of the IL-2Ra chain, BiG has no impact on the functions of IL-2 on T-reg cells. Thus BiG promotes the regulator/effector ratio in the immune system. In a mouse model of skin grafting, BiG delayed the graft rejection. Finally the work done on human cell line NK-92 and primary human NK cells highlighted a "homotypic *trans*-presentation" of IL-15. Indeed, NK cells loaded with IL-15, but not IL-2, can *trans*-present this IL-15 to neighboring NK cells. This work also showed that this homotypic *trans*-presentation is dependent on physical contact between NK cells, and involves adhesion molecules such as LFA-1.

Key Words

cytokines, interleukin-15, interleukin-2, antagonist, *trans*-presentation, inflammation, tolerance, homotypic *trans*-presentation, adhesion molecule.