

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCTION.....	- 2 -
I. Les cytokines et leurs récepteurs	- 3 -
A. Généralités	- 3 -
1. Les cytokines.....	- 3 -
2. Les récepteurs de cytokines.....	- 4 -
3. Cas des cytokines hématopoïétiques.....	- 6 -
B. La famille des cytokines γ_c	- 9 -
1. Les cytokines γ_c	- 9 -
2. Les récepteurs des cytokines γ_c	- 10 -
3. Les voies de signalisation.....	- 11 -
4. Les autres mécanismes de transduction du signal.....	- 13 -
II. Biologie du système IL-15/IL-15R	- 15 -
A. L'interleukine-15	- 15 -
1. Caractéristiques de l'IL-15.....	- 15 -
<i>Le gène et les messagers de l'IL-15</i>	- 15 -
<i>La protéine IL-15</i>	- 17 -
2. Expression de l'IL-15.....	- 19 -
<i>Sites d'expression de l'IL-15</i>	- 19 -
<i>Régulation de l'expression de l'IL-15</i>	- 19 -
B. Les chaînes réceptrices de l'IL-15	- 23 -
1. La chaîne γ_c	- 23 -
2. La chaîne IL-15R β	- 24 -
<i>Le gène et les messagers de l'IL-15Ra</i>	- 25 -
<i>La protéine IL-15Ra sous forme membranaire ou soluble</i>	- 27 -
<i>Sites d'expression et régulation de l'IL-15Ra</i>	- 28 -
C. Les récepteurs et les voies de signalisation de l'IL-15	- 30 -
1. Récepteurs et modes de présentation de l'IL-15.....	- 30 -
<i>Récepteur d'affinité intermédiaire</i>	- 30 -

<i>Récepteurs de haute affinité</i>	- 30 -
<i>Cis- et trans-présentation de l'IL-15</i>	- 30 -
2. Signalisation par le récepteur IL-15R β / γ_c	- 32 -
3. Signalisation par la chaîne IL-15R α	- 34 -
4. Rétro-signalisation de l'IL-15.....	- 35 -
D. Les fonctions biologiques de l'IL-15	- 36 -
1. Les fonctions de l'IL-15 dans un contexte physiologique.....	- 36 -
<i>Les fonctions de l'IL-15 dans le système immunitaire</i>	- 36 -
2. Les fonctions de l'IL-15 dans un contexte pathologique.....	- 40 -
<i>Infections virales et microbiennes</i>	- 40 -
<i>Pathologies auto-immunes et inflammatoires</i>	- 41 -
<i>Cancers</i>	- 42 -
<i>Autres pathologies</i>	- 43 -
3. Le système IL-15/IL-15R en thérapie	- 44 -
<i>Immunothérapie potentielle par l'IL-15</i>	- 44 -
<i>Immunothérapie potentielle par blocage de l'IL-15</i>	- 46 -
<i>Le système IL-15/IL-15R, un nouveau bio-marqueur diagnostique ?</i>	- 47 -
OBJECTIFS GÉNÉRAUX	- 49 -
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	- 50 -
PARTIE I : Optimisation de la production de l'IL-15 en système baculovirus-cellules d'insecte et application à la production de deux antagonistes de l'IL-15	- 52 -
A. Introduction	- 52 -
1. Contexte d'étude.....	- 52 -
2. Méthodes	- 53 -
3. Caractérisation de deux antagonistes de l'IL-15	- 54 -
B. Résultats	- 55 -
1. Présentation de la séquence de l'IL-15	- 55 -
2. Étapes d'optimisation de la séquence de l'IL-15 par mutagenèse dirigée	- 56 -
<i>Optimisation de la transcription</i>	- 57 -
<i>Optimisation de la traduction</i>	- 57 -
<i>Optimisation de la sécrétion</i>	- 59 -
3. Bilan des optimisations et comparaison des productions brutes des différents mutants de l'IL-15.....	- 61 -
<i>Bilan des optimisations</i>	- 61 -
4. Production optimisée de l'IL-15 et caractérisation de la protéine	- 63 -
<i>Production de l'IL-15 optimisée</i>	- 63 -
5. Application à la production de deux antagonistes de l'IL-15	- 67 -
<i>Production optimisée des antagonistes IL-15/N65K et IL-15/L69R</i>	- 67 -

C. Conclusions et discussion	- 71 -
PARTIE II : Étude de l'association IL-15/IL-15Rα	- 78 -
A. Étude des ponts disulfures de l'IL-15	- 79 -
1. Contexte d'étude.....	- 79 -
2. Résultats.....	- 81 -
<i>Construction de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure</i>	- 81 -
<i>Production de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure</i>	- 83 -
<i>Purification des mutants de l'IL-15 sans pont disulfure et caractérisation des protéines</i> -	85
-	-
<i>Caractérisation biologique in vitro des mutants de l'IL-15 sans pont disulfure</i>	- 86 -
3. Bilan.....	- 88 -
B. Étude de protéines de fusion entre l'IL-15 et l'IL-15R	- 89 -
1. Contexte d'étude.....	- 89 -
2. Résultats.....	- 91 -
<i>Construction de protéines de fusion IL-15/IL-15Ra à linker « court »</i>	- 91 -
<i>Production de protéines de fusion IL-15/IL-15Ra à linker « court »</i>	- 92 -
<i>Purification et caractérisation des protéines de fusion à linker « court »</i>	- 93 -
<i>Caractérisation biologique in vitro des protéines de fusion à linker « court »</i>	- 95 -
3. Bilan.....	- 96 -
C. Conclusions et discussion	- 97 -
PARTIE III : Cis- et trans-présentation de l'IL-15 et analyse des dynamiques d'activation de l'IL-15R	- 103 -
A. Introduction	- 103 -
B. Résultats	- 105 -
1. Différentes propriétés de liaison aux récepteurs à l'IL-15	- 105 -
2. Cinétiques d'expression des chaînes réceptrices membranaires et d'internalisation des cytokines	- 106 -
<i>Cinétiques d'expression des chaînes réceptrices IL-15Ra et IL-15Rβ</i>	- 106 -
<i>Cinétiques d'internalisation de l'IL-15 et du RLI</i>	- 107 -
3. Étude des voies de signalisation de manières temps- et concentrations-dépendantes	- 109 -
4. Caractérisation de l'effet persistant du RLI comparé à l'IL-15	- 112 -
<i>Effet persistant du RLI sur la prolifération résiduelle des cellules Kit225</i>	- 112 -
<i>Effet persistant du RLI sur la transduction du signal après une nouvelle stimulation cytokinique</i>	- 113 -
C. Conclusions et discussion	- 114 -
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	- 119 -
MATÉRIELS ET MÉTHODES	- 123 -
I. Matériels	- 123 -

<i>Cytokines recombinantes</i>	- 123 -
<i>Anticorps</i>	- 123 -
<i>Lignées cellulaires</i>	- 124 -
II. Méthodes	- 125 -
<i>Mutagenèse de l'IL-15 et de ses mutants antagonistes</i>	- 125 -
<i>Production de protéines recombinantes par transfection transitoire de cellules 293-EBNA</i> .	- 125 -
<i>Production de protéines recombinantes en système baculovirus-Sf9</i>	- 125 -
<i>Purification des protéines produites en système baculovirus-Sf9</i>	- 126 -
<i>Dosage ELISA des protéines recombinantes</i>	- 127 -
<i>Analyse de la pureté des protéines recombinantes par électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie ou Western-Blot</i>	- 127 -
<i>Prolifération cellulaire</i>	- 127 -
<i>Radiomarquages de l'IL-15 et du RLI</i>	- 128 -
<i>Etude de la liaison à l'équilibre</i>	- 130 -
<i>Inhibition de la liaison à l'équilibre</i>	- 130 -
<i>Internalisation des cytokines</i>	- 130 -
<i>Analyse Western-Blot des voies de signalisation</i>	- 131 -
<i>Analyse de l'expression des chaînes réceptrices par cytométrie en flux</i>	- 131 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 133 -
ANNEXE 1	- 155 -
ANNEXE 2	- 172 -

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Δ : délétion
aa : acide aminé
Ac : anticorps
AcMNPV : baculovirus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*
ADAM : "A Desintegrin And Metalloprotease"
ADCC : "Antibody-Dependent Cellular Toxicity"
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
Akt : "cellular homolog of the v-akt oncogene"
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ASC : Aire Sous la Courbe
b : base nucléotidique
BSA : Albumine Sérique Bovine
CBM : "Cytokine Binding Module"
Chloramine-T : "N-chloro-p-toluène-sulfonamide sodium salt"
CHR : "Cytokine binding Homology Region"
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
cpm : coups par minute
CSF : "Colony Stimulating Factor"
Da : Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DBP : DiButylPhtalate
DETC : "Dendritic Epidermal T Cell"
DMEM : "Dulbecco's Modified Eagle Medium"
EBNA : "Epstein-Barr virus Nuclear Antigen"
EBV : "Epstein-Barr Virus"
EC₅₀ : "Effective Concentration 50 %"
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
ELISA : "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
Erk : "Extracellular signal-Regulated Kinase"
Gab2 : "Grb-associated binder 2"
GFP : "Green Fluorescent Protein"
GM-CSF : "Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor"
Grb2 : "Growth factor Receptor-Bound protein 2"
h : humain
HAM : "HTLV-1 Associated Myelopathy"
HBS : "HEPES Buffered Saline"
HHV : "Human Herpes Virus"
HTLV : "Human T-Lymphotropic Virus"
IC₅₀ : "Inhibitory Concentration 50 %"

ICAM : "*InterCellular Adhesion Molecule*"
IFN : Interferon
Ig : Immunoglobuline
IKDC : "*Interferon-producing Killer Dendritic Cell*"
IL- : Interleukine
IL-15R α : chaîne réceptrice spécifique de l'IL-15
IL-15R β : chaîne réceptrice commune aux IL-2 et IL-15 (IL-2R β , CD122)
ILR : protéine de fusion entre l'IL-15 et le domaine de liaison de l'IL-15R α
IRF-E : "*Interferon Regulatory Factor response Element*"
JAK : "*Janus-Associated Kinase*"
JNK : "*c-Jun N-terminal Kinase*"
k : kilo
K_d : constante de dissociation à l'équilibre
KO : "*Knockout*"
LAK : "*Lymphokine-Activated Killing*"
LFA-1 : "*Leukocyte Function-Associated Antigen-1*"
LPS : lipopolysaccharide
LSP : "*Long Signal Peptide*"
M : concentration molaire
m : murin
MAPK : "*Mitogen-Activated Protein Kinases*"
MC : Maladie de Crohn
MMP : "*Matrix MetalloProtease*"
MOI : "*Multiplicity Of Infection*"
MPC-1 : "*Monocyte Chemotactic Protein-1*"
nc : séquence non codante
NF- κ B : "*Nuclear Factor kappa B*"
NK : "*Natural Killer*"
NK-T : "*Natural Killer-T*" cell
p : phospho
pb : paires de bases
PBMC : "*Peripheral Blood Mononuclear Cell*"
PBS : "*Phosphate Buffer Saline*"
PCR : "*Polymerase Chain Reaction*"
PE : PhycoErythrine
PI3-K : "*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*"
PIP₂ : Phosphatidyl Inositol 4,5-disphosphate
PIP₃ : Phosphatidyl Inositol 3,4,5-trisphosphate
PMA : Phorbol-Myristate Acetate
PPL : Préprolactine
PS : Peptide Signal
Pyk2 : "*Proline-rich tyrosine kinase 2*"
R : récepteur
r : recombinant
RAS : radioactivité spécifique

RCH : Recto-Colite Hémorragique

RLI : protéine de fusion entre le domaine de liaison de l'IL-15R α et l'IL-15

RPMI : "*Roosevelt Park Memorial Institute medium*"

s : soluble

SH2 : "*Src-Homology 2*"

Shc : "*Src homology 2 domain-containing*"

sIL-15R α : forme soluble de la chaîne réceptrice IL-15R α

Sos : "*Son Of Sevenless*"

SSP : "*Short Signal Peptide*"

STAT : "*Signal Transducer and Activator of Transcription*"

SVF : Sérum de Veau Fœtal

Syk : "*Spleen Tyrosine Kinase*"

TACE : "*TNF α Converting Enzyme*"

TCA : Acide TrichloroAcétique

TCR : "*T Cell Receptor*"

TNF α : "*Tumor Necrosis Factor α* "

TRAF2 : "*TNF-R Associated Factor 2*"

TSP : "*Tropical Spastic Paraparesis*"

VIH : Virus de l'Immunodéficiência Humaine

WT : "*Wild Type*"

γ_c : chaîne réceptrice γ commune (CD132)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Groupes ou familles de cytokines.....	- 3 -
Figure 2 : Familles de chaînes réceptrices membranaires des cytokines.....	- 5 -
Figure 3 : Structure commune aux récepteurs de classe I.....	- 7 -
Figure 4 : Familles des récepteurs de cytokines hématopoïétiques.....	- 8 -
Figure 5 : Structure tertiaire des cytokines γ_c	- 9 -
Figure 6 : Les différents récepteurs des cytokines γ_c	- 11 -
Figure 7 : Les différentes voies de transduction du signal des cytokines γ_c	- 13 -
Figure 8 : Modèle du radeau lipidique.....	- 14 -
Figure 9 : Gène, transcription, traduction et maturation protéique de l'IL-15.....	- 16 -
Figure 10 : Caractéristiques protéiques de l'IL-15.....	- 18 -
Figure 11 : La chaîne réceptrice γ_c	- 23 -
Figure 12 : La chaîne réceptrice IL-15R β	- 25 -
Figure 13 : Gène, transcription et traduction de la chaîne IL-15R α	- 26 -
Figure 14 : La chaîne réceptrice IL-15R α	- 28 -
Figure 15 : Les récepteurs fonctionnels et les modes de présentation de l'IL-15.....	- 31 -
Figure 16 : Les voies de signalisation de l'IL-15 par le récepteur IL-15R β / γ_c	- 33 -
Figure 17 : Identification des acides aminés de l'IL-15 impliqués dans la liaison des chaînes réceptrices IL-15R α et IL-15R β	- 54 -
Figure 18 : Séquence de PS PPL-FXa-IL-15 et traduction en acides aminés.....	- 56 -
Figure 19 : Formation de hairpins en région 3' de la séquence codante de l'IL-15.....	- 57 -
Figure 20 : L'intron de la β -globine présente des sites d'épissage consensus.....	- 58 -
Figure 21 : Comparaison de l'usage des codons entre la séquence de PS PPL-FXa-IL-15 et de l'ADN génomique des cellules d'insecte.....	- 59 -
Figure 22 : Schéma bilan des optimisations apportées à la séquence PS PPL-FXa-IL-15.....	- 61 -
Figure 23 : Taux de production bruts des protéines optimisées par rapport au taux de production de PS PPL-FXa-IL-15 (Std).....	- 62 -
Figure 24 : Séquence optimale de l'IL-15 et production brute en système baculovirus-cellules d'insecte.....	- 64 -
Figure 25 : Suivi de purification de la protéine IL-15 optimisée.....	- 65 -
Figure 26 : Caractérisation de l'IL-15 optimisée sur gel natif.....	- 66 -
Figure 27 : Comparaison de l'activité proliférative de l'IL-15 commerciale PeproTech et de l'IL-15 optimisée (Opt.) sur différentes lignées cellulaires.....	- 66 -
Figure 28 : Séquences optimales des antagonistes IL-15/N65K et IL-15/L69R et productions brutes en système baculovirus-cellules d'insecte.....	- 68 -
Figure 29 : Etude de l'activité proliférative et antagoniste des protéines IL-15/N65K et IL-15/L69R optimisés (Opt.) sur différentes lignées cellulaires.....	- 70 -
Figure 30 : Modélisation du complexe IL-15/IL-15R α /IL-15R β / γ_c et représentation de l'IL-4 dans ce complexe.....	- 80 -
Figure 31 : Schématisation en coupe des complexes IL-15/IL-15R α /IL-15R β / γ_c et IL-4/IL-15R α /IL-4R α / γ_c	- 80 -

Figure 32 : Représentation en ruban de l'IL-15 et de ses deux ponts disulfures- 81 -

Figure 33 : Schéma bilan des mutations effectuées pour la construction des mutants de l'IL-15 sans pont disulfure- 83 -

Figure 34 : Purification des mutants de l'IL-15 à un pont disulfure- 85 -

Figure 35 : Comparaison de l'activité proliférative de l'IL-15 commerciale PeproTech et des mutants de l'IL-15 à un pont disulfure sur différentes lignées cellulaires.....- 87 -

Figure 36 : Comparaison de l'inhibition de la liaison de l'IL-15 sur la chaîne IL-15R α par les mutants de l'IL-15 à un pont disulfure.....- 87 -

Figure 37 : Modélisation des deux configurations d'arrimage IL-15/IL-15R α- 89 -

Figure 38 : Détermination du nombre d'acides aminés du linker nécessaire à la réalisation de protéines de fusion IL-15/IL-15R α - 90 -

Figure 39 : Schéma bilan des étapes effectuées pour la construction des protéines de fusion à linker « court »- 92 -

Figure 40 : Suivi de la purification des protéines de fusion- 94 -

Figure 41 : Caractérisation des formes natives des protéines de fusion.....- 95 -

Figure 42 : Comparaison de l'activité proliférative de l'IL-15 commerciale PeproTech et des protéines de fusion sur différentes lignées cellulaires- 95 -

Figure 43 : La protéine de fusion RLI (IL-15R α sushi⁺-Linker-IL-15)- 104 -

Figure 44 : Comparaison de l'activité proliférative des cytokines radiomarquées et non radiomarquées- 105 -

Figure 45 : Propriétés de liaison de l'IL-15 et du RLI sur les cellules Kit225- 106 -

Figure 46 : Expression des chaînes IL-15R α et IL-15R β membranaires après traitement par de l'IL-15 ou du RLI.....- 107 -

Figure 47 : Caractéristiques d'internalisation de l'[¹²⁵I]-IL-15 et de l'[¹²⁵I]-RLI.....- 108 -

Figure 48 : Effet de la concentration en cytokines sur la transduction du signal.....- 109 -

Figure 49 : Cinétiques de transduction du signal induites par l'IL-15 ou le RLI.....- 111 -

Figure 50 : Comparaison de la prolifération résiduelle des cellules Kit225 après stimulation par l'IL-15 ou par le RLI.....- 112 -

Figure 51 : Transduction du signal après re-stimulation cytokinique- 113 -

Figure 52 : Production d'une protéine recombinante en système baculovirus-cellules d'insecte- 126 -

Figure 53 : Système et réaction d'iodation d'une cytokine.....- 128 -

Figure 54 : Modélisation de l'IL-15 et du RLI et représentation des résidus Y accessibles pour la fixation de l'iode radioactive.- 129 -

Tableau 1 : Effets de l'IL-15 sur les cellules immunitaires dépendantes du système IL-15/IL-15R	- 37 -
Tableau 2 : Effets de l'IL-15 sur les autres cellules immunitaires.....	- 38 -
Tableau 3 : Effets de l'IL-15 sur les cellules non immunitaires.....	- 39 -
Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour l'optimisation de la production de l'IL-15	- 60 -
Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés pour la construction de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure.....	- 82 -
Tableau 6 : Taux de productions bruts des protéines IL-15 sans pont disulfure dans différents systèmes de production.....	- 84 -
Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour la réalisation de protéines de fusion présentant un linker de 16 acides aminés.....	- 91 -
Tableau 8 : Taux de productions bruts des protéines de fusion dans le système baculovirus-cellules d'insecte	- 93 -

RÉSUMÉ

Biologie de l'interleukine-15 : de son ADN à ses voies de signalisation

L'interleukine-15 (IL-15) est une puissante cytokine impliquée dans la modulation du système immunitaire, notamment dans l'homéostasie des cellules NK, NK-T et T CD8⁺ mémoires. La signalisation de l'IL-15 est assurée par les chaînes réceptrices IL-15R β et γ_c . La troisième chaîne réceptrice IL-15R α confère la spécificité et la haute affinité pour la cytokine. Dans une première partie, nous avons optimisé génétiquement la production de l'IL-15 dans le système baculovirus-cellules d'insecte. Nous avons produit cette cytokine sous forme active à une concentration dix fois plus élevée. Nous avons également appliqué ces mêmes optimisations à la production de deux antagonistes de l'IL-15. Dans une deuxième partie, nous avons caractérisé la formation du complexe cytokine-chaîne réceptrice α . Nous avons vérifié que le pont disulfure entre les acides aminés C42 et C88 était essentiel à la liaison de l'IL-15R α . Nos travaux ont également suggéré que l'association IL-15/IL-15R α n'était réalisable que dans une seule configuration. Dans une troisième partie, nous avons comparé les mécanismes de *cis*- et *trans*-présentations de l'IL-15. Nous avons montré que ces deux modes d'action généraient différentes cinétiques d'activation de l'IL-15R et de signalisation cellulaire. L'ensemble de ces résultats permettent une meilleure compréhension du système IL-15/IL-15R, étape essentielle à la création et au développement d'immunothérapies basées sur l'utilisation de cytokines.

ABSTRACT

Biology of Interleukin-15: from DNA to Signaling Pathways

Interleukin-15 (IL-15) is a powerful cytokine described as a modulator of the immune system and implicated in the homeostasis of NK, NK-T, and memory CD8⁺ T cells. IL-15 signals are transmitted by the IL-15R β and γ_c receptor chains. The third receptor chain, IL-15R α , confers the specificity and the high affinity for the cytokine. In a first part, we optimized genetically the expression of IL-15 in the baculovirus-insect cells system. We produced this cytokine on an active form and at a ten times higher concentration. We also used these optimizations for the production of antagonists of IL-15. In a second part, we characterized the complex cytokine- α receptor chain. We checked that the disulfide bond between C42 and C88 was essential for IL-15R α binding. Furthermore, our results suggested that the complex IL-15/ IL-15R α could associate in only one configuration. In a third part, we compared IL-15 *cis*- and *trans*-presentation processes. We showed that these two mechanisms lead to different dynamics of receptor activation and signal transduction. These findings collectively allow a greater understanding of the IL-15/IL-15R system, a fundamental step in design and development of immunotherapeutic treatments based on the use of cytokines.

- INTRODUCTION -

INTRODUCTION

La cohésion d'un organisme dépend d'un équilibre fin entre les différents types cellulaires qui le constituent. L'équilibre du système immunitaire repose sur l'interaction entre différents effecteurs, principalement les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules naturelles tueuses ("*Natural Killer*", NK) et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. La communication entre ces différents types cellulaires est assurée et régulée par des contacts directs intercellulaires et/ou par des protéines solubles de faibles poids moléculaires, appelées « cytokines ». Ces dernières sont particulièrement importantes pour les mécanismes de prolifération cellulaire, de différenciation et de survie.

Tout comme les hormones servent de messagers au système endocrine, les cytokines sont les messagers du système immunitaire. Cependant, contrairement aux hormones, les cytokines présentent une pluralité de cellules sources et de cellules cibles. Elles agissent généralement localement via leur fixation sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules immunitaires. On connaît aujourd'hui une centaine de cytokines présentant des caractéristiques variées, parfois redondantes, additives, synergiques ou antagonistes.

I. Les cytokines et leurs récepteurs

A. Généralités

1. Les cytokines

La famille des cytokines regroupe des protéines solubles de 8 à 50 kDa qui présentent peu ou pas de similitudes dans leurs séquences en acides aminés et plusieurs types de structure secondaire. Au fur et à mesure de leur découverte, elles ont été classées selon leurs modes d'action et leurs fonctions biologiques. Ainsi les cytokines sont classées en six groupes ou familles (**Figure 1**) :

- les **interleukines** (IL-)
- les **interférons** (IFNs)
- les **facteurs de nécrose des tumeurs** (TNFs, "*Tumor Necrosis Factors*")
- les **facteurs stimulant les colonies** (CSFs, "*Colony Stimulating Factors*")
- les **facteurs de croissance** (GFs, "*Growth Factors*")
- les **chimiokines**

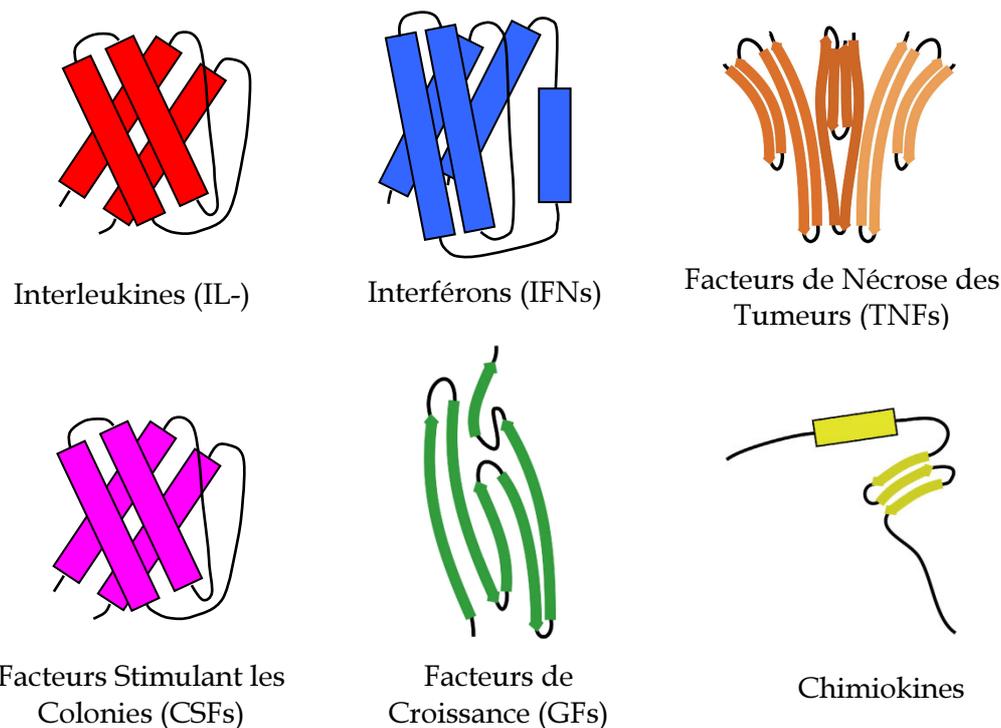


Figure 1 : Groupes ou familles de cytokines

L'ensemble de ces cytokines présente la caractéristique d'être produites en réponse à une stimulation et non pas de manière constitutive. Leur production est généralement rapide, brève, intense et leur sécrétion est immédiate.

La plupart des cytokines entraînent des réactions en cascade et modulent leur propre production de manière autocrine et/ou la production d'autres cytokines par leur cellule cible. Elles présentent une forte redondance fonctionnelle, et, en même temps, une grande diversité d'activités et d'actions.

2. Les récepteurs de cytokines

Les cytokines exercent leur effet biologique via leur fixation sur un récepteur spécifique exprimé à la surface des cellules immunitaires cibles. Les chaînes réceptrices des cytokines présentent des homologies structurales qui ont permis de les classer en neuf familles différentes (**Figure 2**) :

- les **récepteurs de classe I (cytokines hématopoïétiques)** comme la chaîne gp130, la chaîne β commune (β_c) et la chaîne γ commune (γ_c),
- les **récepteurs de classe II (familles des IFNs et de l'IL-10)** tels IFN-Rs, IL-10R, IL-20R, IL-22R et IL-28R,
- les **récepteurs de classe III (cytokines de la superfamille des TNFs)** comme TNF-R, NGF-R, Fas, CD27, CD40 et TRAIL-R,
- les **récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines sans activité tyrosine kinase** tels IL-1Rs et IL-18R,
- les **récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines avec activité tyrosine kinase** qui correspondent entre autres aux M-CSF-R, EGF-R et PDGF-R,
- les **récepteurs à activité sérine/thréonine kinase des cytokines de la famille du TGF β** comprenant TGF β -R, Inh-R et Act-R,
- les **récepteurs à domaine « sushi »** dont les seuls membres sont l'IL-2R α et l'IL-15R α ,
- les **récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-17** (IL-17Rs),
- les **récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines** comme CXCR-1, CCRs, CXCRs et CX₃CR-1.

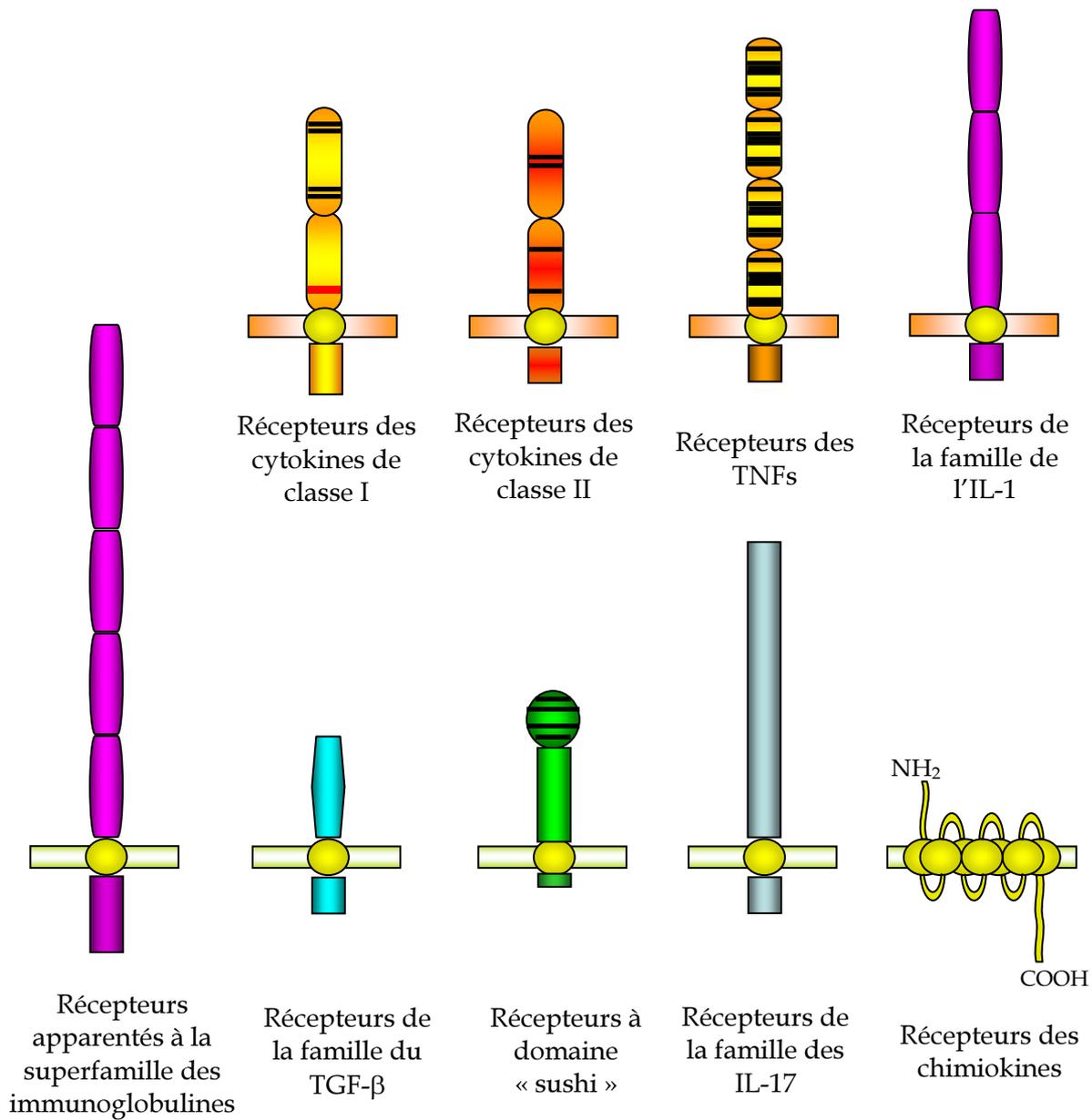


Figure 2 : Familles de chaînes réceptrices membranaires des cytokines

De nouvelles cytokines, de nouveaux récepteurs et de nouveaux modes d'action sont découverts chaque année. Ils nous révèlent que le réseau cytokinique est un système complexe où beaucoup de choses sont encore à découvrir et à comprendre.

3. Cas des cytokines hématopoïétiques

Les cytokines hématopoïétiques sont des cytokines impliquées dans la différenciation et l'expansion des cellules sanguines. Elles présentent généralement des N- et des O-glycosylations. Leur structure tertiaire est maintenue par des ponts disulfures. L'organisation spatiale des structures secondaires donne une structure tertiaire cylindrique aux cytokines à hélices α longues, et une structure globulaire aux cytokines à hélices α courtes. Ces cytokines se fixent généralement sous forme monomérique sur différentes chaînes réceptrices.

Les récepteurs de cytokines hématopoïétiques, ou récepteurs de type I, sont des glycoprotéines membranaires qui constituent le groupe le plus important des récepteurs de cytokines. Chacun de ces récepteurs comporte un domaine transmembranaire, une extrémité NH₂-terminal extracellulaire et une extrémité COOH-terminal intracellulaire. Les régions extracellulaires sont variables, mais présentent toutes une architecture de type "*Cytokine binding Homology Region*" (CHR) (Bazan, 1990) caractérisée par deux domaines de type fibronectine III :

- le **premier domaine**, situé le plus proche du NH₂-terminal, contient quatre résidus cystéines conservés qui forment deux ponts disulfures intracaténaux successifs indispensables à la fonctionnalité du CHR (Yawata *et al.*, 1993),
- le **second domaine**, proche de la membrane cellulaire, possède un motif W-S-X-W-S (X : acide aminé quelconque) conservé au sein de la famille des récepteurs hématopoïétiques et indispensable à la fixation du ligand (de Vos *et al.*, 1992).

Certains récepteurs de classe I présentent néanmoins des variations dans cette région par duplication des deux domaines et/ou ajout d'autres motifs, comme les domaines de type "immunoglobuline-like" (Ig-like) ou fibronectine de type III (FNIII). Les domaines Ig-like peuvent jouer un rôle dans la liaison de la cytokine (Bitard *et al.*, 2003 ; Layton *et al.*, 2001) et les domaines FNIII peuvent permettre des interactions entre les chaînes réceptrices (Kurth *et al.*, 2000 ; Timmermann *et al.*, 2002).

La partie intracytoplasmique de ces récepteurs est de longueur variable et ne présente aucune activité tyrosine kinase intrinsèque. Elle comporte cependant deux motifs conservés, "Box1" et "Box2", tous deux essentiels pour la transduction du signal. Le motif "Box1" possède un site, riche en proline, nécessaire à l'ancrage de protéines tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille des "*Janus-Associated Kinases*" (JAKs). Le motif "Box2", moins conservé, augmenterait l'affinité des JAKs pour la région intracytoplasmique des chaînes transductrices (Bazan, 1990) (**Figure 3**).

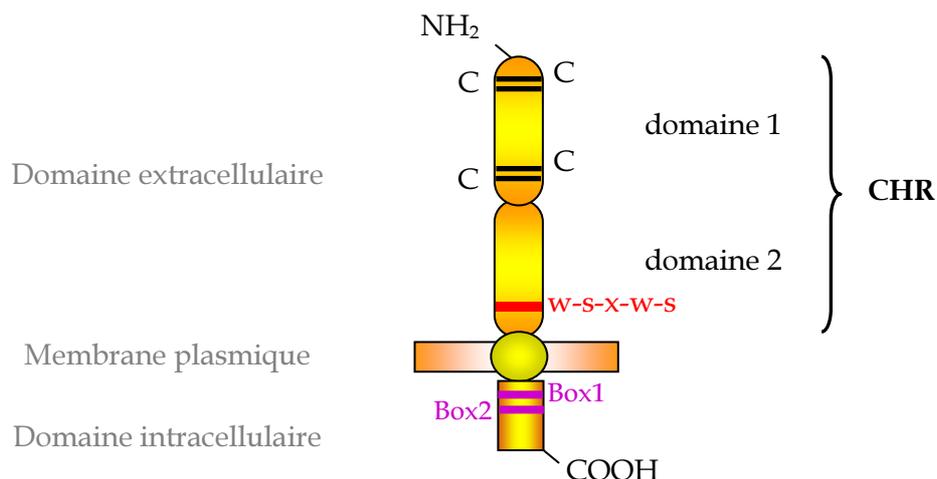


Figure 3 : Structure commune aux récepteurs de classe I

La fixation de la cytokine sur son récepteur induit une oligomérisation des sous-unités réceptrices et le rapprochement des domaines intracellulaires. Les JAKs, constitutivement associées à ces domaines, sont alors activées et assurent leur propre phosphorylation et celle des domaines intracellulaires des chaînes réceptrices. Les tyrosines phosphorylées des chaînes réceptrices recrutent alors les "*Signal Transducer and Activator of Transcription*" (STATs), qui, une fois phosphorylés, seront transloqués sous forme dimérique dans le noyau et agiront en tant que facteurs de transcription (Leonard & O'Shea, 1998).

La plupart des récepteurs de classe I n'induisent pas de signal par homo-dimérisation mais plutôt par hétéro-dimérisation (IL-4, IL-7, ...), ou -trimérisation (IL-2, IL-15), voire -tétramérisation (IL-6 virale/gp130, G-CSF/G-CSFR), et même -hexa (IL-6 virale/gp130, G-CSF/G-CSFR) et -dodécamérisation (GM-CSF/GM-CSFR α/β_c) (Wang *et al.*, 2009). Mais la caractéristique particulière de tous ces récepteurs hétéro-oligomériques est qu'ils partagent une sous-unité réceptrice commune responsable de la transduction du signal et possèdent une chaîne spécifique à chaque cytokine.

On peut ainsi classer les cytokines hématopoïétiques en trois familles selon la chaîne réceptrice partagée (**Figure 4**) :

- la famille utilisant la **chaîne transductrice γ_c** ,
- la famille utilisant la **chaîne transductrice gp130**,
- la famille utilisant la **chaîne transductrice β_c** .

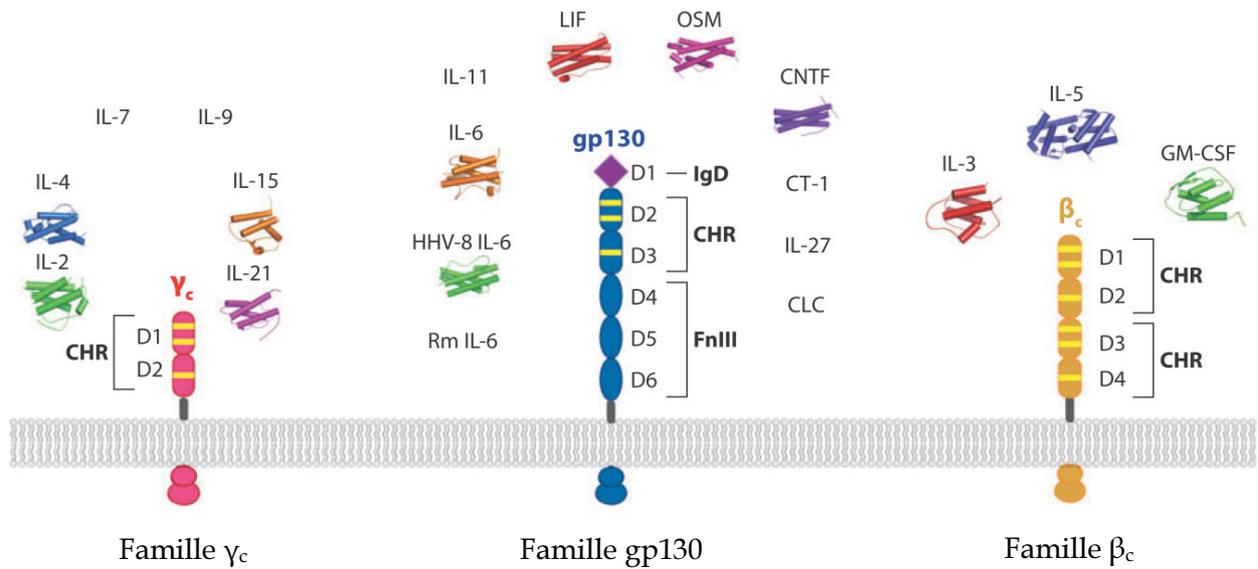


Figure 4 : Familles des récepteurs de cytokines hématopoïétiques

D'après Wang et al. (2008) et avec LIF, "Leukemia Inhibitory Factor" ; OSM, "Oncostatin-M"; CNTF, "Ciliary Neurotrophic Factor" ; CLC, "Cardiotrophin-Like Cytokine" ; HHV-8, "Human Herpes Virus"; GM-CSF, "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor" et D, domaine.

C'est entre autre le fait que les chaînes transductrices soient souvent partagées par plusieurs cytokines qui explique la redondance fonctionnelle observée entre différentes cytokines.

B. La famille des cytokines γ_c

Ce travail de thèse s'est concentré sur l'étude du « système IL-15 ». L'IL-15 est une cytokine hématopoïétique de la famille des cytokines γ_c , je me suis donc particulièrement intéressée à cette famille.

1. Les cytokines γ_c

Les cytokines γ_c présentent une structure tertiaire globulaire composée de un ou plusieurs ponts disulfures et de quatre hélices α courtes (A, B, C, D) orientées antiparallèlement et reliées par des boucles (Bazan, 1990 ; McKay, 1992) (**Figure 5**). Leur structure est stabilisée par le confinement du cœur hydrophobe, composé des chaînes latérales hydrophobes des résidus des quatre hélices, et par la compensation des moments dipolaires des hélices de tailles semblables.

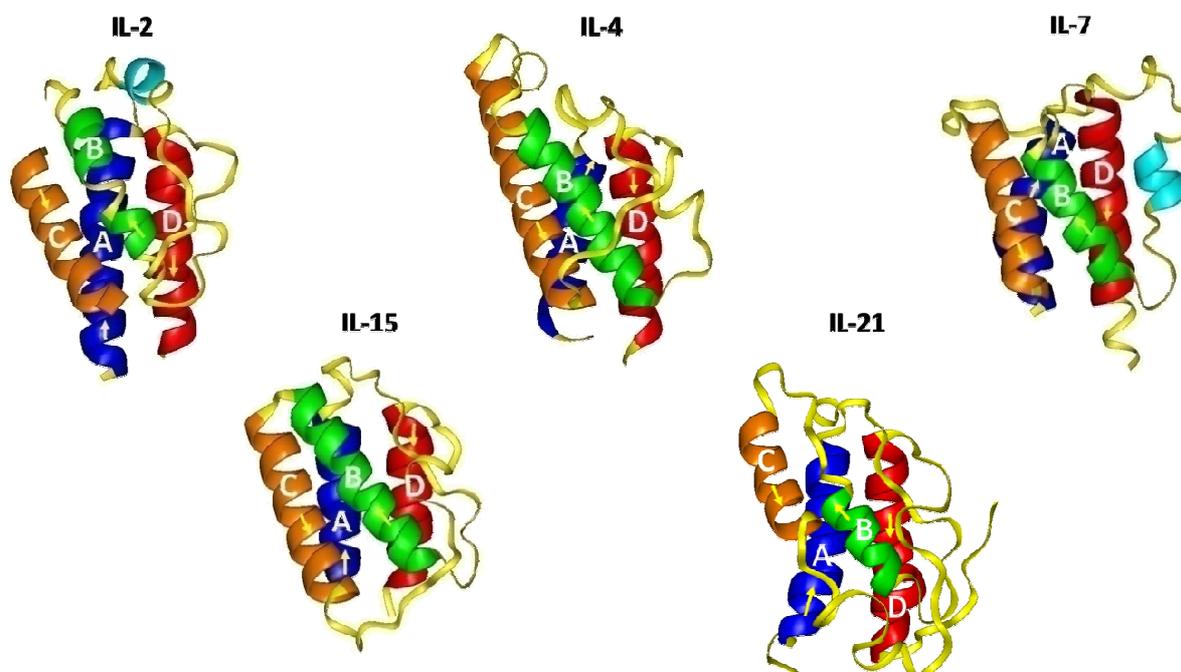


Figure 5 : Structure tertiaire des cytokines γ_c

D'après Agnès Quéméner : représentation en ruban des IL-2, -4, -7, -15 et -21.

Ces cytokines ont toutes comme caractéristique de se fixer à des chaînes réceptrices de la famille des récepteurs de classe I et de partager la chaîne γ commune, aussi appelée γ_c ou CD132. Elles correspondent aux IL-2, -4, -7, -9, -15 et -21. Du fait du partage de la chaîne γ_c , ces cytokines présentent des fonctions prédominantes similaires comme la régulation du développement et de l'homéostasie des lymphocytes T. Cependant, elles montrent également des caractéristiques qui leur sont propres liées à leurs chaînes réceptrices spécifiques :

- L'**IL-2** est impliquée dans le développement et la survie des cellules T régulatrices (T_{regs}) (Sakaguchi *et al.*, 2008), dans la prolifération de cellules T CD8⁺ (D'Souza & Lefrancois, 2003) et dans la régulation de l'apoptose des cellules T activées (Lenardo, 1991),
- L'**IL-4** est nécessaire au développement et aux fonctions des cellules T helper 2 (T_H2) et présente un rôle important dans les mécanismes d'allergies et de modifications de classe des immunoglobulines ("*switch*") (Holgate & Polosa, 2008),
- L'**IL-7** a un rôle central dans le développement et la survie des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (Schluns *et al.*, 2000 ; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995),
- L'**IL-9** est responsable de l'activation de cellules épithéliales, de cellules B, d'éosinophiles et de mastocytes (Hauber *et al.*, 2004),
- L'**IL-15** est essentielle au développement et à la survie de cellules T CD8⁺ mémoires, NK et NK-T (Carson *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1998b),
- L'**IL-21** est impliquée dans la prolifération et la différenciation terminale des cellules B et participe à la régulation des cellules T CD8⁺ et NK (Spolski & Leonard, 2008).

2. Les récepteurs des cytokines γ_c

Les cytokines γ_c partagent une même chaîne transductrice de classe I : la chaîne γ_c . L'importance de cette chaîne peut être illustrée par le fait qu'une mutation du gène codant ce récepteur (*IL2RG*) inhibe les fonctions de toutes les cytokines γ_c -dépendantes et induit un syndrome de déficit immunitaire combiné sévère (DICS-X ou X-SCID pour "*X-linked Severe Combined Immunodeficiency*"), caractérisé par une absence de cellules T et NK (Noguchi *et al.*, 1993).

Les récepteurs des IL-4, -7, -9 et -21 correspondent à des hétérodimères constitués de la chaîne γ_c et d'une chaîne réceptrice spécifique (IL-4R α , IL-7R α , IL-9R α et IL-21R α respectivement). Les chaînes spécifiques de ces cytokines font également parties de la famille des récepteurs de classe I et participent à l'induction du signal (Rochman *et al.*, 2009).

Les récepteurs des IL-2 et -15 sont des hétéro-trimères constitués de la chaîne γ_c , d'une chaîne commune aux deux cytokines (IL-2/IL-15R β ou CD122) et d'une chaîne spécifique à chaque cytokine (IL-2R α et IL-15R α respectivement). La chaîne IL-2/IL-15R β fait partie de la famille des récepteurs de type I et est structurellement très proche des chaînes spécifiques des autres cytokines γ_c . Associée à la chaîne γ_c , elles forment un récepteur dimérique d'affinité intermédiaire ($K_d \sim 10^{-9}$ M) suffisant à la transduction du signal induit par l'IL-2 ou l'IL-15. Les chaînes réceptrices spécifiques appartiennent à la famille des récepteurs à domaine « sushi » et ne présentent pas ou peu d'activité transductrice. Ces dernières s'associent au récepteur IL-2/IL-15R β / γ_c pour former un récepteur trimérique spécifique de haute affinité ($K_d \sim 10^{-11}$ M) (**Figure 6**).

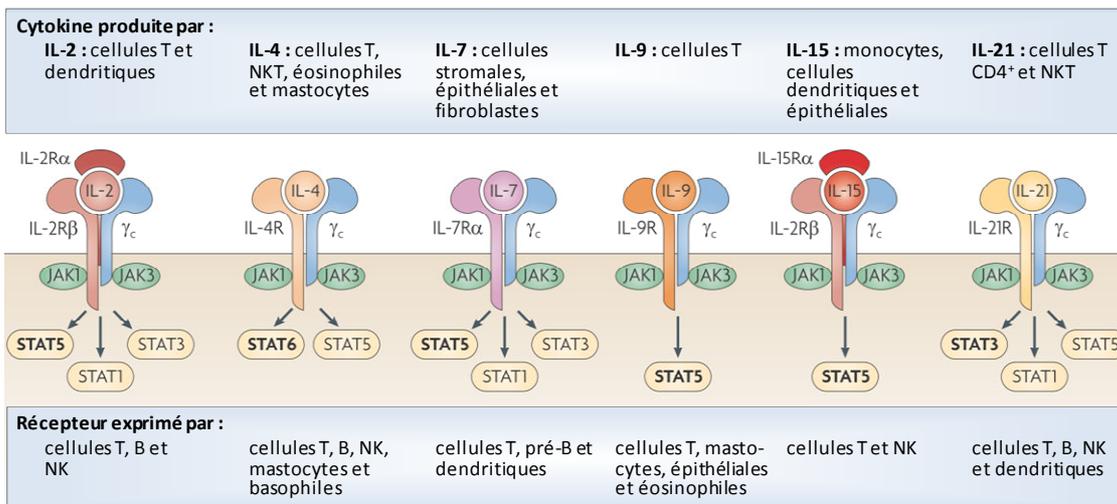


Figure 6 : Les différents récepteurs des cytokines γ_c

D'après Rochman et al. (2009) et avec NK, cellules "Natural-Killer" et NKT, cellules "Natural Killer-T"

3. Les voies de signalisation

Les différentes chaînes réceptrices des cytokines γ_c s'assemblent pour former des récepteurs spécifiques et traduisent la fixation de chaque cytokine en signal cellulaire adapté à travers la membrane, point de départ des réponses fonctionnelles aux cytokines. La transduction du signal des cytokines γ_c met en jeu trois voies majeures d'activation : la voie JAK/STAT, la voie PI3-K et la voie des MAPKs.

L'un des premiers évènements suivant l'interaction cytokine/récepteur correspond à l'activation des protéines tyrosine kinases JAKs, constitutivement associées aux chaînes réceptrices de classe I. La famille des JAKs comprend actuellement quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2, mais ce sont surtout les protéines JAK1 et JAK3 qui sont impliquées dans la signalisation des cytokines γ_c . Une fois activées, les JAKs s'autophosphorylent et phosphorylent les tyrosines des domaines intracellulaires des chaînes réceptrices. C'est cette phosphorylation qui initie l'activation des trois différentes voies de transduction (**Figure 7**) :

- la voie des **STATs** : les facteurs STATs, présents dans le cytoplasme sous forme monomérique inactive, sont activés par les tyrosines phosphorylées des chaînes réceptrices. Une fois phosphorylés, les STATs se dissocient et dimérisent sous forme homo- ou hétéro-dimérique, puis ils sont transloqués dans le noyau et se lient à des séquences d'ADN promotrices spécifiques qui activent la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Lin & Leonard, 1997). On connaît aujourd'hui une douzaine de STATs (Lim & Cao, 2006) mais, selon les cytokines, certains sont préférentiellement activés (les IL-2, -7, -9 et -15 activent principalement STAT5, l'IL-4 active généralement STAT6 et l'IL-21 active surtout STAT3).

▫ la voie de la **PI3-K** ("*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*") : la PI3-K appartient à une famille d'enzymes impliquées dans la régulation de la croissance, de la prolifération et du métabolisme cellulaire. L'activation de la PI3-K induit la phosphorylation de PIP₂ (Phosphatidyl Inositol 4,5-bisphosphate) en PIP₃ (Phosphatidyl Inositol 3,4,5-trisphosphate) au niveau de la membrane plasmique (Wymann *et al.*, 1999). Cette conversion entraîne le recrutement et la phosphorylation de la protéine kinase Akt ("*cellular homolog of the v-akt oncogene*") (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003). Akt promeut alors l'activité transcriptionnelle par l'intermédiaire de NF-κB ("*Nuclear Factor Kappa B*") (Romashkova & Makarov, 1999), la traduction protéique en agissant sur la p70 S6K ("*small subunit ribosomal protein S6 kinase*") (Reif *et al.*, 1997), et la survie cellulaire en induisant l'effet anti-apoptotique de Bcl-xl ("*B cell leukaemia x large form protein*") (Datta *et al.*, 1997).

▫ la voie des **MAPKs** ("*Mitogen-Activated Protein Kinases*") : les MAPKs sont régulées en cascade par de nombreux facteurs. Les tyrosines phosphorylées des chaînes réceptrices recrutent et phosphorylent la protéine adaptatrice Shc ("*Src homology 2 domain-containing*"). Shc s'associe alors à Grb-2 ("*Growth factor receptor-boundprotein 2*") et Sos ("*Son of sevenless*") et active la protéine Ras, ancrée à la membrane plasmique. Puis, la protéine Raf est activée à son tour et phosphoryle les MAPKs p38, JNK et Erk1/2, impliquées dans l'activation de nombreux facteurs de transcription (Ravichandran & Burakoff, 1994).

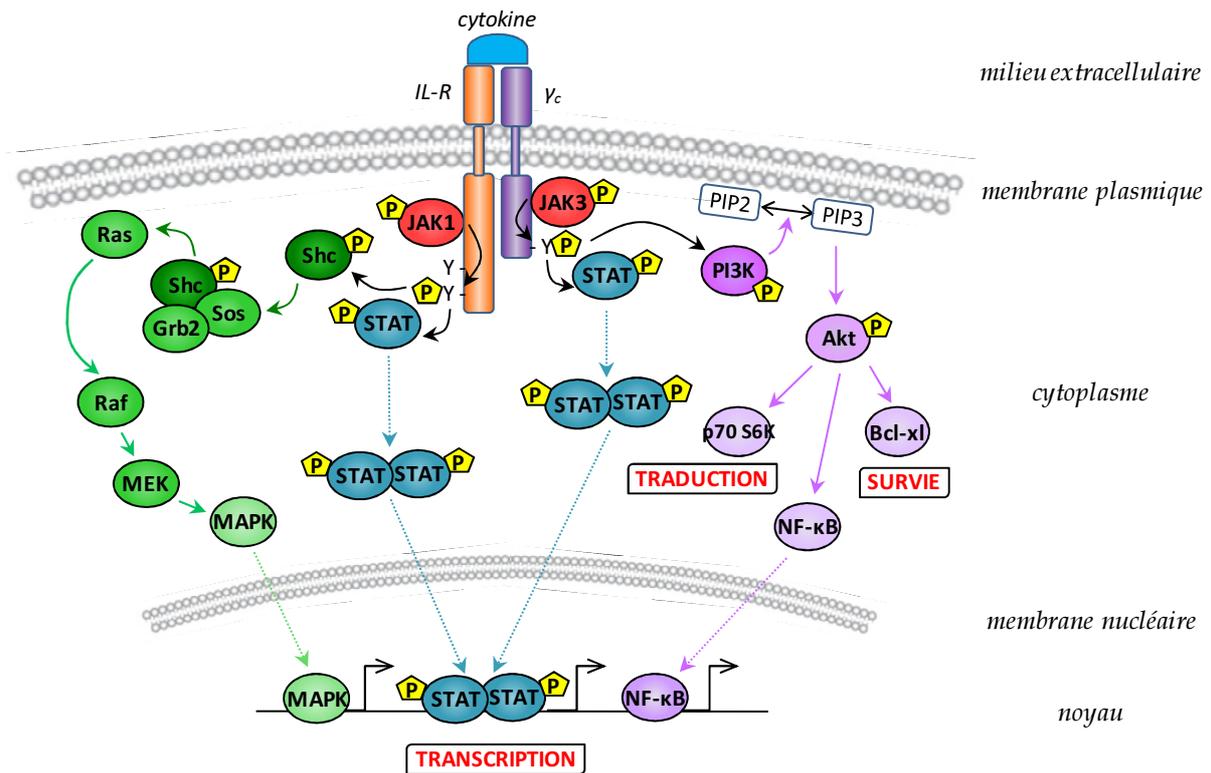


Figure 7 : Les différentes voies de transduction du signal des cytokines γ_c
 Avec IL-R : récepteur spécifique de cytokine γ_c , \rightarrow activation et \dashrightarrow translocation.

4. Les autres mécanismes de transduction du signal

De plus en plus d'études présentent un modèle de membrane plasmique hétérogène et dynamique régulé par de nombreuses interactions lipides-protéines.

En particulier, les radeaux lipidiques ou *rafts* sont des domaines particulièrement riches en lipides (cholestérol et sphingolipides) et présentent des propriétés physiques et biologiques uniques (Chichili & Rodgers, 2009). La forte concentration en lipides génère une augmentation locale de la viscosité membranaire, la formation de plateformes lipidiques (les radeaux) et accroît la largeur de la bicouche lipidique. Ces domaines présentent également un enrichissement en protéines lipophiles présentant une S-acylation (ex : palmitoylation) ou une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Rodgers *et al.*, 1994) (**Figure 8**).

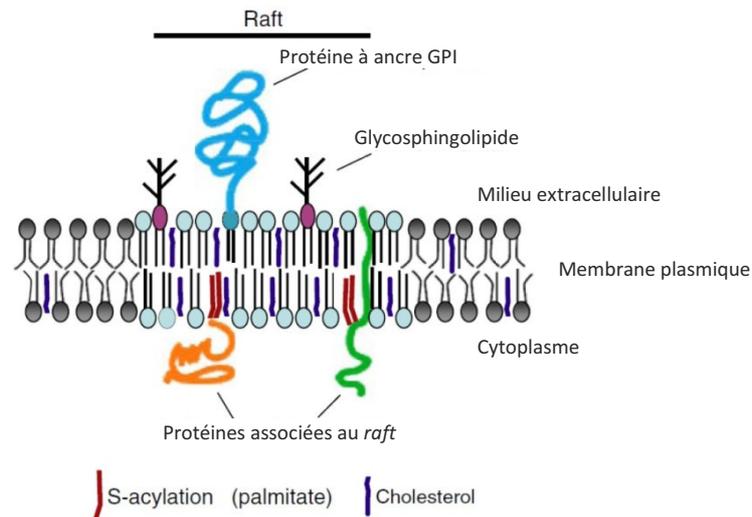


Figure 8 : Modèle du radeau lipidique

D'après Chichili & Rodgers, 2009

La formation et le maintien de ces radeaux lipidiques seraient régulés par des protéines du cytosquelette (notamment l'actine) associées à la membrane par des protéines ou lipides spécifiques. Par exemple, le cofacteur lipidique PIP₂ (impliqué dans la signalisation cellulaire) est un important régulateur de l'interaction membrane-cytosquelette (Yin & Janmey, 2003).

En terme de signalisation cellulaire, il apparaît que les radeaux lipidiques sont enrichis en protéines de signalisation dans la plupart des types cellulaires (Kabouridis *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1998a). Cela supporte la notion que ces radeaux participent activement au mécanisme de signalisation cellulaire en créant des plateformes spécifiques de signalisation.

Aussi, lors de la réception d'un stimulus à la membrane, le rapprochement des récepteurs spécifiques déclencherait une agrégation de domaines riches en lipides grâce à l'intervention des protéines du cytosquelette. Ce mécanisme permettrait la compartimentation des molécules nécessaires à la signalisation, généralement isolées lorsque la cellule est au repos (Simons & Toomre, 2000). Ce mécanisme de compartimentation a d'ailleurs été montré comme essentiel à la transduction du signal de plusieurs cytokines γ_c , notamment l'IL-2 et, très récemment, l'IL-7 (Marmor & Julius, 2001 ; Rose *et al.*, 2010).

II. Biologie du système IL-15/IL-15R

A. L'interleukine-15

L'interleukine (IL)-15 est une cytokine hématopoïétique de la famille des cytokines γ_c découverte en 1994 (Burton *et al.*, 1994 ; Grabstein *et al.*, 1994). Elle est structurellement et fonctionnellement très proche de l'IL-2 et partage avec elle les mêmes chaînes transductrices IL-2/IL-15R β et γ_c . Sa spécificité de réponse provient de sa chaîne réceptrice spécifique, l'IL-15R α .

1. Caractéristiques de l'IL-15

Le gène et les messagers de l'IL-15

L'IL-15 humaine est codée par un gène d'environ 34 kb localisé sur le chromosome 4 en position 4q13. Ce gène est composé de 9 exons, dont 7 sont codants, et de 8 introns (Anderson *et al.*, 1995a ; Krause *et al.*, 1996). Un exon alternatif, localisé entre les exons 4 et 5, a également été mis en évidence. Celui-ci est présenté comme une séquence additionnelle codant un peptide signal (Meazza *et al.*, 1996 ; Onu *et al.*, 1997 ; Tagaya *et al.*, 1997). Selon l'utilisation ou non de cet exon, deux isoformes d'ARN messagers (ARNm) sont produites (**Figure 9**) :

- **l'ARNm originel** de l'IL-15 humaine comprend une région 5' non traduite (5' UTR) d'au moins 316 nucléotides (nt), une séquence codante de 486 nt, et une région 3' non traduite (3' UTR) d'au moins 400 nt. Cet ARNm code un précurseur protéique de l'IL-15 constitué d'un peptide signal de 48 acides aminés (nommé "*Long Signal Peptide*", LSP) et d'une protéine mature de 114 aa. Le peptide signal est codé par la fin de l'exon 3, l'exon 4 et le début de l'exon 5. La fin de l'exon 5, les exons 6, 7 et le début de l'exon 8 codent la protéine mature.

- **l'ARNm alternatif** de l'IL-15 humaine présente un exon additionnel de 119 nt inséré entre les exons 4 et 5 (l'exon 4A), mais est dépourvu des exons 1 et 2. L'introduction de cet exon alternatif engendre l'interruption de la séquence codant le peptide signal de 48 aa par l'insertion de 3 codons stop et fait apparaître un nouveau site d'initiation de la traduction. Il en résulte un précurseur protéique de l'IL-15 présentant un peptide signal plus court de 21 aa (nommé "*Short Signal Peptide*", SSP) mais une protéine mature identique. Ce peptide signal est codé par la fin de l'exon 4A et le début de l'exon 5.

Ces deux isoformes de précurseur protéique possèdent deux profils différents en termes de localisation intracellulaire, de distribution, de trafic et de localisation endosomale. Le précurseur SSP-IL-15 n'est pas sécrété mais plutôt séquestré dans le cytoplasme (Gaggero *et al.*, 1999 ; Tagaya *et al.*, 1997). Le précurseur LSP-IL-15 est quant à lui retrouvé dans la voie sécrétoire, c'est-à-dire dans le golgi, les endosomes et le réticulum endoplasmique (Kurys *et al.*, 2000). Néanmoins, ces deux isoformes peuvent également être localisées dans le noyau (Nishimura *et al.*, 2000).

La structure du gène de l'IL-15 (9 exons, 8 introns) est différente de celle retrouvée généralement pour les gènes des cytokines γ_c (4 exons, 3 introns), comme le gène de l'IL-2 (Seigel *et al.*, 1984). Néanmoins, la région génique codant l'IL-15 mature comprend bien 4 exons et 3 introns.

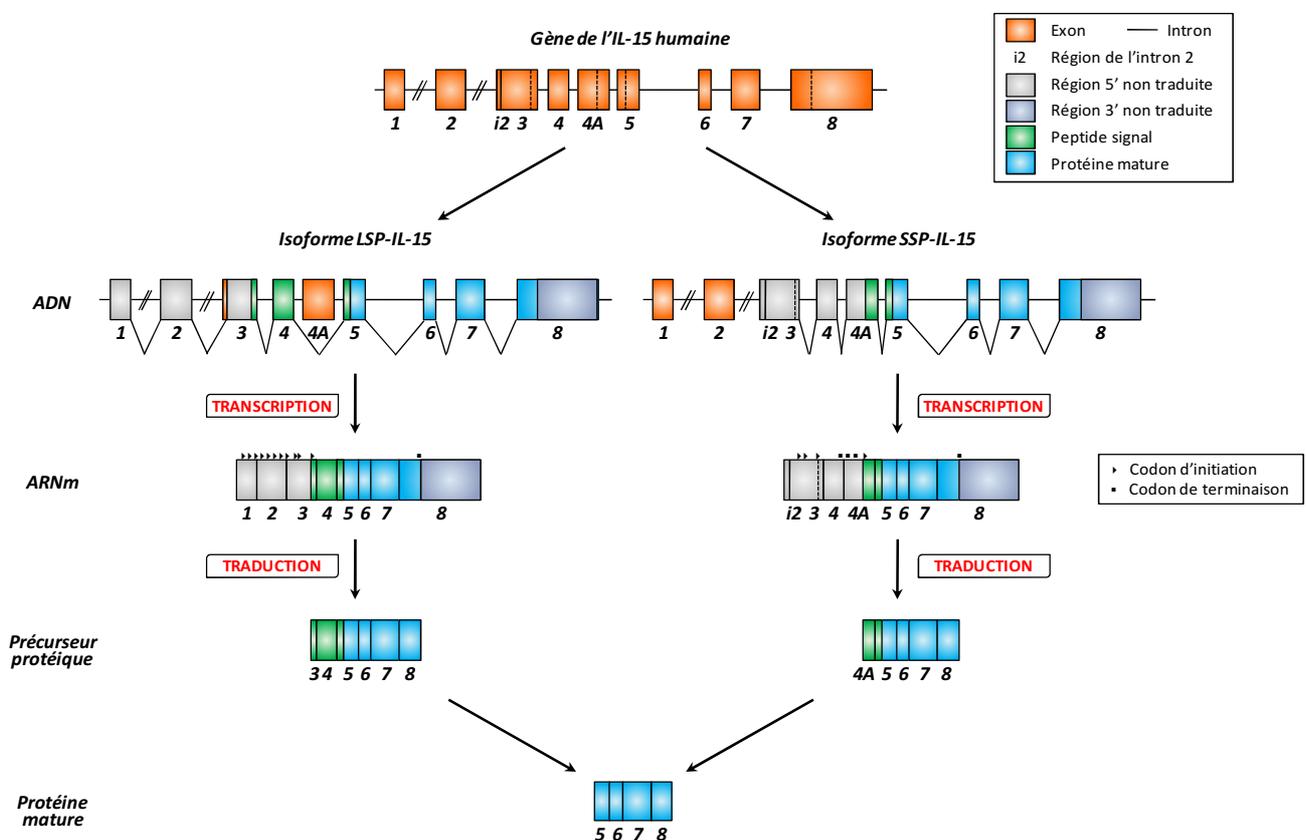


Figure 9 : Gène, transcription, traduction et maturation protéique de l'IL-15

La protéine IL-15

L'IL-15 mature est une glycoprotéine soluble de 114 aa présentant une masse moléculaire de 14-15 kDa. La séquence protéique de l'IL-15 est très conservée à travers les espèces : l'IL-15 humaine présente 97 % d'homologie avec l'IL-15 de singe et 73 % avec l'IL-15 murine (Grabstein *et al.*, 1994).

L'IL-15 humaine présente deux ponts disulfures en position C42-C88 (homologue à celui de l'IL-2 situé en C58-C105) et C35-C85, et trois sites potentiels de N-glycosylation en C-terminal de la protéine (positions N71, N79 et N112). Comme toutes les cytokines γ_c , la structure tertiaire de l'IL-15 est composée de quatre hélices α courtes amphipathiques. Ces hélices α sont localisées entre les acides aminés N1 et I16, K36 et E53, I59 et L74, et I96 et I111, et présentent une configuration "Up-Up-Down-Down" (Chirifu *et al.*, 2007) (**Figure 10**).

Bien que l'IL-15 et l'IL-2 présentent une faible identité de séquence primaire, les acides aminés de l'IL-2 essentiels à la liaison des chaînes réceptrices IL-15R β et γ_c , sont conservés dans la structure de l'IL-15. Ainsi, le D8 de l'IL-15, homologue du D20 de l'IL-2, est indispensable à l'interaction avec l'IL-15R β , et le Q108 de l'IL-15, analogue du Q126 de l'IL-2, est essentiel à la liaison de la chaîne γ_c (Wang *et al.*, 2005 ; Zurawski *et al.*, 1993).

Les principaux résidus de l'IL-2 impliqués dans la liaison de sa chaîne spécifique IL-2R α (K35, R38, F42, L72) (Rickert *et al.*, 2005 ; Sauve *et al.*, 1991) ne sont pas conservés dans la structure de l'IL-15. Cependant, d'autres acides aminés présentent des homologies certaines (Y45, E62 et E106 de l'IL-2 avec Y26, E46 et E87 de l'IL-15 respectivement). De plus, les empreintes de liaison entre l'IL-2 et l'IL-2R α et entre l'IL-15 et l'IL-15R α présentent d'importantes similitudes (Chirifu *et al.*, 2007). Aussi, les études du complexe formé entre l'IL-15 et l'IL-15R α , par cristallographie (Chirifu *et al.*, 2007) et par RMN (Hanick *et al.*, 2007), ont permis la détermination de trois zones d'interaction (*Top*, *Middle*, *Bottom*). Une première zone (*Top*), située dans la boucle AB de l'IL-15, implique les résidus E53 et D22. La seconde zone (*Middle*), localisée dans l'hélice B, implique des acides aminés comme le E46 et le Y26. Enfin, la troisième zone d'interaction (*Bottom*), située dans la boucle CD, implique les résidus glutamate de cette zone aux positions 87, 89 et 90 (**Figure 10**).

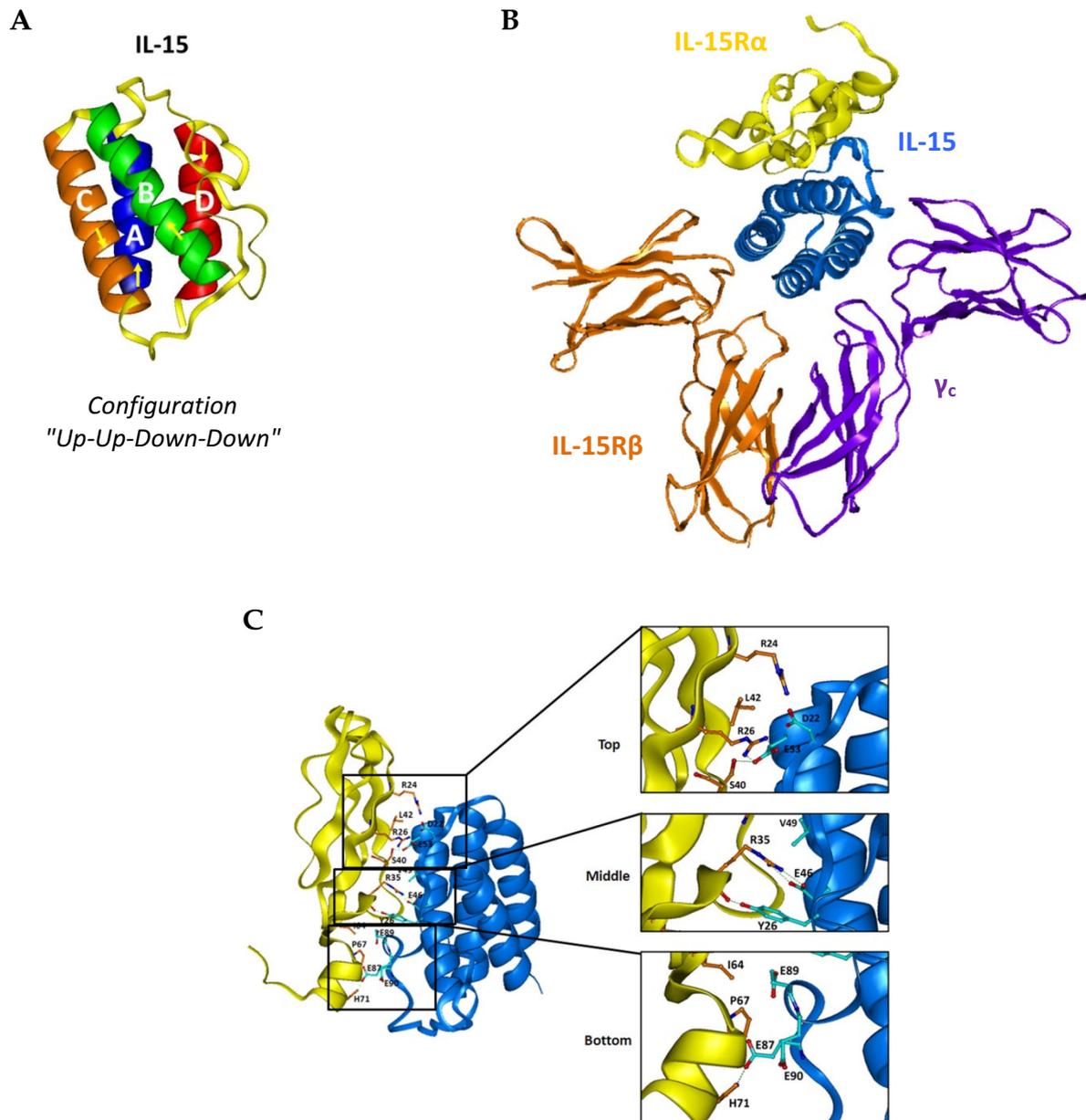


Figure 10 : Caractéristiques protéiques de l'IL-15

D'après Agnès Quémener : (A) Structure protéique en hélice α de l'IL-15. (B) Modèle du complexe IL-15/IL-15R α / β / γ_c . (C) Structure du complexe IL-15/IL-15R α et représentation des trois zones d'interaction (Chirifu *et al.*, 2007).

L'IL-15 a initialement été décrite comme un facteur soluble mais, quelques années après sa découverte, une forme membranaire d'IL-15 a également été identifiée à la surface cellulaire de monocytes et de fibroblastes (Briard *et al.*, 2002 ; Musso *et al.*, 1999). Cette forme d'IL-15 associée à la membrane serait biologiquement active et son expression constitutive serait augmentée par une stimulation avec de l'IFN γ , du GM-CSF ou du LPS (Musso *et al.*, 1999 ; Neely *et al.*, 2001). L'existence de cette forme d'IL-15 membranaire a depuis été confirmée à la surface de monocytes/macrophages, de kératinocytes, de fibroblastes, de

cellules épithéliales, de cellules cancéreuses rénales et prostatiques (Budagian *et al.*, 2004b ; Wittnebel *et al.*, 2007). Aujourd'hui, il n'est pas toujours évident de savoir si cette IL-15 est associée à la membrane d'une manière dépendante ou non de la chaîne IL-15R α mais il est probable que les deux phénomènes co-existent. En effet, plusieurs équipes ont pu détecter de l'IL-15 membranaire indépendamment de la présence de l'IL-15R α (Budagian *et al.*, 2004b ; Wittnebel *et al.*, 2007), cependant le mécanisme de mobilisation à la membrane de cette cytokine reste encore inconnu.

2. Expression de l'IL-15

Sites d'expression de l'IL-15

Contrairement aux transcrits de l'IL-2, exclusivement exprimés par les lymphocytes T activés, les transcrits de l'IL-15 sont détectés dans un grand nombre de tissus et lignées cellulaires d'origines diverses, appartenant ou non au système immunitaire. Les ARNm de l'IL-15 ont ainsi été mis en évidence dans le placenta, le muscle squelettique, le rein, le foie, le poumon et le cœur (Grabstein *et al.*, 1994).

À l'échelle cellulaire, les monocytes/macrophages ont été les premières cellules reconnues comme source d'IL-15 (Grabstein *et al.*, 1994). D'autres cellules impliquées dans la présentation d'antigènes (CPA), comme les cellules dendritiques, produisent les ARNm et la protéine IL-15, suggérant un rôle de cette cytokine dans l'attraction et la stimulation des cellules T (Jonuleit *et al.*, 1997). L'IL-15 est également produite par les cellules stromales primaires de la moelle osseuse, les épithéliums thymique et intestinal fœtal (Leclercq *et al.*, 1996 ; Mrozek *et al.*, 1996 ; Murray *et al.*, 1998). Enfin, les cellules épithéliales et fibroblastiques hépatiques, les cellules épithéliales rénales et intestinales, les cellules épidermiques, les kératinocytes, les cellules fœtales de la peau, les astrocytes et les cellules de la microglie expriment l'IL-15 au niveau ARNm et/ou protéique (Kawai *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 1996 ; Mohamadzadeh *et al.*, 1995 ; Weiler *et al.*, 2001).

L'expression ubiquitaire des ARNm contraste avec la très rare détection de la protéine dans des conditions physiologiques. Cette présence ubiquitaire d'ARNm et l'absence de protéines suggèrent que la production d'IL-15 est fortement régulée au niveau post-transcriptionnel.

Régulation de l'expression de l'IL-15

La transcription, la traduction et la sécrétion de l'IL-15 sont finement régulées par de multiples mécanismes et aboutissent à une faible sécrétion de la cytokine. Une faible production est inhabituelle pour une cytokine, même si elle est également retrouvée dans le cas de l'IL-7, et suggère qu'une forte expression de l'IL-15 serait néfaste à l'organisme.

▫ **Régulation au niveau transcriptionnel** : les clonages des gènes humains et murins de l'IL-15 ont mis en évidence différents sites consensus de liaison de facteurs de transcription stimulateurs ou répresseurs dans les régions 5' promotrices, en amont de l'exon 1.

En particulier, un motif de liaison du facteur nucléaire NF- κ B, localisé au niveau des nt -75 à -65 par rapport au site d'initiation de la transcription de l'IL-15, est impliqué dans la régulation positive de la cytokine. Ce site de liaison permet l'induction de la transcription de l'IL-15 par la protéine Tax du virus HTLV-1 (Azimi *et al.*, 1998) et par le LPS dans des macrophages murins (Washizu *et al.*, 1998). Un motif IRF-E ("Interferon Regulatory Factor response Element") a également été localisé dans la région -295 à -243 par rapport au site d'initiation de la transcription du gène de l'IL-15 murine. Ce motif fixe spécifiquement les protéines IRF-1 et IRF-2, ce qui confirme les études préalables montrant le rôle essentiel d'IRF-1 dans la régulation transcriptionnelle de l'IL-15. L'expression d'IL-15 induite par IRF-1 est importante pour les cellules NK, NK-T et IELs ("Intraepithelial Lymphocytes") (Ogasawara *et al.*, 1998 ; Ohteki *et al.*, 1998). Un site de liaison indéterminé, situé dans la région -201 à -141 par rapport au site d'initiation de la transcription, est, lui, responsable d'une répression transcriptionnelle de la cytokine (Azimi *et al.*, 1998). En effet, la délétion de cette région induit une forte augmentation de l'activité du promoteur.

Un autre mécanisme de répression transcriptionnelle a été mis en évidence chez la souris. Une isoforme d'IL-15 issue d'un épissage alternatif et non sécrétée inhibe la production d'IL-15 induite par le LPS. Ce mécanisme serait dépendant de la co-expression de la chaîne spécifique IL-15R α qui formerait un complexe avec l'isoforme d'IL-15 capable d'être transloqué dans le noyau et d'inhiber la transcription en empêchant les facteurs de transcription de se fixer sur le promoteur de l'IL-15 (Nishimura *et al.*, 2005).

▫ **Régulation au niveau traductionnel** : la présence de multiples codons d'initiation (codons AUG) au niveau de la séquence 5' non traduite des transcrits de l'IL-15 et l'existence de deux peptides signaux contribueraient à la régulation négative de la traduction de l'IL-15.

La région 5' non traduite des ARNm LSP-IL-15 est relativement longue (au moins 352 nt pour les transcrits humains) (Grabstein *et al.*, 1994). Elle contient 12 codons d'initiation de la traduction, dont 10 codons surnuméraires en amont du site correct d'initiation de la traduction. La présence de ces codons AUG surnuméraires réduit fortement l'efficacité de la traduction d'une protéine (Kozak, 1992). En effet, la délétion de ces codons initiateurs surnuméraires augmente la production de la cytokine. Il a été montré que la production d'IL-15 par la lignée HuT-102 provenait de l'augmentation de l'efficacité de transcription induite par la protéine virale Tax et d'une traduction accrue (Bamford *et al.*, 1996). Dans cette lignée, le gène de l'IL-15 est en fait fusionné en partie 5' du gène avec une séquence virale et les ARNm issus de ce gène hybride ne présentent que 2 des 10 codons AUG surnuméraires.

Les peptides signaux des deux isoformes LSP-IL-15 et SSP-IL-15 contribueraient également à l'inefficacité de la traduction. Le peptide signal long possède un codon

d'initiation AUG situé dans une région présentant peu d'homologie avec la séquence Kozak consensus (Onu *et al.*, 1997 ; Tagaya *et al.*, 1997). L'isoforme LSP-IL-15 est ainsi moins bien traduite que l'isoforme SSP-IL-15. De plus, le remplacement du peptide signal endogène de l'IL-15 par celui de l'IL-2 résulte en une augmentation importante de l'efficacité de traduction de l'IL-15 (Tagaya *et al.*, 1997).

▫ **Régulation au niveau post-traductionnel :** la suppression des régulations traductionnelles des ARNm de l'IL-15 permet une augmentation de la production de la cytokine, mais la traduction et la sécrétion de l'IL-15 restent faibles par rapport aux autres cytokines. De plus, même si la production d'IL-15 est augmentée, le rapport cytokine sécrétée/cytokine séquestrée en intracellulaire reste inchangé (Bamford *et al.*, 1998). La production d'IL-15 est donc également régulée au niveau post-traductionnel.

Les peptides signaux des isoformes de l'IL-15 contribuent à l'inefficacité de la sécrétion de la cytokine. En effet, la substitution des séquences codantes des peptides signaux natifs de l'IL-15 par ceux de l'IL-2 (Bamford *et al.*, 1998), du CD33 (Onu *et al.*, 1997) ou de la chaîne IgV κ (Meazza *et al.*, 1997) augmente non seulement la traduction mais également la sécrétion de la cytokine. Inversement, le remplacement du peptide signal de l'IL-2 par le peptide signal long de l'IL-15 diminue fortement la sécrétion de l'IL-2 (Bamford *et al.*, 1998).

La nature du peptide signal de l'IL-15 détermine également le trafic intracellulaire de la protéine mature (Gaggero *et al.*, 1999 ; Meazza *et al.*, 1997 ; Onu *et al.*, 1997 ; Tagaya *et al.*, 1997). Si les protéines matures issues des transcrits LSP-IL-15 et SSP-IL-15 sont similaires, leurs détections intracellulaires sont différentes. Le précurseur protéique SSP-IL-15 est uniquement détecté aux niveaux cytoplasmique et nucléaire et n'est pas sécrété. Cette forme de transcrit a été mise en évidence dans le cœur, le thymus, l'appendice, les testicules et les lymphoblastes humains. Cette IL-15 intracellulaire régule négativement la production de la cytokine et tend à diminuer les défenses immunitaires *in vivo* (Nishimura *et al.*, 2000). Dans le cas du transcrit LSP-IL-15, plus faiblement traduit, le précurseur protéique est dirigé vers la voie sécrétoire et il est mis en évidence dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. On retrouve les transcrits LSP-IL-15 dans le muscle squelettique, le placenta, le cœur, le poumon, le foie, le thymus et les reins (Grabstein *et al.*, 1994). Cette forme sécrétée est impliquée *in vivo* dans la défense immunitaire contre les infections microbiennes (Nishimura *et al.*, 2000). La sécrétion de la cytokine reste cependant faible, à cause d'un trafic intracellulaire complexe du transcrit LSP-IL-15. Les précurseurs protéiques LSP-IL-15 sont en effet dirigés dans trois voies de routage différentes (Kurys *et al.*, 2000). Une partie des LSP-IL-15 ne serait pas glycosylée et serait dégradée au niveau des protéasomes. Une deuxième partie serait bien N-glycosylée mais le peptide signal subirait un clivage partiel et le devenir des protéines ainsi formées resterait à déterminer. Une troisième partie des précurseurs

protéiques serait N-glycosylée, subirait un clivage complet du peptide signal et serait enfin sécrétée.

La partie carboxy-terminale de l'IL-15 mature contrôlerait négativement la sécrétion de la cytokine, en agissant comme un signal de rétention. En effet, l'ajout d'une séquence protéique en COOH-terminal de la cytokine, comme un marqueur fluorescent GFP ("*Green Fluorescent Protein*") (Gaggero *et al.*, 1999) ou un marqueur antigénique "*Flag*" (Bamford *et al.*, 1998), augmente la sécrétion d'IL-15.

Enfin, la chaîne réceptrice spécifique de l'IL-15 jouerait un rôle dans la voie de sécrétion de l'IL-15 ainsi que dans sa stabilité intracellulaire. L'IL-15 et l'IL-15R α seraient pré-assemblés sous forme d'un complexe dès le réticulum endoplasmique/le Golgi pour ensuite entrer dans la voie sécrétoire (Duitman *et al.*, 2008 ; Mortier *et al.*, 2008).

B. Les chaînes réceptrices de l'IL-15

Les similitudes fonctionnelles de l'IL-15 et de l'IL-2 sont en partie expliquées par l'utilisation commune de chaînes transductrices IL-2/IL-15R β et γ_c (Bamford *et al.*, 1994 ; Giri *et al.*, 1994 ; Grabstein *et al.*, 1994). Cependant, les deux cytokines présentent des différences en termes de liaisons à diverses lignées cellulaires (Giri *et al.*, 1994 ; Kumaki *et al.*, 1995) et d'effets biologiques (Bulfone-Paus *et al.*, 1997a). Ce sont les chaînes réceptrices privées de chaque cytokine, l'IL-15R α et l'IL-2R α , qui leur confèrent une spécificité propre (Anderson *et al.*, 1995b).

1. La chaîne γ_c

La chaîne réceptrice γ_c (CD132) appartient à la famille des récepteurs de classe I. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de 64 kDa (**Figure 11**). Elle est codée par un gène localisé sur le chromosome 22, en position 22q13.1, organisé en 10 exons et 9 introns. Le précurseur protéique comprend 369 aa, dont 22 aa correspondent au peptide signal et 347 aa à la protéine mature (Takeshita *et al.*, 1992). La partie extracellulaire de la chaîne est composée de 240 aa présentant un module CHR caractéristique des récepteurs hématopoïétiques (quatre résidus cystéines formant deux ponts disulfures conservés C62-C72 et C102-C115, et une séquence WSEWS entre les aa 237-241) et six sites de N-glycosylation (positions N24, N71, N75, N84, N159, N249). Les parties transmembranaire et cytoplasmique sont constituées respectivement de 21 et 86 aa. La région cytoplasmique ne comporte pas d'activité catalytique mais une séquence de type SH2, assurant l'ancrage de protéines de signalisation par l'intermédiaire de phosphotyrosines. La chaîne γ_c joue donc un rôle dans la transduction du signal, notamment en interagissant avec JAK3 (Theze *et al.*, 1996). Cependant, cette chaîne seule ne présente aucune activité transductrice, il est nécessaire qu'elle soit associée à une autre chaîne réceptrice.

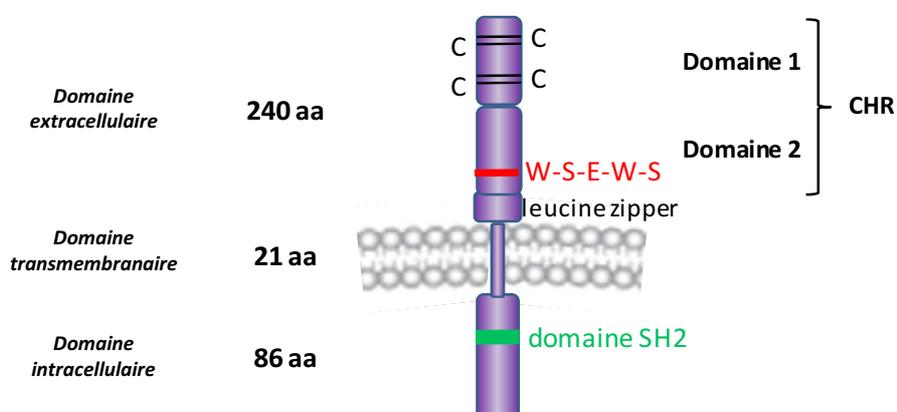


Figure 11 : La chaîne réceptrice γ_c

La chaîne γ_c est stockée dans le cytoplasme des lymphocytes T CD4⁺ au repos. Sa translocation à la membrane plasmique est consécutive à l'activation cellulaire et concomitante à l'induction des gènes de l'IL-2R β et de l'IL-2R α (Bani *et al.*, 1997). La chaîne γ_c est également essentielle à l'internalisation du récepteur trimérique de l'IL-2 suite à l'activation du récepteur par cette même cytokine (Takeshita *et al.*, 1992).

Une forme soluble de la chaîne γ_c a été mise en évidence dans des sérums murins (Meissner *et al.*, 2001) et dans des plasmas humains (Rose *et al.*, 2009). Cette chaîne soluble aurait comme propriété d'inhiber la prolifération de cellules cytokines γ_c -dépendantes et, en entrant en compétition avec la chaîne γ_c membranaire, participerait à la régulation négative des cytokines γ_c .

2. La chaîne IL-15R β

La chaîne réceptrice IL-15R β (IL-2R β , CD122) appartient à la famille des récepteurs de classe I. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de 70-75 kDa (Dukovich *et al.*, 1987 ; Tsudo *et al.*, 1986) (**Figure 12**). Elle est codée par un gène localisé sur le chromosome 22, en position 22q13.1, organisé en 10 exons et 9 introns. Le précurseur protéique est composé de 551 aa, dont 26 aa pour le peptide signal en NH₂-terminal et 525 aa pour la protéine mature. Le domaine extracellulaire de la chaîne est constitué de 214 aa. Il présente quatre sites de N-glycosylation (positions N29, N43, N71, N149) et un module CHR caractéristique des récepteurs hématopoïétiques (quatre résidus cystéines formant deux ponts disulfures conservés C74-C86 et C59-C110, et une séquence WSPWS entre les aa 220-224) (Miyazaki *et al.*, 1991). Les régions transmembranaire et cytoplasmique sont constituées respectivement de 25 et 286 aa. Ce domaine intracellulaire est beaucoup plus long que celui de la chaîne γ_c (86 aa). Il ne possède aucune activité tyrosine kinase intrinsèque mais il est caractérisé par quatre régions essentielles à la fixation de molécules de signalisation et donc à la transduction du signal : une région riche en résidus sérines, suivie d'une région riche en résidus acides et d'une région riche en résidus prolines, et un motif Box1 impliqué dans la liaison de JAK1 (Fujii *et al.*, 1995 ; Hatakeyama *et al.*, 1989).

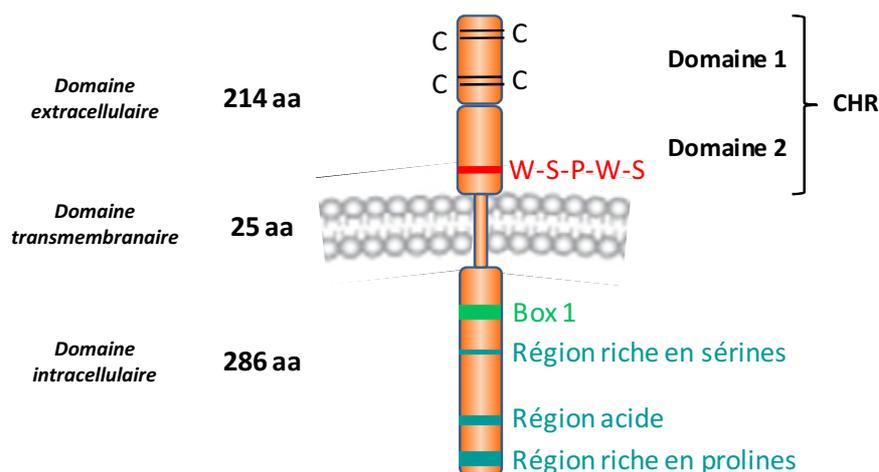


Figure 12 : La chaîne réceptrice IL-15R β

La chaîne IL-15R β joue, elle aussi, un rôle dans l'internalisation du récepteur de l'IL-2. En effet, après activation du récepteur trimérique de l'IL-2 par cette même cytokine, la chaîne IL-15R β est internalisée et dégradée (Subtil *et al.*, 1998).

Aucune forme soluble d'IL-15R β n'a été observée dans des plasmas humains ou dans des surnageants de culture de lymphocytes humains. Cependant, une forme soluble de chaîne IL-15R β (sIL-15R β) d'environ 50-55 kDa a été observée dans les surnageants de culture d'une lignée de NK humains immortalisée par l'EBV (lignée YT) et de différentes lignées leucémiques T CD4⁺ (Honda *et al.*, 1990). Cette sIL-15R β , toujours capable de fixer l'IL-2, pourrait participer à la régulation de la réponse immunitaire.

3. La chaîne IL-15R α

Le gène et les messagers de l'IL-15R α

Le gène de la chaîne réceptrice IL-15R α humaine est situé sur le chromosome 10, en position 10p15-p14, et est organisé en 7 exons et 6 introns. Les localisations chromosomiques des gènes humains de l'IL-15R α et de l'IL-2R α sont proches et suggèrent une origine commune (Anderson *et al.*, 1995b).

De nombreux transcrits de l'IL-15R α , issus d'épissages alternatifs du gène, ont été mis en évidence. Un épissage alternatif au niveau du septième exon du gène entraîne l'insertion d'une région génique en amont de l'exon 7 des ARNm. La forme longue de l'exon 7 ainsi obtenue est appelée exon 7'. Les différents transcrits de l'IL-15R α proviennent de l'expression différentielle de la région 7' et de la combinaison de différentes délétions (Δ) d'exons sans décalage de la phase de lecture. Lors du clonage de la chaîne humaine, trois isoformes naturelles de messagers ont été mises en évidence (Anderson *et al.*, 1995b) : IL-15R α (7), IL-15R α (7') et IL-15R $\alpha\Delta$ 3 (7). Des isoformes supplémentaires d'ARNm ont ensuite

été détectées dans divers tissus et lignées cellulaires (Dubois *et al.*, 1999) : IL-15R $\alpha\Delta 3$ (7'), IL-15R $\alpha\Delta 2$ (7), IL-15R $\alpha\Delta 2$ (7'), IL-15R $\alpha\Delta 2/3$ (7) et IL-15R $\alpha\Delta 2/3$ (7'). Trois autres isoformes de transcrits ont été révélées dans des mastocytes murins (Bulanova *et al.*, 2003) : IL-15R $\alpha\Delta 4$ (7), IL-15R $\alpha\Delta 3/4$ (7) et IL-15R $\alpha\Delta 3/4/5$ (7). Enfin, quatre dernières isoformes ont été très récemment retrouvées dans des cellules endothéliales cérébrales murines (Wu *et al.*, 2010) : IL-15R $\alpha\Delta(\frac{1}{2}$ exon 2) (7), IL-15R $\alpha(\Delta(\frac{1}{2}$ exon 2)/3/4/5) (7), IL-15R $\alpha(\Delta(\frac{1}{2}$ exon 2)/3/4/5) (7) et IL-15R $\alpha\Delta 4$ insertion 5-6 (7). Ces dernières isoformes présenteraient des délétions d'un seul codon dans l'exon 1 ou seulement d'une partie de l'exon 2 ou bien un ajout d'une séquence entre les exons 5 et 6.

Les différentes isoformes de messagers codent des chaînes IL-15R α différentes au niveau de leurs domaines extracellulaire et intracellulaire puisque les exons 2 à 5 codent le domaine extracellulaire (exon 2 : domaine « sushi », exon 3 : domaine flexible, exons 4 et 5 : domaine riche en thréonines et prolines), l'exon 6, la partie transmembranaire et le début de l'exon 7 ou 7', la partie cytoplasmique (**Figure 13**).

Actuellement, les fonctions de toutes ces différentes isoformes restent inconnues, même si certaines ont été mises en évidence sous forme protéique (Giron-Michel *et al.*, 2009).

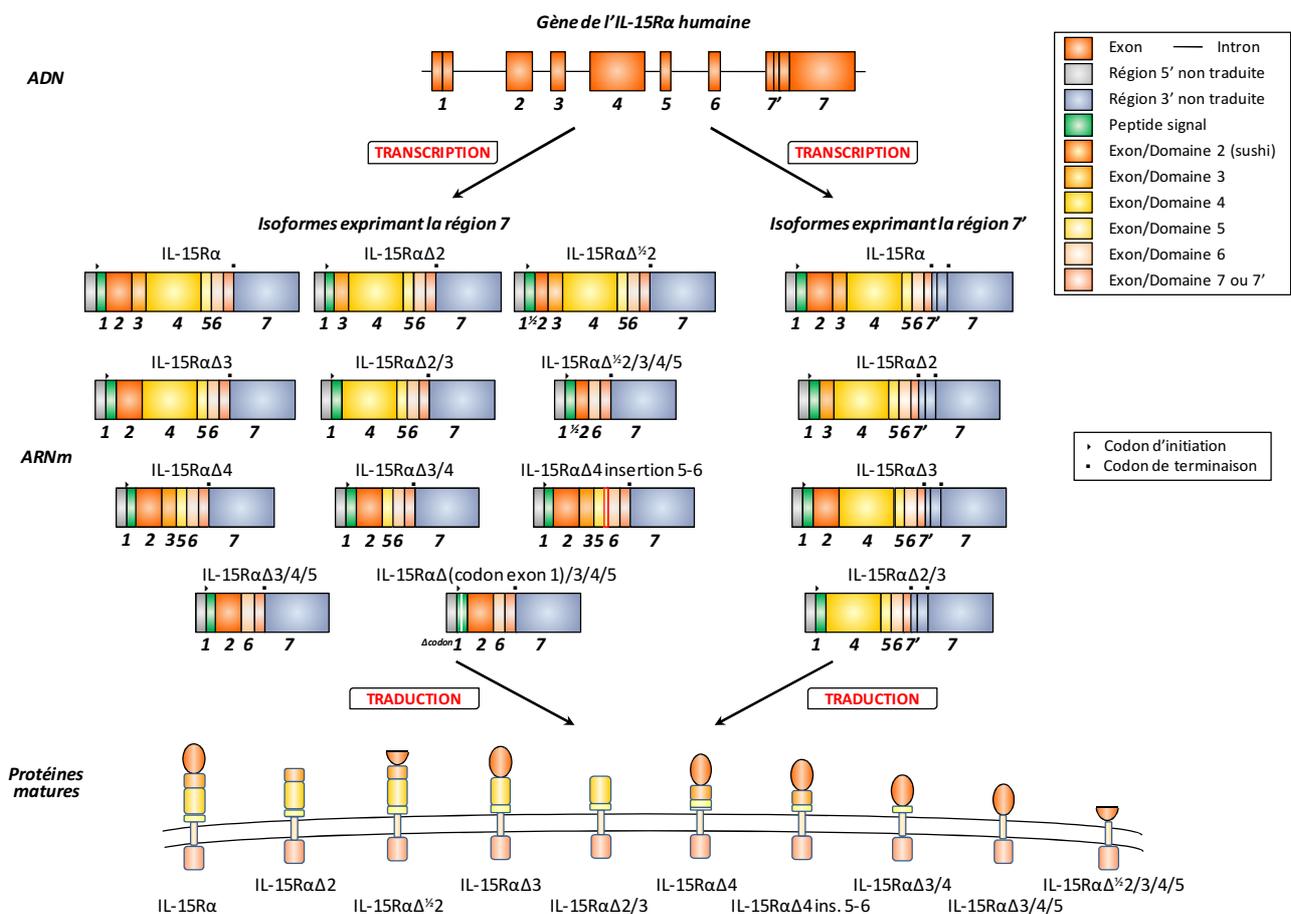


Figure 13 : Gène, transcription et traduction de la chaîne IL-15R α

La protéine IL-15R α sous forme membranaire ou soluble

Le précurseur protéique de la forme totale de l'IL-15R α , codé par les exons 1 à 7, est constitué de 267 aa dont 30 aa forment le peptide signal. La protéine mature est une glycoprotéine membranaire de la famille des récepteurs à domaine « sushi » présentant un poids moléculaire de 55-60 kDa (**Figure 14**).

Le domaine extracellulaire de 175 aa possède un domaine caractéristique, commun avec le récepteur spécifique de l'IL-2, appelé domaine « sushi » ou GP-1 (Glycoprotéine-1) ou encore SRC ("*Short Consensus Sequence*") (Giri *et al.*, 1995). Ce type de domaine a initialement été mis en évidence au niveau des protéines du complément (C1s, C1r, facteurs B et H) ou de facteurs de coagulation (facteur XIII et C4BP) et est impliqué dans la liaison des protéines (Davie *et al.*, 1986 ; Perkins *et al.*, 1988). Le domaine sushi de l'IL-15R α est codé par l'exon 2 et est situé en NH₂-terminal de la partie extracellulaire (aa 1 à 64). Il présente une structure globulaire rigide due à deux ponts disulfures intracaténaux imbriqués (C3-C45 et C29-C63) et aucune glycosylation. Les isoformes de l'IL-15R α qui ne comportent pas ce domaine sont incapables de lier l'IL-15, alors que les autres isoformes fixent l'IL-15 avec des affinités équivalentes, indépendamment de la présence des domaines extracellulaires codés par les exons 3, 4 et 5 (Bulanova *et al.*, 2003 ; Dubois *et al.*, 1999). De plus, le domaine sushi soluble est capable de fixer l'IL-15 (Wei *et al.*, 2001). Ce domaine semble donc être nécessaire et suffisant à la fixation de la cytokine. Néanmoins, il a récemment été montré que le domaine flexible codé par l'exon 3, et plus particulièrement ses 13 premiers acides aminés, participe également à la stabilisation et à la haute affinité du complexe IL-15/IL-15R α en contribuant à 10-20 % de l'énergie libre d'interaction (Bouchaud *et al.*, 2008).

La partie extracellulaire de la chaîne présente un seul site de N-glycosylation : le résidu N107 du domaine codé par l'exon 4 (Anderson *et al.*, 1995b). Mais la chaîne IL-15R α mature présente une masse moléculaire bien supérieure à sa masse moléculaire théorique (35 kDa) calculée à partir de la séquence protéique. En effet, il existe une vingtaine de sites de O-glycosylation sur des résidus sérines et thréonines (Giri *et al.*, 1995). Ainsi, les N-glycosylations augmentent la masse moléculaire de l'IL-15R α de 3 kDa et les O-glycosylations, de 20 kDa (Dubois *et al.*, 1999). Dans le cas de l'IL-15R α murine, tous les sites de O-glycosylation seraient localisés dans le domaine codé par l'exon 4 (Bulanova *et al.*, 2003).

Le domaine transmembranaire est constitué de 23 aa et la partie intracellulaire comporte soit 41 aa si la région est codée par l'exon 7, soit 26 aa si la région est codée par l'exon 7'. Cette courte région intracellulaire semble pas ou peu impliquée dans la prolifération cellulaire induite par l'IL-15 (Anderson *et al.*, 1995b).

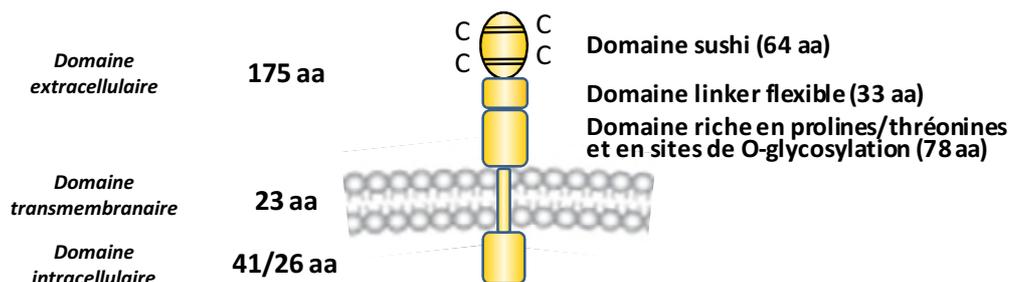


Figure 14 : La chaîne réceptrice IL-15R α

Une forme soluble de la chaîne IL-15R α (sIL-15R α) a été mise en évidence à la fois chez la souris et l'humain (Budagian *et al.*, 2004a ; Mortier *et al.*, 2004). Cette forme est issue d'un clivage protéolytique de la forme membranaire, assuré notamment par la TACE/ADAM 17 et accentué en présence de PMA (Phorbol-Myristate Acetate) ou d'ionomycine. Les sIL-15R α murin et humain ont une masse moléculaire apparente de 30 et 42 kDa respectivement.

La chaîne sIL-15R α lie l'IL-15 avec une haute affinité et entre donc en compétition avec la chaîne IL-15R α membranaire des récepteurs trimériques de l'IL-15. Elle peut ainsi inhiber la signalisation induite par l'IL-15. La chaîne soluble contrôle également la biodisponibilité de l'IL-15 puisqu'elle prolonge son temps de demi-vie et peut soit libérer la cytokine, soit la séquestrer sous forme de complexe IL-15/IL-15R α . D'autre part, le domaine sushi de l'IL-15R α soluble exerce un effet agoniste de l'IL-15 sur les récepteurs membranaires IL-15R β / γ_c de faible affinité (Mortier *et al.*, 2006). Ainsi, le sIL-15R α influence la nature et/ou la durée de la signalisation induite par l'IL-15 et permet le passage d'un mode d'action de l'IL-15 autocrine ou juxtacrine vers un mode d'action paracrine ou endocrine.

Sites d'expression et régulation de l'IL-15R α

Les messagers codant pour la chaîne IL-15R α totale (ARNm présentant les exons 1 à 7) ont été mis en évidence dans de nombreux tissus et lignées cellulaires. Ils ont été détectés dans le foie, le cœur, la rate, le poumon, le muscle squelettique, la prostate, l'ovaire, l'intestin grêle et le colon, mais aussi dans des tissus fœtaux comme l'épithélium pigmentaire rétinien, la microglie, le cortex cérébral, l'hippocampe et le thalamus (Anderson *et al.*, 1995b ; Giri *et al.*, 1995 ; Hanisch *et al.*, 1997 ; Kumaki *et al.*, 1996a ; Kurowska *et al.*, 2002). Des transcrits de l'IL-15R α ont également été décelés dans les fibroblastes dermiques, les lymphocytes T et les monocytes du sang périphérique, les cellules endothéliales vasculaires, les cellules NK, les neutrophiles et les cellules dendritiques spléniques (Anderson *et al.*, 1995b ; Angiolillo *et al.*, 1997 ; Carson *et al.*, 1997 ; Mattei *et al.*, 2001 ; McDonald *et al.*, 1998). La chaîne IL-15R α semble de plus être fonctionnelle à la surface de cellules rénales (Tejman-Yarden *et al.*, 2005).

Les transcrits de l'IL-15R α présentent donc une vaste distribution cellulaire et tissulaire, contrairement à ceux de l'IL-2R α . Cette expression ubiquitaire de l'IL-15 et de sa chaîne réceptrice spécifique suggère un spectre d'action très large de cette cytokine.

L'expression des ARNm de l'IL-15R α est faible dans les lymphocytes T au repos mais elle est augmentée après stimulation par l'IL-2, un anticorps anti-CD3 ou le mitogène PMA. Elle est augmentée dans les lignées macrophagiques en réponse à l'IFN γ (Giri *et al.*, 1995). Le LPS ou les IFN $\alpha\beta$ augmentent également l'expression des transcrits de l'IL-15R α dans les cellules dendritiques (Mattei *et al.*, 2001). A l'inverse, la dexaméthasone diminue l'expression des transcrits IL-15R α et inhibe leur augmentation par les mitogènes dans les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Chae *et al.*, 1996). L'activité transcriptionnelle du gène de l'IL-15R α pourrait aussi être contrôlée par NF- κ B et IRF-4 (Mariner *et al.*, 2001 ; Mariner *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'IL-15 elle-même induit une diminution rapide de l'expression membranaire de sa chaîne réceptrice spécifique dans les lymphocytes T et B activés (Kumaki *et al.*, 1996a).

Enfin, la chaîne IL-15R α peut être endocytée et la formation du complexe IL-15/IL-15R α puis son internalisation dans le compartiment endosomal permet son recyclage à la surface cellulaire (Dubois *et al.*, 2002). Ce complexe induit une persistance de l'IL-15 à la surface cellulaire et contribue à la survie de lymphocytes T IL-15R α ⁺ même dans un milieu de culture sévré en IL-15.

C. Les récepteurs et les voies de signalisation de l'IL-15

1. Récepteurs et modes de présentation de l'IL-15

Les chaînes réceptrices de l'IL-15, seules ou associées, peuvent constituer différents récepteurs fonctionnels pour la cytokine (**Figure 15**).

Récepteur d'affinité intermédiaire

Les chaînes réceptrices IL-15R β et γ_c isolées ne peuvent lier l'IL-15 mais leur association permet la formation d'un récepteur d'affinité intermédiaire pour l'IL-15 ($K_d \sim 10^{-9}$ M) (Balasubramanian *et al.*, 1995 ; de Jong *et al.*, 1996). Ce récepteur dimérique est nécessaire et suffisant à la transduction du signal induit par l'IL-15.

Récepteurs de haute affinité

Contrairement à la chaîne IL-2R α , la chaîne IL-15R α seule a pour particularité de fixer sa cytokine spécifique avec une haute affinité ($K_d \sim 10^{-10}$ M) (Anderson *et al.*, 1995b). Ce récepteur monomérique serait capable de transduire des signaux intracellulaires (Bulanova *et al.*, 2001 ; Bulfone-Paus *et al.*, 1999) mais ne permettrait pas l'induction de la prolifération cellulaire (Anderson *et al.*, 1995b ; Giri *et al.*, 1995).

L'IL-15R α peut s'associer aux chaînes réceptrices IL-15R β et γ_c pour constituer un récepteur de haute affinité pour l'IL-15 ($K_d \sim 10^{-11}$ M) (de Jong *et al.*, 1996). Le récepteur trimérique ainsi formé assure la transduction du signal de l'IL-15.

Cis- et trans-présentation de l'IL-15

L'IL-15 est connue traditionnellement pour se fixer et stimuler en *cis* des cellules exprimant le récepteur IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ membranaire (comme les cellules T CD8⁺ mémoires). Cependant, l'originalité de cette cytokine est sa capacité à être *trans*-présentée. Dans ce contexte, la chaîne IL-15R α membranaire, exprimée à la surface de cellules productrices d'IL-15 (macrophages, cellules dendritiques, cellules épithéliales), présente l'IL-15 en *trans* à des cellules cibles (cellules NK ou T CD8⁺ mémoires) exprimant uniquement le récepteur IL-15R β/γ_c (Burkett *et al.*, 2004 ; Dubois *et al.*, 2002 ; Mortier *et al.*, 2009). Cette spécificité serait due au fait que la chaîne IL-15R α lie la cytokine avec une haute affinité en absence des chaînes IL-15R β et γ_c .

Il apparaît aujourd'hui que la *trans*-présentation de l'IL-15 est le mécanisme d'action prédominant de cette cytokine *in vivo* (Burkett *et al.*, 2004). D'un autre côté, le fait que des cellules cibles de l'IL-15 expriment le récepteur trimérique à leur surface et que de l'IL-15 libre soit détectée dans le sérum de patients atteints de pathologies inflammatoires (Waldmann, 2004) semblent indiquer que le mécanisme de *cis*-présentation de l'IL-15 existe bien dans certains contextes biologiques (Schluns *et al.*, 2005). Ce serait la grande flexibilité

du domaine « linker » et de la partie N-terminale du domaine riche en prolines et thréonines de l'IL-15R α qui permettrait une association identique de la cytokine avec ses trois chaînes réceptrices que ce soit en mode *cis* ou *trans* (Olsen *et al.*, 2007).

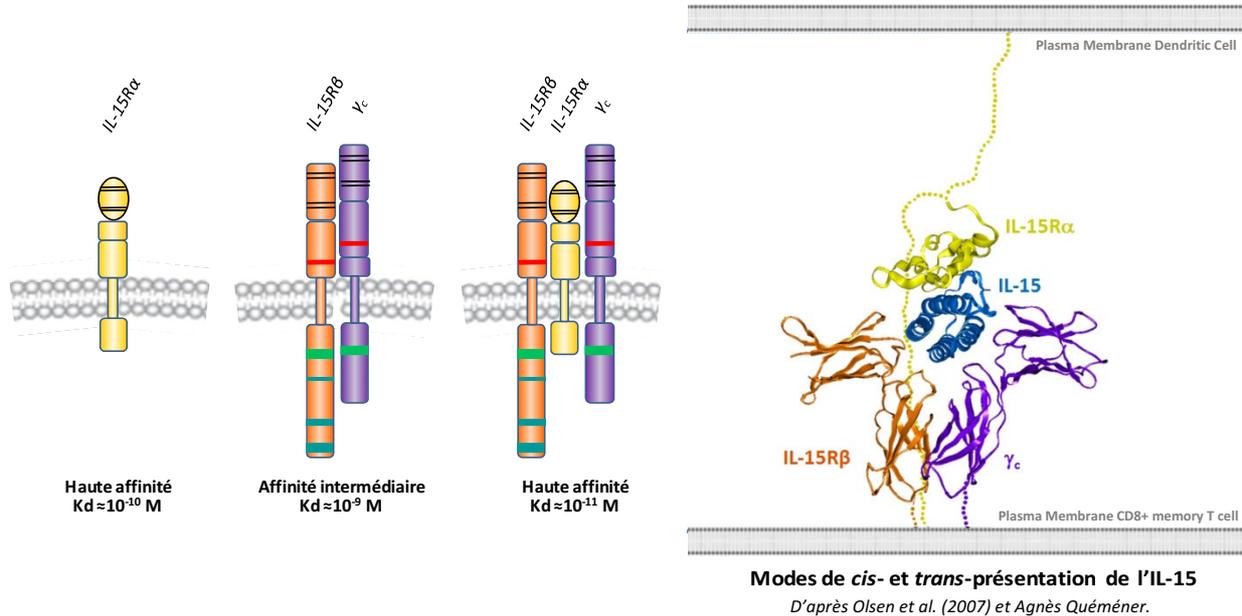


Figure 15 : Les récepteurs fonctionnels et les modes de présentation de l'IL-15

La *trans*-présentation de l'IL-15 peut également être assurée par la forme soluble d'IL-15R α et il a été montré que le complexe soluble IL-15/IL-15R α assure toujours l'activation de cellules NK *in vitro* et *in vivo* (Rubinstein *et al.*, 2006 ; Stoklasek *et al.*, 2006).

2. Signalisation par le récepteur IL-15R β / γ_c

Comme présenté en première partie d'introduction (I.B.3), la transduction du signal de l'IL-15, comme celle de toutes les cytokines γ_c , met en jeu trois voies principales d'activation via son récepteur IL-15R β / γ_c : la voie JAK/STAT, la voie PI3-K et la voie des MAPK.

Néanmoins, les voies de signalisation de l'IL-15 présentent quelques particularités (**Figure 16**) :

- la **voie JAK/STAT** : suite à l'interaction cytokine/récepteur, les protéines JAK1 et JAK3 s'autophosphorylent et phosphorylent les résidus tyrosines des chaînes IL-15R β et γ_c auxquelles elles sont constitutivement liées. Les facteurs STAT5 et STAT3 se fixent alors aux phosphotyrosines (Y392 et Y510) de la chaîne IL-15R β . Une fois phosphorylés à leur tour, ces facteurs STATs se dissocient des chaînes réceptrices, dimérisent et sont transloqués dans le noyau (Johnston *et al.*, 1995) via les protéines de transport nucléaire Rac1 et MgcRacGAP (Kawashima *et al.*, 2006). STAT5 participerait à la protection anti-apoptotique et à la prolifération cellulaire (Goldsmith *et al.*, 1995 ; Lin & Leonard, 1997 ; Zamorano *et al.*, 1998). STAT3 serait impliqué dans le cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose (Catlett-Falcone *et al.*, 1999 ; Takeda *et al.*, 1998).

- la **voie de la PI3-K** : la phosphorylation de la tyrosine 338 de la chaîne IL-15R β par JAK1 et JAK3 induit le recrutement de la protéine adaptatrice Shc. Les protéines Grb2 et Gab2 s'associent ensuite à Shc, ce qui entraîne la phosphorylation de Gab2 (Gu *et al.*, 2000). Gab2 constitue alors un site de recrutement à la membrane de la PI3-K qui phosphoryle PIP₂ en PIP₃. Cette conversion entraîne le recrutement et la phosphorylation d'Akt (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003). Akt agirait en tant qu'activateur de la transcription, de la traduction protéique et de la survie cellulaire (Datta *et al.*, 1997 ; Reif *et al.*, 1997 ; Romashkova & Makarov, 1999).

- la **voie des MAPKs** : la phosphorylation du résidu Y338 de la chaîne IL-15R β par JAK1 induit le recrutement de Shc (Friedmann *et al.*, 1996). Par la suite, Shc s'associe à Grb2 et Sos et active la protéine Ras, ancrée à la membrane plasmique. La protéine Raf est activée à son tour et phosphoryle les MAPKs p38, JNK et Erk1/2 (Ravichandran & Burakoff, 1994). La phospho-Y338 de l'IL-15R β permet aussi le recrutement et la phosphorylation de Gab2 par JAK3. La protéine Gab2 activée et associée à SHP2 et à la PI3-K formerait un complexe avec Shc/Grb2/Sos capable d'activer les MAPKs (Gadina *et al.*, 1999 ; Gadina *et al.*, 2000). Enfin, une autre voie indépendante des STATs relierait JAK3 aux MAPKs par l'activation de Pyk2 ("Proline-rich tyrosine kinase 2") (Miyazaki *et al.*, 1998) qui induirait la phosphorylation de JNK et Erk1/2 (Dikic *et al.*, 1996 ; Tokiwa *et al.*, 1996).

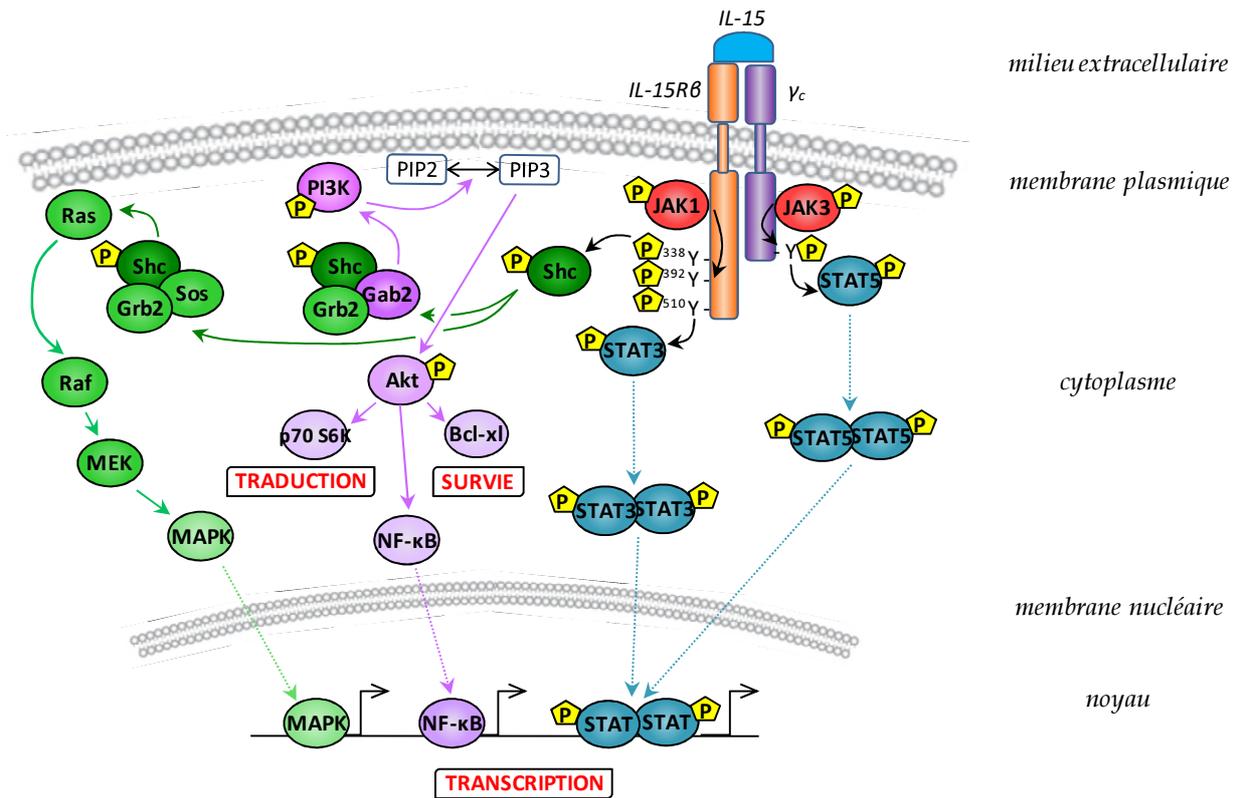


Figure 16 : Les voies de signalisation de l'IL-15 par le récepteur IL-15Rβ/γc

Avec → activation et ⇢ translocation.

La chaîne IL-15Rα peut s'associer au récepteur IL-15Rβ/γc pour former un complexe trimérique de haute affinité pour l'IL-15. Les signaux induits par ce complexe IL-15Rα/β/γc sont identiques à ceux induits par le récepteur dimérique mais ils sont obtenus à de plus faibles doses d'IL-15 (de l'ordre du picomolaire).

3. Signalisation par la chaîne IL-15R α

La chaîne IL-15R α n'est actuellement pas considérée comme ayant un rôle majeur dans la transduction du signal de l'IL-15. Elle a longtemps été décrite comme dépourvue d'activité transductrice (Giri *et al.*, 1995) et sa courte région intracellulaire ne semble pas intervenir dans la prolifération cellulaire induite par l'IL-15 (Anderson *et al.*, 1995b).

Cependant, des travaux plus récents ont montré que le domaine cytoplasmique de l'IL-15R α pouvait interagir avec les protéines de signalisation TRAF2 ("*TNF-R Associated Factor 2*") et Syk ("*Spleen tyrosine kinase*"), même si le rôle de ces interactions n'est pas bien établi *in vivo* :

- la protéine adaptatrice **TRAF2** : la partie intracellulaire de la chaîne IL-15R α présente des homologies de séquence avec les motifs de fixation de TRAF2, retrouvés au niveau du CD30 par exemple. Il a été montré que, dans la lignée fibroblastique murine L929 (IL-15R α ⁺ mais IL-15R β / γ _c), la fixation de l'IL-15 sur son récepteur spécifique induit le recrutement de TRAF2 (Bulfone-Paus *et al.*, 1999). En absence d'IL-15, la fixation du TNF α sur son récepteur TNFR1 ("*TNF α -receptor type 1*") entraîne le recrutement et la formation du complexe de mort TRAF2/FADD/TRADD/RIP. En présence d'IL-15, TRAF2 est capté et ne s'associe plus à ses partenaires pour former le complexe de mort. Aussi, la voie pro-apoptotique des caspases n'est plus activée mais, au contraire, l'association IL-15/IL-15R α /TRAF2 induit la cascade anti-apoptotique NIK/IKK/NF- κ B.

L'implication de la chaîne IL-15R α dans la transduction du signal de l'IL-15 par activation de NF- κ B a également été mise en évidence dans des neutrophiles (McDonald *et al.*, 1998), des lignées de mélanomes (Pereno *et al.*, 2000), des précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ et des lignées leucémiques humaines (Giron-Michel *et al.*, 2003).

- la tyrosine kinase **Syk** : dans les lignées lymphocytaires B humaines et en réponse à une stimulation par l'IL-15, Syk se fixe sur la phospho-Y227 de la chaîne IL-15R α (Bulanova *et al.*, 2001). La kinase Syk activée phosphoryle la chaîne IL-15R α et PLC γ (Phospholipase C γ). Dans ces lignées lymphocytaires B, la fixation de l'IL-15 sur l'IL-15R α seule entraîne une prolifération cellulaire modeste mais significative et une protection contre l'apoptose induite par le C2-céramide.

De plus, une étude récente a montré que le remplacement de la partie intracellulaire de l'IL-15R α par celle de l'IL-2R α entraînait une diminution de la réponse à l'IL-15 par le récepteur trimérique notamment au niveau de la prolifération cellulaire (Wu *et al.*, 2008). Il semblerait donc bien que cette chaîne réceptrice ait un rôle dans la transduction du signal de l'IL-15...

4. Rétro-signalisation de l'IL-15

Enfin, l'IL-15 pourrait à elle seule constituer un récepteur fonctionnel capable d'induire la transduction de signaux cellulaires. En effet, plusieurs équipes ont pu montrer que de l'IL-15 membranaire stimulée par une forme soluble d'IL-15R α ou par un anticorps anti-IL-15 induisait, par un mécanisme de « rétro-signalisation », l'activation des voies MAPKs et FAKs et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce mécanisme serait également impliqué dans l'adhésion des monocytes, la migration de cellules cancéreuses prostatiques et dans la différenciation de cellules cancéreuses rénales (Budagian *et al.*, 2004b ; Khawam *et al.*, 2009 ; Neely *et al.*, 2004).

D. Les fonctions biologiques de l'IL-15

L'IL-15 présente *in vitro* une certaine redondance fonctionnelle avec l'IL-2, liée à une utilisation commune de deux chaînes transductrices. Mais à l'inverse de l'IL-2 et de sa chaîne spécifique IL-2R α , l'IL-15 et l'IL-15R α présentent une large distribution d'expression cellulaire et tissulaire. L'IL-15 exerce ainsi *in vivo* des activités biologiques nombreuses et variées et pourrait intervenir dans diverses pathologies.

1. Les fonctions de l'IL-15 dans un contexte physiologique

Les fonctions de l'IL-15 dans le système immunitaire

Le système immunitaire est caractérisé par sa capacité à lutter rapidement et de manière non spécifique contre des infections (immunité innée) et par sa capacité à éliminer spécifiquement des pathogènes de manière dépendante des antigènes (immunité adaptative).

Les travaux réalisés sur des souris IL-15^{-/-} ont montré que ces animaux présentaient une diminution importante du nombre de cellules NK, de lymphocytes T CD8⁺ mémoires et d'IELs à TCR ("T Cell Receptor") de type $\gamma\delta$ ou exprimant un CD8 $\alpha\alpha$ (Kennedy *et al.*, 2000). De même, les souris IL-15R α ^{-/-} montrent une déficience en cellules NK, NK-T, et IELs à TCR $\gamma\delta$ et une diminution en lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Lodolce *et al.*, 1998). Le système IL-15 est crucial pour les IELs, les cellules NK et NK-T, et nécessaire aux lymphocytes T CD8⁺. Il participe donc principalement au niveau de l'immunité innée.

Plus globalement, le système IL-15 est présent ou intervient spécifiquement pour les cellules NK et NK-T, les lymphocytes T, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les lymphocytes B (Tableaux 1 et 2).

Type cellulaire	Caractéristiques cellulaires	Effets de l'IL-15 ou du complexe IL-15/IL-15R α
Cellules NK	<ul style="list-style-type: none"> cellules caractérisées par une activité tueuse naturelle ("Natural Killer"), une fonction tueuse activée par les lymphokines (LAK, "Lymphokine-Activated Killing" et une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, "Antibody-Dependent Cellular Toxicity") 	<ul style="list-style-type: none"> induction du développement à partir des cellules souches hématopoïétiques (Williams <i>et al.</i>, 1997) différenciation en cellules NK CD56⁺ (Yu <i>et al.</i>, 1998) et CD16⁺ KIR⁺ <i>in vivo</i> (Huntington <i>et al.</i>, 2009) effet chimiotactique favorisant l'adhésion dépendante de la LFA-1 ("Leukocyte Function-Associated Antigen-1") sur l'endothélium vasculaire (Allavena <i>et al.</i>, 1997) activation de l'activité cytotoxique par les fonctions NK et ADCC (Carson <i>et al.</i>, 1994) sécrétion de cytokines (IFNγ, TNFα, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β) (Bluman <i>et al.</i>, 1996 ; Carson <i>et al.</i>, 1994 ; Fehniger <i>et al.</i>, 1998 ; Fehniger <i>et al.</i>, 1999) augmentation de la survie par expression de Bcl-2 (Carson <i>et al.</i>, 1997)
Cellules NK-T	<ul style="list-style-type: none"> cellules NK1.1⁺ et TCR$\alpha\beta$⁺ présentant une activité lytique 	<ul style="list-style-type: none"> expansion, maturation fonctionnelle et survie (Kennedy <i>et al.</i>, 2000) augmentation de la prolifération et de la sécrétion d'IFNγ (Ohkawa <i>et al.</i>, 2001 ; Ohteki <i>et al.</i>, 1997)
Lymphocytes T à TCR $\alpha\beta$	<ul style="list-style-type: none"> les lymphocytes T à TCR$\alpha\beta$ (CD4-CD8⁻, CD4⁺ CD8⁺, CD4⁺, CD8⁺) représentent 95 % des lymphocytes T l'activation par le TCR induit l'expression de l'IL-15Rα membranaire 	<ul style="list-style-type: none"> prolifération des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ mémoires et CD8⁺ naïfs (Kanegane & Tosato, 1996) protection des lymphocytes T activés contre l'apoptose (Bulfone-Paus <i>et al.</i>, 1997b) effet chimiotactique pour les lymphocytes T au repos ou activés mettant en jeu la LFA-1 et les molécules d'adhésion ICAM ("Intercellular Adhesion Molecules") des cellules endothéliales (Nieto <i>et al.</i>, 1996 ; Sancho <i>et al.</i>, 1999 ; Wilkinson & Liew, 1995) augmentation de l'expression de l'IL-2Rα (CD25), Fas (CD95), le CD30, le TNF-R2, le CD40L, le CD69 et le CD94/NKG2-A (Bulfone-Paus <i>et al.</i>, 1997a ; Kanegane & Tosato, 1996 ; Mingari <i>et al.</i>, 1998) diminution de l'expression de l'IL-15Rα et du CD27 (Bulfone-Paus <i>et al.</i>, 1997a ; Kumaki <i>et al.</i>, 1996b) sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes et d'IFNγ et d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ activés (Borger <i>et al.</i>, 1999 ; Bulfone-Paus <i>et al.</i>, 1997a) sécrétion de chimiokines (MIP-1α, MIP-1β, RANTES) et augmentation de la transcription de leurs récepteurs (CCR-1, -2, -4 et -5) (Perera <i>et al.</i>, 1999)
Lymphocytes T à TCR $\gamma\delta$	<ul style="list-style-type: none"> les lymphocytes T dendritiques épidermiques à TCR$\gamma\delta$ (DETC, "Dendritic Epidermal T Cells") sont des CPA intervenant dans la défense immunitaire de l'épiderme 	<ul style="list-style-type: none"> prolifération et survie après activation (Edelbaum <i>et al.</i>, 1995)
IELs	<ul style="list-style-type: none"> lymphocytes T localisés à la surface des cellules épithéliales intestinales et jouant un rôle dans l'immunité des muqueuses les IELs à TCR$\alpha\beta$ expriment les chaînes CD8$\alpha\beta$ ou CD8$\alpha\alpha$ ou sont CD4⁺, les IELs à TCR$\gamma\delta$ sont tous CD8$\alpha\alpha$ 	<ul style="list-style-type: none"> survie des IELs CD8$\alpha\alpha$ à TCR$\alpha\beta$ et TCR$\gamma\delta$ impliquant la production d'IL-15 par la voie des TLRs et la protéine adaptatrice MyD88 (Yu <i>et al.</i>, 2006) prolifération et protection contre l'apoptose des IELs à TCR$\gamma\delta$ par augmentation de Bcl-2 et stabilisation de la quantité de Bcl-xL (Chu <i>et al.</i>, 1999 ; Inagaki-Ohara <i>et al.</i>, 1997) augmentation de la cytotoxicité et de la production d'IFNγ des IELs à TCR$\gamma\delta$ (Ebert, 1998)

Tableau 1 : Effets de l'IL-15 sur les cellules immunitaires dépendantes du système IL-15/IL-15R

Type cellulaire	Caractéristiques cellulaires	Effets de l'IL-15 ou du complexe IL-15/IL-15R α
Monocytes/ Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> ♦ IL-15Rα/β/γc⁺ (Anderson <i>et al.</i>, 1995b ; Bosco <i>et al.</i>, 1994 ; Espinoza-Delgado <i>et al.</i>, 1990) ♦ principales sources d'IL-15 de l'organisme (Grabstein <i>et al.</i>, 1994) 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ production d'IL-8 et de MPC-1 ("<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>") (Badolato <i>et al.</i>, 1997) ♦ expression du CD40 membranaire qui induit la sécrétion d'IL-12 et l'expression de l'IL-12Rβ1 (Avice <i>et al.</i>, 1998 ; Wu <i>et al.</i>, 1997)
Cellules dendritiques (DC)	<ul style="list-style-type: none"> ♦ IL-15Rα⁺ (Mattei <i>et al.</i>, 2001) ♦ production d'IL-15 déclenchée par l'activité phagocytaire de ces cellules, le CD40L, le LPS ou les IFN$\alpha\beta$ (Jonuleit <i>et al.</i>, 1997 ; Kuniyoshi <i>et al.</i>, 1999 ; Mattei <i>et al.</i>, 2001) 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ sécrétion d'IFNγ médiée par la production d'IL-12 (Mattei <i>et al.</i>, 2001 ; Ohteki <i>et al.</i>, 2001) ♦ retard de l'apoptose par augmentation de l'expression de Bcl-xL (Pirtskhalaishvili <i>et al.</i>, 2000) ♦ en combinaison avec le GM-CSF, permet la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (Mohamadzadeh <i>et al.</i>, 2001)
IKDC ("<i>IFN-producing Killer Dendritic Cells</i>")	<ul style="list-style-type: none"> ♦ cellules NK et/ou DC (B220⁺, CD11c⁺, CD3⁻, NK1.1⁺) 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ prolifération cellulaire mais inhibition des CMH de classe I ou II (Ullrich <i>et al.</i>, 2008)
Mastocytes	<ul style="list-style-type: none"> ♦ IL-15RX⁺ (récepteur à l'IL-15 non conventionnel et propre à ce type cellulaire) (Tagaya <i>et al.</i>, 1996) ♦ production de facteurs inflammatoires (histamine, protéinases, cytokines, ...) 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ prolifération (Tagaya <i>et al.</i>, 1996) et protection contre l'apoptose par l'intermédiaire de Bcl-xL (Masuda <i>et al.</i>, 2001) ♦ production d'IL-4 (Masuda <i>et al.</i>, 2000)
Neutrophiles	<ul style="list-style-type: none"> ♦ IL-15Rα/β/γc⁺ (Djeu <i>et al.</i>, 1993 ; Girard <i>et al.</i>, 1998 ; Liu <i>et al.</i>, 1994) ♦ cellules polymorphonucléaires essentielles à la défense antibactérienne 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ modification morphologique, augmentation de l'activité phagocytaire et de la synthèse protéique (Girard <i>et al.</i>, 1996) ♦ induction de NF-κB et production d'IL-8, d'IL-1Ra, d'IL-1β, d'IL-17 (Ferretti <i>et al.</i>, 2003 ; Jablonska <i>et al.</i>, 2001 ; McDonald <i>et al.</i>, 1998) ♦ retard de l'apoptose via l'expression du facteur anti-apoptotique Mcl-1 (Bouchard <i>et al.</i>, 2004 ; Pelletier <i>et al.</i>, 2002)
Éosinophiles	<ul style="list-style-type: none"> ♦ sources de cystéinyl leukotriènes intervenant dans l'inflammation 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ survie cellulaire par retard de l'apoptose via une activation de NF-κB et une boucle autocrine de GM-CSF (Hoontrakoon <i>et al.</i>, 2002)
Lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none"> ♦ responsables de la réponse immunitaire humorale 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ induction de la prolifération et stimulation, en synergie avec le CD40L, de la synthèse d'IgM, d'IgG1 et d'IgA (Armitage <i>et al.</i>, 1995) ♦ expression membranaire de l'IL-2Rα, mais diminution de l'IL-15Rα (Kumaki <i>et al.</i>, 1996b)

Tableau 2 : Effets de l'IL-15 sur les autres cellules immunitaires

Les fonctions de l'IL-15 en dehors du système immunitaire

L'IL-15 et sa chaîne spécifique IL-15R α sont détectées dans différents tissus n'intervenant pas dans la réponse immunitaire. Le système IL-15 aurait donc un rôle biologique hors du système immunitaire.

Les souris IL-15^{-/-} ou IL-15R α ^{-/-} ne présentent pas de déficience au niveau intestinal, vasculaire, musculaire, osseux ou cérébral (Kennedy *et al.*, 2000 ; Lodolce *et al.*, 1998) mais, cependant, des cellules de ces différentes origines répondent spécifiquement à l'IL-15 (Tableau 3).

Type cellulaire	Effets de l'IL-15 ou du complexe IL-15/IL-15R α
Cellules épithéliales intestinales	<ul style="list-style-type: none"> ♦ prolifération cellulaire <i>in vitro</i> (Reinecker <i>et al.</i>, 1996) ♦ régulation de la formation des jonctions cellulaires de la barrière intestinale (Nishiyama <i>et al.</i>, 2001)
Cellules épithéliales rénales	<ul style="list-style-type: none"> ♦ activation des voies JAK/STAT et protection contre l'apoptose (Shinozaki <i>et al.</i>, 2002 ; Tejman-Yarden <i>et al.</i>, 2005)
Cellules endothéliales vasculaires	<ul style="list-style-type: none"> ♦ angiogénèse <i>in vivo</i> et protection contre l'apoptose (Angiolillo <i>et al.</i>, 1997 ; Yang <i>et al.</i>, 2002)
Fibroblastes	<ul style="list-style-type: none"> ♦ protection contre l'apoptose (Yang <i>et al.</i>, 2002)
Cellules musculaires	<ul style="list-style-type: none"> ♦ différenciation (Quinn <i>et al.</i>, 1997) ♦ fonction anabolique sur le muscle squelettique par augmentation de la synthèse protéique et diminution de la dégradation protéique (Busquets <i>et al.</i>, 2005 ; Quinn <i>et al.</i>, 2002 ; Quinn <i>et al.</i>, 1995)
Cellules adipeuses	<ul style="list-style-type: none"> ♦ régulation de la masse adipeuse et sécrétion d'adiponectine (Carbo <i>et al.</i>, 2001 ; Quinn <i>et al.</i>, 2005) ♦ production d'α-calcineurine et inhibition de la différenciation (Almendro <i>et al.</i>, 2009) ♦ diminution des dépôts lipidiques (Barra <i>et al.</i>, 2009)
Ostéoclastes	<ul style="list-style-type: none"> ♦ maturation et rôle dans la résorption osseuse (Ogata <i>et al.</i>, 1999)
Cellules microgliales	<ul style="list-style-type: none"> ♦ prolifération et survie (Hanisch <i>et al.</i>, 1997) ♦ phosphorylation de JAK1 et diminution de la production d'oxyde nitrique (NO) (Hanisch <i>et al.</i>, 1997)

Tableau 3 : Effets de l'IL-15 sur les cellules non immunitaires

2. Les fonctions de l'IL-15 dans un contexte pathologique

Les souris IL-15^{-/-} ou IL-15R α ^{-/-} ne présentent pas de défaut de développement mais leurs déficits en cellules NK, NK-T, lymphocytes T CD8⁺ mémoires et IELs à TCR $\gamma\delta$ les rendent immunodéficientes vis-à-vis des pathogènes environnementaux (Kennedy *et al.*, 2000 ; Lodolce *et al.*, 1998). Au contraire, les souris transgéniques surexprimant l'IL-15 présentent un nombre de cellules NK et de lymphocytes T CD8⁺ très augmenté et contrôlent plus efficacement les infections (Fehniger *et al.*, 2001 ; Nishimura *et al.*, 2000 ; Yajima *et al.*, 2001).

La protéine IL-15 est très rarement détectable dans des conditions physiologiques mais elle peut être détectée dans certains contextes pathologiques. Aussi, l'IL-15 intervient dans la défense anti-virale ou anti-microbienne (bactéries et parasites) mais également dans le cadre de pathologies auto-immunes et de cancers.

Infections virales et microbiennes

Les infections *in vitro* de PBMC humains par le HHV-6 ("Human Herpes Virus type-6"), le HHV-7, le HSV-1 ("Herpes Simplex Virus type-1") ou l'EBV ("Epstein-Barr Virus") augmentent la transcription et la sécrétion d'IL-15 par les monocytes et les cellules NK (Atedzoe *et al.*, 1997 ; Flamand *et al.*, 1996 ; Gosselin *et al.*, 1999). L'IL-15 ainsi produite induit la cytotoxicité et la production d'IFN γ des cellules NK et limite l'expansion virale. De même, une augmentation de la production d'IL-15 est observée *in vivo* lors de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) (Kakumu *et al.*, 1997). A l'inverse, l'IL-15 participerait au développement d'une pneumonie induite par le virus Influenza A en recrutant des lymphocytes T CD8⁺ au niveau pulmonaire (Nakamura *et al.*, 2010).

Le cas de l'infection par le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) est plus complexe. En effet, l'IL-15 exerce deux fonctions contradictoires : la première active la réplication du virus et la seconde stimule les fonctions immunitaires contre le virus (Fehniger & Caligiuri, 2001). Par exemple, l'IL-15 restaure *in vitro* la fonction cytotoxique et la sécrétion d'IL-12 des cellules NK de patients infectés par le VIH (Chehimi *et al.*, 1997 ; Lin *et al.*, 1998). L'IL-15 peut alors agir en synergie avec l'IL-12 pour assurer la production de diverses chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) et inhiber l'infection *in vitro* (Fehniger *et al.*, 1998). De plus, la production d'IL-15 est déficiente chez les patients infectés par le VIH et l'expression de cette cytokine dans leurs sérums est corrélée avec une meilleure réponse à la thérapie (Amicosante *et al.*, 2003). Les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ seraient responsables de la réponse immunitaire pendant l'infection par le VIH, l'IL-15 augmentant notamment leur cytotoxicité et leur production d'IFN γ (Kottlilil *et al.*, 2003 ; Mueller *et al.*, 2003 ; Strengell *et al.*, 2003).

L'expression de l'IL-15 est augmentée suite aux infections par *Burkholderia pseudomallei*, par le bacille de Calmette-Guérin (BCG) ou par *Mycobacterium tuberculosis* (Doherty *et al.*, 1996 ; Lauw *et al.*, 1999). La surexpression d'IL-15 *in vivo* protège de l'infection par le BCG en augmentant la réponse immunitaire cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T (Umemura *et al.*, 2001). L'IL-15 a également un rôle protecteur contre l'infection par *Toxoplasma gondii* en participant à la survie et à la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ (Bhadra *et al.*, 2010 ; Khan *et al.*, 2002). L'administration d'IL-15 avant une infection par *Plasmodium falciparum* augmente la défense immunitaire de l'hôte par activation de lymphocytes T à TCR $\gamma\delta$ (Elloso *et al.*, 1998). Ces mêmes lymphocytes interviennent dans la protection contre *Salmonella choleraesuis* et *Escherichia coli* (Nishimura *et al.*, 1996 ; Takano *et al.*, 1998). Lors d'une infection par *Listeria monocytogenes*, l'IL-15 produite par les cellules épithéliales intestinales pourrait induire la prolifération et la sécrétion cytokinique des IELs CD8 $\alpha\alpha$ et la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Hirose *et al.*, 1998 ; Yajima *et al.*, 2001). De même, la sécrétion d'IL-15 suite à l'infection de monocytes par *Mycobacterium leprae* induit une réponse cellulaire T locale (Jullien *et al.*, 1997). Enfin, l'IL-15 présente une action anti-microbienne contre *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* (Mody *et al.*, 1998 ; Vazquez *et al.*, 1998).

Pathologies auto-immunes et inflammatoires

L'IL-15 intervient par exemple dans la polyarthrite rhumatoïde. Cette pathologie est une maladie inflammatoire chronique affectant les jonctions osseuses périphériques. Elle est caractérisée par une hyperplasie de la membrane synoviale et par une infiltration de cellules immunitaires au niveau des liquides synoviaux. Ces fluides synoviaux présentent un taux important de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6, mais aussi l'IL-15 (McInnes *et al.*, 1996). La concentration en IL-15 des liquides articulaires serait régulée par des lymphocytes T CD4⁺ et des synoviocytes de type fibroblastique (Harada *et al.*, 1999 ; Klimiuk *et al.*, 1999). L'IL-15 participerait en partie au recrutement et à l'activation des lymphocytes T de la membrane synoviale et à leur sécrétion de TNF α (McInnes *et al.*, 1996 ; McInnes *et al.*, 1997). L'IL-15 augmente également l'expression du CD40L à la surface des lymphocytes T synoviaux qui, en interagissant avec le CD40 membranaire des monocytes, induit la sécrétion de cytokines de type Th1 (Avicé *et al.*, 1998 ; Mottonen *et al.*, 2000). Enfin, l'IL-15 induirait la production d'IL-17 par les PBMC et serait ainsi impliquée dans la résorption osseuse ostéoclastique (Kotake *et al.*, 1999 ; Ziolkowska *et al.*, 2000).

L'IL-15 contribue aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin regroupant la recto-colite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Elles sont caractérisées par des désordres gastro-intestinaux et extra-intestinaux. Les PBMC de patients atteints de RCH ou de formes sévères de MC produisent plus d'IL-15 par rapport aux sujets sains et aux sujets atteints de formes plus modérées de MC (Kirman & Nielsen, 1996). Cette cytokine

serait produite par les macrophages et les cellules épithéliales de la muqueuse rectale (Liu *et al.*, 2000 ; Sakai *et al.*, 1998). Au niveau de la muqueuse, la surexpression d'IL-15 permettrait l'activation de lymphocytes T qui induiraient alors la production d'IL-12 et de TNF α par les monocytes environnants (Liu *et al.*, 2000). De plus, cette surexpression d'IL-15 provoquerait une forte expansion locale de cellules NK-T participant à l'inflammation pathologique (Ohta *et al.*, 2002). L'IL-15 maintiendrait aussi cette inflammation en stimulant la survie des IELs par la voie IL-15R β /JAK3/STAT5/Bcl-xL (Malamut *et al.*, 2010).

L'IL-15 pourrait également jouer un rôle important dans le rejet de greffe allogénique. Ce phénomène inflammatoire met en jeu diverses cytokines participant à l'infiltration et l'activation de cellules immunitaires dans l'organe transplanté. Des taux de transcrits d'IL-15 ont été trouvés augmentés au cours de transplantations rénales, pancréatiques et hépatiques (Baan *et al.*, 1998 ; Ferrari-Lacraz *et al.*, 2002 ; Pavlakis *et al.*, 1996). Les rejets de greffes cardiaques et hépatiques feraient également intervenir des lymphocytes T circulants répondant à l'IL-15 produite par des macrophages CD68⁺ infiltrés dans l'organe transplanté (Baan *et al.*, 1999 ; Baan *et al.*, 2000).

L'expression de l'IL-15 est significativement augmentée dans d'autres pathologies auto-immunes et inflammatoires. Par exemple, des taux accrus d'IL-15 sont retrouvés dans le cas de sarcoïdoses (Agostini *et al.*, 1996 ; Zissel *et al.*, 2000), d'inflammations hépatiques chroniques (Kakumu *et al.*, 1997), de sclérose en plaques (Pashenkov *et al.*, 1999), de maladies auto-immunes de la thyroïde (Ajjan *et al.*, 1997), de lupus érythémateux (Aringer *et al.*, 2001), de diabète de type I (Kuczynski *et al.*, 2005) ou encore de psoriasis (Ruckert *et al.*, 2000).

Cancers

L'IL-15, du fait de sa capacité à recruter et stimuler des cellules NK et NK-T et des lymphocytes cytotoxiques, présente un intérêt en thérapie anti-cancéreuse. Cependant, cette cytokine peut également être impliquée dans le développement de diverses tumeurs, principalement des cancers de type lymphoïde mais aussi différentes tumeurs solides.

L'IL-15 intervient dans la leucémie lymphocytaire T de l'adulte (ATL, "*Adulte T cell Leukemia*"). Cette pathologie est due à l'infection de lymphocytes T par le virus HTLV-1 ("*Human T-Lymphotropic Virus-1*") et elle est caractérisée par une prolifération anormale de ces cellules dépendante d'une boucle autocrine d'IL-2 dans la phase précoce de la maladie puis indépendante de l'IL-2 (Maeda *et al.*, 1987 ; Yodoi *et al.*, 1987). Les lignées lymphocytaires T issues de patients atteints d'ATL expriment la chaîne IL-15R α et prolifèrent en réponse à l'IL-15 (Yamada *et al.*, 1998). De plus, la protéine Tax du virus HTLV-1 présente une activité *trans*-activatrice de la transcription des gènes de l'IL-15 et de l'IL-15R α (Azimi *et al.*, 1998 ; Mariner *et al.*, 2001). Ainsi la prolifération aberrante des lymphocytes T

leucémiques serait induite par une boucle autocrine d'IL-15 lors des phases tardives de la maladie.

La dérégulation des lymphocytes T infectés par le virus HTLV-1 est également impliquée dans la paraparésie spasmodique tropicale (TSP, "*Tropical Spastic Paraparesis*" ou HAM, "*HTLV-1 Associated Myelopathy*"). Cette pathologie neurologique touche les gaines de myéline et présente des caractéristiques cliniques similaires à celles de la sclérose en plaque. La transformation maligne des lymphocytes T infectés entraîne leur prolifération spontanée par des boucles autocrines d'IL-2 et d'IL-15. L'augmentation de la production d'IL-15 est là aussi induite par la fonction *trans*-activatrice de la protéine virale Tax (Azimi *et al.*, 2000). De plus, l'IL-15 présente une activité anti-apoptotique pour les lymphocytes T CD8⁺ infectés (Azimi *et al.*, 2001).

L'IL-15 pourrait aussi jouer un rôle dans le développement de certains mélanomes. L'évolution de ces tumeurs solides cutanées est en liaison avec l'exposition solaire et les rayonnements UV induisant notamment une augmentation de la transcription de l'IL-15 par les kératinocytes (Mohamadzadeh *et al.*, 1995). Les transcrits de l'IL-15 et de l'IL-15R α et la cytokine elle-même ont été détectés dans plusieurs lignées de mélanomes humains (Barzegar *et al.*, 1998 ; Doucet *et al.*, 1997). La protéine IL-15 a été mise en évidence au niveau intracellulaire mais elle n'est pas détectable dans les surnageants de culture de ces lignées, ce qui suggère un mode d'action juxtacrine (Barzegar *et al.*, 1998). L'IL-15 diminuerait l'expression membranaire des molécules HLA de type I, ce qui permettrait l'échappement des tumeurs vis-à-vis du système immunitaire, et induirait le développement *in vivo* de mélanomes plus agressifs (Doucet *et al.*, 1997 ; Gilboa, 1999).

Enfin, le système IL-15/IL-15R interviendrait dans divers autres types de cancers lymphoïdes comme les lymphomes cutanés T, les leucémies à grands lymphocytes à grains, les leucémies lymphocytaires B et les myélomes (Fehniger & Caligiuri, 2001). Mais également dans de nombreuses tumeurs solides : ostéosarcomes, rhabdomyosarcomes, cancers du poumon à petites cellules, carcinomes rénaux, glioblastomes, neuroblastomes, mésothéliomes, ...

Autres pathologies

L'IL-15 interviendrait dans le cadre d'athéroscléroses et d'hypertension. En effet, une surexpression des transcrits de l'IL-15 a été observée dans des lésions athérosclérotiques murines et humaines (Wuttge *et al.*, 2001). L'IL-15 serait produite par les macrophages infiltrés au niveau des plaques d'athérosclérose et recruterait des lymphocytes T (Houtkamp *et al.*, 2001). De plus, l'IL-15 est fortement augmentée dans le sérum de patients atteints

d'hypertension essentielle et la concentration en IL-15 serait corrélée à l'apparition de maladies cardiovasculaires chez ces patients (Kaibe *et al.*, 2005).

L'inflammation stimulerait la production d'IL-15 par les cellules musculaires dans le cadre de pathologies musculaires (polymyosite et dermatomyosite), qui contribuerait à l'immuno-pathogénèse en recrutant et activant les cellules T (Sugiura *et al.*, 2002). A l'inverse, l'administration d'IL-15 protège le muscle de dégénération dans un modèle murin de myopathie de Duchenne (Harcourt *et al.*, 2005). Enfin, plusieurs études récentes ont mis en évidence une diminution de l'IL-15 musculaire avec l'âge et ce phénomène serait à l'origine de sarcopénies (Marzetti *et al.*, 2009 ; Quinn *et al.*, 2010).

3. Le système IL-15/IL-15R en thérapie

Les études thérapeutiques utilisant le système IL-15/IL-15R présentent deux aspects opposés : le premier consiste en l'immuno-stimulation des effecteurs lymphocytaires par administration exogène d'IL-15 ou de complexe IL-15/IL-15R α , le second correspond à la régulation négative du système immunitaire par blocage de l'IL-15 endogène anormalement surexprimée.

Immunothérapie potentielle par l'IL-15

L'IL-15 et l'IL-2 présentent *in vitro* des fonctions biologiques assez similaires cependant elles présentent des fonctions spécifiques parfois très différentes *in vivo*. Les effets de ces deux cytokines ont pu être comparés dans divers modèles pathologiques pour lesquels l'IL-2 présente un intérêt thérapeutique. Ainsi, l'IL-15 est moins toxique que l'IL-2 et plus efficace pour induire l'expansion de cellules NK, le maintien de la réponse lymphocytaire et la survie des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Katsanis *et al.*, 1996 ; Kobayashi *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 1998b). L'IL-15 diminue également la toxicité de certains agents chimiothérapeutiques, en protégeant par exemple des troubles induits par le 5-fluorouracile (Cheever, 2008) ou par l'irinotecan (Cao *et al.*, 1998a ; Cao *et al.*, 1998b). L'IL-15 présente donc des intérêts thérapeutiques chez l'homme en immunothérapies anti-virale, anti-microbienne et anti-cancéreuse.

Par exemple, pour les patients infectés par le VIH, le traitement par de l'IL-15 exogène active les fonctions des neutrophiles, augmente la survie et la fonction des cellules NK, assure l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH et maintient le pool de lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Fehniger & Caligiuri, 2001 ; Mastroianni *et al.*, 2004 ; Mueller *et al.*, 2003 ; Naora & Gougeon, 1999). D'autre part, un vaccin contre l'infection par *Brucella abortus* combiné à l'ADNc de l'IL-15 induit une forte réponse immunitaire dans un modèle

murin, principalement par l'activation de lymphocytes T CD8⁺ (Hu *et al.*, 2010). L'IL-15, utilisée en tant qu'adjuvant d'un vaccin anti-tuberculose, permet également une immunisation sur le long terme par induction de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ producteurs d'IFN γ (Kolibab *et al.*, 2010).

L'IL-15 semble même être un très bon voire le meilleur candidat pour les thérapies anti-cancéreuses (Cheever, 2008). Divers agonistes de l'IL-15 (IL-15 exogène, protéine de fusion IL-15/domaine Fc d'Ig, ADNc de l'IL-15...) ont été testés comme adjuvants de thérapies anti-tumorales.

Ainsi, l'administration d'IL-15 à des souris accroît l'activité anti-tumorale après transplantation syngénique de moelle osseuse, en favorisant la reconstitution et la fonction des cellules NK, NK-T et des lymphocytes T CD8⁺ (Katsanis *et al.*, 1996). Dans un modèle murin, la combinaison d'un vaccin à ADN contre un antigène de mélanome (gp100) avec l'ADN d'une protéine de fusion IL-15/domaine Fc d'une IgG1 murine augmente spécifiquement la réponse lymphocytaire T CD8⁺ et rallonge la survie des animaux (Ferrone *et al.*, 2006). La transfection d'une lignée humaine de cancer du poumon à petites cellules (N592) avec l'ADNc de l'IL-15 réduit significativement la croissance tumorale dans deux modèles murins. La co-transfection de cette lignée avec les gènes de l'IL-15 et de l'IL-12 inhibe cette fois-ci totalement la croissance tumorale dans un modèle de souris déficientes en cellules T, probablement par l'activation de lymphocytes B et l'induction d'une réponse cytotoxique médiée par des anticorps (Orengo *et al.*, 2003). L'administration d'un vecteur associant le gène de l'IL-15 à celui d'un adénovirus recombinant (rAAV2) ralentit également l'apparition tumorale et augmente de manière significative la survie dans un modèle murin de cancer du sein. Ce vecteur agirait par induction de l'expression d'IL-15 sous forme protéique et activation de cellules à fonction tueuse activée par les lymphokines (LAK) (Yu *et al.*, 2010). Enfin, notre équipe a montré qu'une protéine de fusion entre l'IL-15 et sa chaîne réceptrice IL-15R α diminue l'apparition de métastases et augmente la survie de manière dépendante des cellules NK dans un modèle murin de mélanome et réduit les croissances tumorale et métastatique dans un modèle murin de cancer colorectal (Bessard *et al.*, 2009).

D'autre part, de récentes études montrent l'intérêt de l'utilisation d'immunocytokines IL-2, c'est-à-dire l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un antigène tumoral couplés à de l'IL-2, dans le traitement de patients atteints de mélanomes, de neuroblastomes ou de lymphomes non hodgkiniens (Gillies *et al.*, 2005 ; Hank *et al.*, 2009 ; Ribas *et al.*, 2009). La fusion de la cytokine à l'anticorps permettrait une augmentation de l'activité ADCC ("Antibody Dependent Cellular Toxicity") de l'anticorps et favoriserait l'action de la cytokine dans le micro-environnement de la tumeur.

Étant donné les activités biologiques proches de l'IL-2 et de l'IL-15 et le gain d'efficacité de l'IL-15 pour l'expansion de cellules NK par rapport à l'IL-2, les immunocytokines IL-15 pourraient constituer de nouvelles perspectives de thérapies anti-tumorales. Plusieurs études sont d'ailleurs menées actuellement dans notre équipe afin d'évaluer l'efficacité de différentes immunocytokines IL-15.

L'IL-15 pourrait donc être utilisée en tant qu'adjuvant pour les thérapies cellulaires et pour les stratégies vaccinales ayant pour objectif d'augmenter la réponse immunitaire (Alpdogan & van den Brink, 2005).

Immunothérapie potentielle par blocage de l'IL-15

A l'opposé, diverses pathologies inflammatoires et auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, rejet de greffe, ...) et différents cancers (ATL, TSP, ...) présentent une production anormalement élevée d'IL-15. Une diminution de la quantité d'IL-15 circulante pourrait apporter un bénéfice thérapeutique aux patients atteints de ces pathologies.

Aussi, l'administration d'antagonistes de l'IL-15 (IL-15 mutée antagoniste de l'IL-15, sIL-15R α , anticorps anti-IL-15, anticorps anti-IL-15R α , protéine de fusion sIL-15R α /domaine Fc d'Ig) permettrait la modulation de l'activité de cette cytokine *in vivo*.

Par exemple, un antagoniste de l'IL-15 (l'IL-15/Q108D) couplé à un fragment Fc diminue le rejet d'allogreffes de cellules d'îlots pancréatiques et prévient le développement de l'arthrite induite par le collagène dans des modèles murins (Ferrari-Lacraz *et al.*, 2004 ; Ferrari-Lacraz *et al.*, 2001). L'administration de sIL-15R α recombinant diminue également l'arthrite induite par le collagène, retarde le rejet de greffe cardiaque, inhibe la prolifération lymphocytaire B et prévient l'induction d'une inflammation de type allergique au niveau des bronches (Ruchatz *et al.*, 1998 ; Ruckert *et al.*, 2005 ; Smith *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*, 2001). Ce sIL-15R α réduit fortement l'inflammation et la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle d'inflammation intestinale chez des souris immunodéficientes (Obermeier *et al.*, 2006). Enfin, la chaîne IL-15R α soluble bloque l'IL-15 endogène dans des modèles anti-tumoraux et anti-microbiens (Gri *et al.*, 2002 ; Khan *et al.*, 2002). Des anticorps anti-IL-15 ont aussi été efficacement utilisés dans plusieurs modèles de maladies auto-immunes, dont le psoriasis, et dans le cadre de polyarthrite rhumatoïde (Baslund *et al.*, 2005 ; Villadsen *et al.*, 2003).

Le système IL-15/IL-15R, un nouveau bio-marqueur diagnostique ?

En plus de l'utilisation du système IL-15/IL-15R dans le cadre de thérapies par ou contre ce système, l'IL-15 et sa chaîne réceptrice IL-15R α soluble pourraient être utilisées en tant que bio-marqueurs pronostiques de certaines pathologies.

En effet, le dosage de l'IL-15 dans le sérum de patients en phase pré-clinique de polyarthrite rhumatoïde permet de prévoir le délai diagnostique d'une manière dépendante de l'âge (Deane *et al.*, 2010). Les dosages de l'IL-15 et de la chaîne sIL-15R α dans le sérum de patients atteints de la maladie de Crohn permettent également de suivre la réponse au traitement, les patients répondeurs présentant des taux augmentés de sIL-15R α et à l'inverse des taux diminués d'IL-15 (Bouchaud *et al.*, 2010). De même, il a été démontré récemment qu'il existait une forte corrélation entre une concentration importante en IL-15 intra-tumorale et un pronostic clinique défavorable chez des patients atteints de cancers du poumon ou de la tête et du cou (Nguyen *et al.*, 2007 ; Seike *et al.*, 2007). Une forte concentration en sIL-15R α serait aussi corrélée avec un mauvais résultat clinique chez des patients présentant des cancers de la tête et du cou, la chaîne réceptrice soluble agissant dans ce contexte en tant qu'agoniste de l'IL-15 et favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Badoual *et al.*, 2008).

- OBJECTIFS GÉNÉRAUX -

OBJECTIFS GÉNÉRAUX

Ce travail de thèse porte sur l'étude de la biologie de l'IL-15 mais il peut être scindé en trois parties distinctes :

▫ **Optimisation de la production de l'IL-15** : l'IL-15 présente un fort potentiel thérapeutique dans de nombreuses applications, que ce soit pour des thérapies par l'IL-15 ou pour des thérapies par blocage de cette même cytokine. Cependant, la production de cette cytokine est naturellement très contrôlée et les différentes équipes qui ont tenté de produire de l'IL-15 recombinante ont pour la plupart obtenu de faibles taux d'expression. Ainsi, la première partie de ce travail a eu pour objectif de présenter une méthode d'optimisation génétique de la production de l'IL-15 recombinante humaine par mutagenèse dirigée, dans le cadre du système de production baculovirus-cellules d'insecte.

▫ **Étude de l'association IL-15/IL-15R α** : l'IL-15 a pour particularité de lier la chaîne IL-15R α avec une spécificité élevée et une haute affinité. L'objectif de cette deuxième partie a été de caractériser le complexe IL-15/IL-15R α . Pour cela, nous avons tout d'abord étudié la structure de l'IL-15 et plus précisément l'importance des deux ponts disulfures de la cytokine pour sa liaison à l'IL-15R α et au complexe dimérique IL-15R β / γ_c . Nous avons ensuite travaillé à la détermination des configurations d'association de l'IL-15 et de l'IL-15R α à l'aide de protéines de fusion entre la cytokine et sa chaîne réceptrice.

▫ **Cis- et trans-présentation de l'IL-15** : l'originalité de l'IL-15 provient de sa capacité à être à la fois *cis*- et *trans*-présentée pour induire un signal. De nombreuses études travaillent à la détermination du mécanisme d'action majeur de l'IL-15, mais il semble que ces deux modes coexistent selon les contextes biologiques. Dans la troisième partie de ce travail, nous avons comparé les mécanismes de *cis*- et *trans*-présentations de l'IL-15 en termes d'expression des chaînes réceptrices, de propriétés de liaison des cytokines et d'induction des voies de signalisation. Pour cela, nous avons utilisé de faibles doses d'IL-15 pour stimuler les récepteurs IL-15R α / β / γ_c (*cis*-présentation) et la protéine de fusion RLI pour mimer le mécanisme de *trans*-présentation aux récepteurs IL-15R β / γ_c .

- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS -

***RÉSULTATS ET DISCUSSION,
PARTIE I***

PARTIE I : Optimisation de la production de l'IL-15 en système baculovirus-cellules d'insecte et application à la production de deux antagonistes de l'IL-15

A. Introduction

1. Contexte d'étude

L'IL-15 présente un fort potentiel thérapeutique dans de nombreuses applications, que ce soit pour des thérapies par l'IL-15 ou pour des thérapies par blocage de cette même cytokine. Pour pouvoir caractériser l'IL-15 *in vivo* dans différents modèles pathologiques, il est nécessaire de produire cette cytokine de manière reproductible et en quantité et qualité suffisantes.

Cependant la production de l'IL-15 est naturellement très contrôlée et les différentes équipes qui ont tenté de produire de l'IL-15 recombinante ont pour la plupart obtenu de faibles taux d'expression. L'IL-15 humaine a par exemple été produite dans des cellules COS mais avec un faible rendement (Bamford *et al.*, 1998) et dans des levures mais sans précision de taux (Eisenman *et al.*, 2002 ; Grabstein *et al.*, 1994). De l'IL-15 féline a également été produite sans être purifiée dans la lignée cellulaire HEK293 (Dean *et al.*, 2005) et de l'IL-15 de lapin couplée à de la thiorédoxine a été produite dans *E. coli*, mais la plupart des protéines étaient exprimées dans des corps d'inclusion (Xiong *et al.*, 2005). Néanmoins, plusieurs études ont montré que des modifications de la séquence de l'IL-15 permettaient une augmentation de la production de la cytokine en cellules eucaryotes (Bamford *et al.*, 1996 ; Bamford *et al.*, 1998 ; Gaggero *et al.*, 1999 ; Onu *et al.*, 1997) : délétion des codons initiateurs surnuméraires, modification du peptide signal, ajout de séquence en COOH-terminal, ...

Cette étude a pour objectif de présenter une méthode d'optimisation génétique de la production de l'IL-15 recombinante humaine par mutagénèse dirigée, dans le cadre du système de production baculovirus-cellules d'insecte.

2. Méthodes

Afin d'améliorer la production d'une protéine, de nombreux paramètres peuvent être modifiés : en premier lieu les conditions de culture propres à chaque système de production (milieu de culture, température de croissance, temps d'incubation, ...) mais également des caractéristiques propres à la molécule. Divers critères modulent en effet chacune des étapes permettant la traduction d'un gène en une protéine et sa purification :

- la **transcription** : le pourcentage de bases guanines (G) et cytosines (C) stabilisant la structure de l'ADN, la force des promoteurs, les propriétés des introns permettant la bonne réalisation de l'épissage et son couplage au routage des ARNm,

- la **traduction** : la force de la séquence Kozak assurant une bonne reconnaissance des ribosomes, la présence de codons AUG surnuméraires, la nature des codons (la fréquence relative des codons varie selon les systèmes de production), la stabilité de l'ARNm selon la présence de motifs de stabilité en séquence 3' ou 5' non codante (motifs "killers" et motifs de polyadénylation cryptiques),

- le **transport** et la **sécrétion** : les propriétés biochimiques du peptide signal, la présence de glycosylations assurant la stabilité et le routage, la présence de sites sensibles aux protéases,

- et la **purification** : la présence et la position d'une étiquette permettant une purification aisée par utilisation d'anticorps dirigés contre l'étiquette.

La production de l'IL-15 étant fortement régulée aux niveaux de toutes ces étapes, des optimisations génétiques ont été apportées à chacune d'entre elles.

La production des différents mutants de l'IL-15 a été réalisée en système baculovirus-cellules d'insecte Sf9, système d'expression assurant la réalisation de modifications post-traductionnelles proches du système mammifère (clivage du peptide signal, repliement des protéines, glycosylations, sécrétion, ...) (Fernandez *et al.*, 1999).

A ce jour, aucune autre équipe n'a produit d'IL-15 recombinante dans ce système, cette étude présente donc une nouvelle méthode de production de cette cytokine.

3. Caractérisation de deux antagonistes de l'IL-15

Les précédents travaux de notre équipe avaient permis d'identifier les acides aminés de l'IL-15 impliqués dans la liaison de l'IL-15R. Des travaux de mutagenèse dirigée ont montré que les acides aminés L45, E46, V49, S51, L52, L66 et L67 étaient nécessaires à la liaison de la chaîne IL-15R α alors que les résidus E64, N65, I68 et L69 étaient impliqués dans le recrutement de la sous-unité IL-15R β (Bernard *et al.*, 2004) (**Figure 17**).

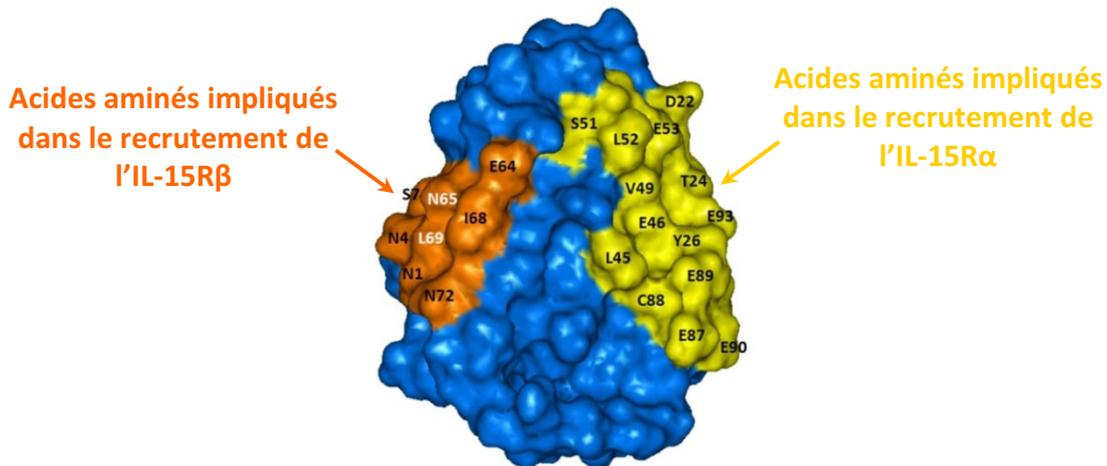


Figure 17 : Identification des acides aminés de l'IL-15 impliqués dans la liaison des chaînes réceptrices IL-15R α et IL-15R β

D'après Bernard et al. (2004) et Agnès Quéméner.

Les protéines correspondantes aux différents mutants de l'IL-15 ont pu être produites par transfection transitoire de cellules 293-EBNA. Malgré des taux de production relativement faibles (10^{-9} M), des études *in vitro* ont pu être réalisées afin de vérifier les propriétés biologiques de ces molécules. Ainsi, les mutants de l'IL-15 présentant les mutations L45D, S51D et L52D ont montré des propriétés de liaison à l'IL-15R α et d'activités biologiques supérieures à l'IL-15 originelle (IL-15 Wild Type ou « IL-15 WT »). Alors que ceux présentant les mutations N65K et L69R ont présenté des propriétés de liaison à l'IL-15R α semblables à l'IL-15 WT mais une inhibition totale de la prolifération dépendante de l'IL-15 de cellules IL-15R α / β / γ_c^+ pour des concentrations équivalentes (Bernard *et al.*, 2004 ; PCT/EP2005/002367). Il semblerait donc que ces deux derniers mutants, en prenant la place de l'IL-15 sur la chaîne réceptrice IL-15R α par compétition, soient incapables d'induire un signal de prolifération.

Les deux mutants IL-15/N65K et IL-15/L69R ont alors été définis comme des antagonistes de l'IL-15. Ils présenteraient un fort intérêt pour les thérapies par blocage de l'IL-15, d'où l'objectif d'augmenter également leurs taux de production.

B. Résultats

1. Présentation de la séquence de l'IL-15

La séquence de l'IL-15 humaine étudiée dans notre équipe provient d'un ADNc issu d'une préparation d'ARNm de macrophages (NM_172174). Certaines modifications avaient été réalisées à partir de cette séquence afin de conserver uniquement la séquence codant la protéine mature et d'améliorer sa production (**Figure 18**) :

- modification de la **séquence Kozak** existante pour une séquence Kozak consensus de la forme ggcggc(A/G)ccAUGG (Kozak, 1987),
- échange du **peptide signal** (PS) endogène de l'IL-15 par celui de la pré-prolactine bovine (PPL) (Marks-Konczalik *et al.*, 2000),
- suppression de la partie **5' non codante** puisque cette séquence est longue, complexe et présente de nombreux codons AUG surnuméraires qui diminuent l'efficacité de la traduction (Bamford *et al.*, 1998),
- ajout, entre le PS et la séquence codante de la cytokine, d'une **étiquette**, l'épitope **FLAG** (DYKDDDDK), et d'un **site de coupure** (IEGR) du **facteur Xa** (protéase coupant après le résidu Arg du site de clivage I(E/D)GR). Cette étiquette très hydrophile favorise le clivage du PS et ainsi la libération de la protéine sous sa forme soluble. Par la suite, elle permet une purification aisée sur colonne d'affinité anti-FLAG. Enfin, cette étiquette FLAG peut être éliminée par clivage au niveau du site Xa.

La séquence de l'IL-15 issue de ces modifications est nommée PS PPL-FXa-IL-15 (avec F pour FLAG) et, d'après les prédictions du logiciel *Swiss-Prot*, elle code une protéine IL-15 recombinante présentant un poids moléculaire de 14,5 kDa (vs 13 kDa pour l'IL-15 naturelle).

Les mutants IL-15/N65K et IL-15/L69R ainsi que toutes les modifications postérieures d'optimisation ont été réalisés à partir de cette même séquence.

Partie I : Optimisation de la production de l'IL-15

Légende :

- Séquence Kozak
- PS PPL
- Etiquette FLAG
- Site de coupure du facteur Xa
- () Protéine IL-15 mature
- Acide aminé muté en K (AAG) pour le mutant IL-15/N65K
- Acide aminé muté en R (CGA) pour le mutant IL-15/L69R

```

1 - ATC GAT GCC GCC ACC ATG GAC AGC AAA GGT TCG TCG CAG AAA GCA GGG TCC CGC CTG CTC - 60
1 -           M  D  S  K  G  S  S  Q  K  A  G  S  R  L  L           - 20

61 - CTG CTG CTG GTG GTG TCA AAT CTA CTC TTG TGC CAG GGT GTG GTC TCC ACC ACG CGA GAC - 120
21 - L  L  L  V  V  S  N  L  L  L  C  Q  G  V  V  S  T  T  R  D           - 40

121 - TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG ATA GAA GGG CGT AAC TGG GTG AAT GTA ATA AGT GAT TTG - 180
41 - Y  K  D  D  D  D  K  I  E  G  R  N  W  V  N  V  I  S  D  L           - 60

181 - AAA AAA ATT GAA GAT CTT ATT CAA TCT ATG CAT ATT GAT GCT ACT TTA TAT ACG GAA AGT - 240
61 - K  K  I  E  D  L  I  Q  S  M  H  I  D  A  T  L  Y  T  E  S           - 80

241 - GAT GTT CAC CCC AGT TGC AAA GTA ACA GCA ATG AAG TGC TTT CTC TTG GAG TTA CAA GTT - 300
81 - D  V  H  P  S  C  K  V  T  A  M  K  C  F  L  L  E  L  Q  V           - 100

301 - ATT TCA CTT GAG TCC GGA GAT GCA AGT ATT CAT GAT ACA GTA GAA AAT CTG ATC ATC CTA - 360
101 - I  S  L  E  S  G  D  A  S  I  H  D  T  V  E  N65 L  I  I  L69           - 120

361 - GCA AAC AAC AGT TTG TCT TCT AAT GGG AAT GTA ACA GAA TCT GGA TGC AAA GAA TGT GAG - 420
121 - A  N  N  S  L  S  S  N  G  N  V  T  E  S  G  C  K  E  C  E           - 140

421 - GAA CTG GAG GAA AAA AAT ATT AAA GAA TTT TTG CAG AGT TTT GTA CAT ATT GTC CAA ATG - 480
141 - E  L  E  E  K  N  I  K  E  F  L  Q  S  F  V  H  I  V  Q  M           - 160

481 - TTC ATC AAC ACT TCT TGA GGA TCC - 504
161 - F  I  N  T  S  * - 180
    
```

D'après le logiciel "translator" de JustBio

Figure 18 : Séquence de PS PPL-FXa-IL-15 et traduction en acides aminés

2. Étapes d'optimisation de la séquence de l'IL-15 par mutagenèse dirigée

Afin de vérifier que l'IL-15 pouvait bien être produite dans le système baculovirus-cellules d'insecte, un premier essai de production de PS PPL-FXa-IL-15 et des deux antagonistes PS PPL-FXa-IL-15/N65K et PS PPL-FXa-IL-15/L69R a été réalisé à Montpellier (Y. Boublik, Plate-forme de production de protéines recombinantes, UMR CNRS 5237). Comme attendu, les trois différentes protéines ont bien été produites mais avec des taux de production relativement faibles (de l'ordre de 10^{-8} - 10^{-9} M).

En effet, même si les modifications déjà apportées aux séquences des trois protéines agissent sur des critères importants (traduction et sécrétion), il est toujours possible d'améliorer leur production (notamment transcription et transport). Ainsi, nous avons débuté l'optimisation génétique de la production de l'IL-15.

Optimisation de la transcription

La partie 3' de la séquence codante de l'IL-15 contient un « stretch » de bases A et T, c'est-à-dire une zone très riche en bases A/T (plus de 10 à la suite), qui pourrait être reconnue comme un site de terminaison précoce de la transcription. De plus, cette zone présente un pourcentage en bases G/C faible (18 %), il s'agit donc d'une région peu stable et propice à la formation de « hairpins » (ou structures en épingles à cheveux) qui ralentissent la transcription (Zuker, 2003) (**Figure 19**).

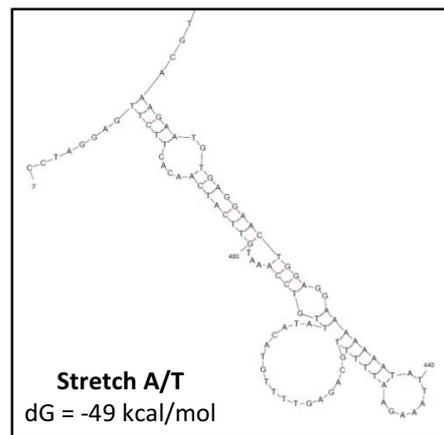


Figure 19 : Formation de hairpins en région 3' de la séquence codante de l'IL-15

D'après le logiciel Mfold sur Bio-Info (Zuker, 2003).

Aussi, pour favoriser la transcription de l'ADN de l'IL-15, 10 bases nucléotidiques ont été mutées par mutagenèse dirigée à l'aide du couple d'oligonucléotides (1) (**Tableau 4**) et remplacées par des bases G/C sans pour autant modifier la séquence protéique en elle-même, à l'aide de la redondance du code génétique. De cette manière le pourcentage en bases G/C a été élevé à 48 %.

Optimisation de la traduction

Le phénomène d'épissage existe bien au niveau du génome du baculovirus (Chisholm & Henner, 1988) et il est donc envisageable d'améliorer la traduction de l'IL-15 en favorisant la formation d'un complexe d'épissage efficace et l'export des ARNm vers les sites de traduction. Pour cela, nous avons choisi d'ajouter un intron présentant des sites d'épissages consensus en amont de la séquence de l'IL-15 : l'intron 2 de la β 1-globine de lapin (nommé ensuite intron de la β -globine) (**Figure 20**).

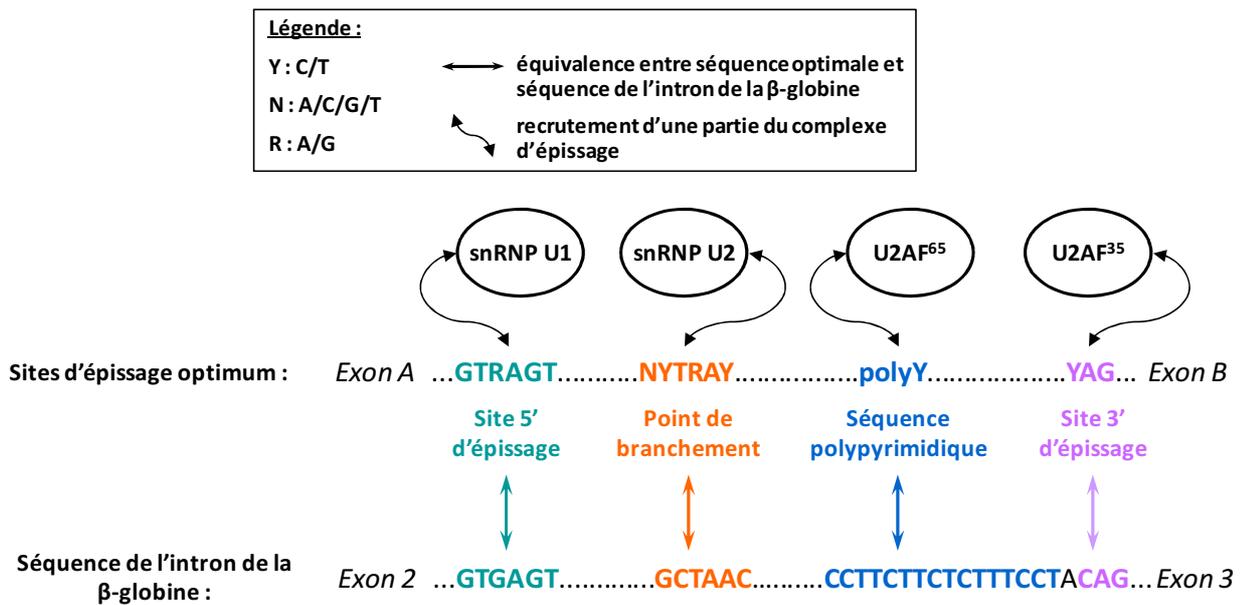


Figure 20 : L'intron de la β-globine présente des sites d'épissage consensus

Avec snRNP : "small nuclear RiboNucleoProtein" et U2AF : "U2 Auxiliary Factor".

Cet intron est utilisé depuis de nombreuses années dans l'expression de protéines recombinantes, et il a notamment été employé dans la construction d'un vecteur d'expression pKCR6 codant pour l'enzyme dihydrofolate réductase methotrexate-résistante (O'Hare *et al.*, 1981).

L'intron de la β-globine a ainsi été amplifié par PCR à partir du vecteur pKCR6 à l'aide du couple d'oligonucléotides (2) (Tableau 4) et sous-cloné entre les sites de restriction *XhoI* et *Clal* juste en amont du site d'initiation de la traduction et du PS PPL.

Nous nous sommes également intéressés aux fréquences d'utilisation de codons entre la séquence de PS PPL-FXa-IL-15 et l'ADN génomique des cellules d'insecte. La comparaison de l'usage des codons a révélé que certains triplets de nucléotides codant des résidus sérines dans la séquence de l'IL-15 étaient surreprésentés (Figure 21). Aussi, trois codons codant des sérines (S73, S75 et S76) ont été modifiés par mutagenèse dirigée à l'aide du couple d'oligonucléotides (3) (Tableau 4) sans altérer la traduction en acides aminés.

Usage des codons de <i>Spodoptera frugiperda</i> (cellules Sf9) :				Usage des codons dans la séquence de PPL-FXa-IL-15 :			
UUU 9.7%	UCU 10.5%	UAU 10.1%	UGU 6.9%	UUU 13.2%	UCU 39.7%	UAU 13.2%	UGU 6.6%
UUC 26.9%	UCC 13.0%	UAC 24.4%	UGC 12.4%	UUC 19.9%	UCC 13.2%	UAC 6.6%	UGC 19.9%
UUA 7.0%	UCA 9.9%	UAA 2.5%	UGA 0.6%	UUA 19.9%	UCA 6.6%	UAA 0.0%	UGA 6.6%
UUG 16.2%	UCG 7.2%	UAG 0.7%	UGG 12.7%	UUG 19.9%	UCG 0.0%	UAG 0.0%	UGG 6.6%
sérines							
CUU 9.9%	CCU 14.3%	CAU 8.7%	CGU 15.9%	CUU 19.9%	CCU 0.0%	CAU 26.5%	CGU 13.2%
CUC 17.0%	CCC 13.7%	CAC 16.2%	CGC 15.1%	CUC 6.6%	CCC 6.6%	CAC 6.6%	CGC 0.0%
CUA 6.8%	CCA 13.4%	CAA 16.2%	CGA 5.3%	CUA 6.6%	CCA 0.0%	CAA 19.9%	CGA 0.0%
CUG 24.5%	CCG 7.7%	CAG 21.8%	CGG 3.6%	CUG 19.9%	CCG 0.0%	CAG 6.6%	CGG 0.0%
sérines							
AUU 15.5%	ACU 13.6%	AAU 12.8%	AGU 8.1%	AUU 46.4%	ACU 13.2%	AAU 26.5%	AGU 33.1%
AUC 28.9%	ACC 17.2%	AAC 27.8%	AGC 10.7%	AUC 26.5%	ACC 0.0%	AAC 33.1%	AGC 13.2%
AUA 7.6%	ACA 11.9%	AAA 26.7%	AGA 11.8%	AUA 13.2%	ACA 19.9%	AAA 26.5%	AGA 0.0%
AUG 27.3%	ACG 8.8%	AAG 53.1%	AGG 13.5%	AUG 26.5%	ACG 13.2%	AAG 33.1%	AGG 0.0%
GUU 14.7%	GCU 26.3%	GAU 21.8%	GGU 22.0%	GUU 19.9%	GCU 13.2%	GAU 59.6%	GGU 0.0%
GUC 20.4%	GCC 21.1%	GAC 32.3%	GGC 19.9%	GUC 6.6%	GCC 6.6%	GAC 19.9%	GGC 0.0%
GUA 12.3%	GCA 12.4%	GAA 27.2%	GGA 18.2%	GUA 39.7%	GCA 19.9%	GAA 46.4%	GGA 19.9%
GUG 24.8%	GCG 12.2%	GAG 34.1%	GGG 4.3%	GUG 13.2%	GCG 33.1%	GAG 39.7%	GGG 13.2%

Avec dans l'ordre : [triplet] [fréquence en %], d'après <http://www.kazusa.or.jp>

Figure 21 : Comparaison de l'usage des codons entre la séquence de PS PPL-FXa-IL-15 et de l'ADN génomique des cellules d'insecte

Optimisation de la sécrétion

Le peptide signal PPL a déjà montré son efficacité dans l'augmentation de la production de l'IL-15 (Marks-Konczalik *et al.*, 2000). Cependant, il s'agit d'un peptide signal de mammifère (origine bovine). On peut donc espérer optimiser cette production en utilisant un peptide signal propre au système de production baculovirus.

La gp64, une glycoprotéine de 64 kDa, est une composante majoritaire de l'enveloppe virale du baculovirus *AcMNPV* et son peptide signal (PS gp64) est couramment utilisé dans la production de protéines recombinantes (Feng *et al.*, 2006 ; Monsma *et al.*, 1996). Aussi, afin de modifier le peptide signal existant par celui de la gp64, nous avons dans un premier temps construit un site de restriction *MluI* entre la séquence du PS PPL et la séquence FXa-IL-15 par PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides (4) (**Tableau 4**). Deux oligonucléotides complémentaires codant le PS gp64 et comportant en leurs extrémités les sites de restriction *Clal* et *MluI* ouverts ont ensuite été hybridés entre eux ($T_h = 76^\circ\text{C}$) et clonés entre les sites *Clal* et *MluI* à la place du PS PPL.

Nous avons également muté l'acide aminé L45 de l'IL-15 par l'acide aminé D45 à l'aide du couple d'oligonucléotides (5) (Tableau 4). En effet, l'IL-15/L45D, préalablement étudié dans l'équipe, avait montré une activité agoniste de l'IL-15 et un taux de production 8 fois supérieur lorsqu'associé à la mutation N65K (Bernard *et al.*, 2004 ; Haffner, 2004).

	Nom	Séquence	Fonction
(1)	Sens stretch AT	CTCCTTGATGTTCTTCTCCTCCAGTTCCT CAC	Modification du stretch de A/T
	Anti-sens stretch AT	TTCCTGCAGAGCTTCGTACATATTGTCC AAATGTTTCATC	
(2)	Sens iglobine <i>XhoI-EcoRI</i>	AATTCCTCGAGGAATTCTGAGAACTTC AGGGTGAG	Extraction de l'intron β -globine du pKCR6
	Anti-sens iglobine <i>Clal</i>	CCATCGATTTTGCCAAAATGATGAGAC AGC	
(3)	Sens Ser	CCTAGCAAACAACAGCTTGTCATCGAA TGGGAATGTAAC	Modification des codons Ser
	Anti-sens Ser	GTTACATTCCCATT CGATGACAAGCTG TTGTTTGCTAGG	
(4)	Sens <i>MluI</i>	CCACCACGCGT GACTACAAGG	Construction du site <i>MluI</i>
	Anti-sens <i>MluI</i>	CCTTGTAGT CA CGCGTGGTGG	
(5)	Sens <i>Clal</i> -PS gp64- <i>MluI</i>	CGAAGCCGCCACCATGGTAAGCGCTAT TGTTTTATATGTGCTTTTGCGGCGGCG GCGCATTCTGCCTTTGCG A	Construction du peptide signal de la gp64
	Anti-sens <i>Clal</i> -PS gp64- <i>MluI</i>	CGCGT CGCAAAGGCAGAA TGCGCCGCC GCCGCCAAAAGCACATATAAAACAAT AGCGCTTACCATGGTGGCGG CTT	
(6)	Sens L45D	CAATGAAGTGCTTTCT CGATGAGTTAC AAGTTATTTC	Mutation L45D
	Anti-sens L45D	GAAATAACTTGTAACT CATCGAGAAAG CACTTCATTG	

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour l'optimisation de la production de l'IL-15

Avec en gras : mutation ponctuelle et en souligné : site de restriction.

3. Bilan des optimisations et comparaison des productions brutes des différents mutants de l'IL-15

Bilan des optimisations

L'ensemble des modifications apportées à la séquence PS PPL-FXa-IL-15 dans l'objectif d'optimiser sa production peuvent être représentées sur le schéma ci-dessous (**Figure 22**).

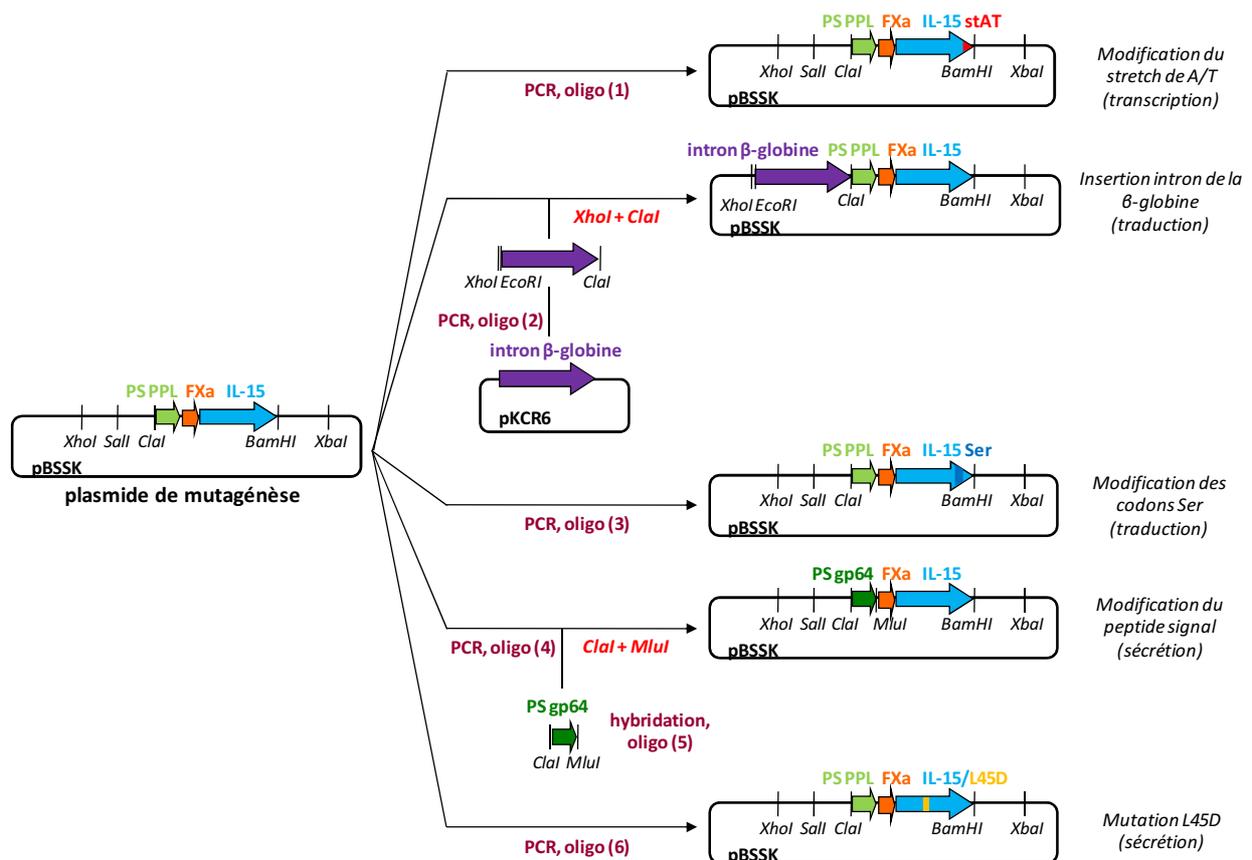


Figure 22 : Schéma bilan des optimisations apportées à la séquence PS PPL-FXa-IL-15
Avec FXa, étiquette FLAG et site de coupure du facteur Xa ; PS, peptide signal.

Production des différents mutants de l'IL-15 et comparaison de leurs concentrations brutes

Toutes les étapes de mutagenèse dirigée ont été effectuées dans un plasmide de mutagenèse (le vecteur pBSSK). Une fois toutes les modifications réalisées, les diverses constructions optimisées de l'IL-15 ont été clonées entre les sites *EcoRI/Sall* et *XbaI* d'un vecteur d'expression (le vecteur pFastBac ou pFB), transposées dans un bacmide et utilisées pour la transfection de cellules d'insecte. Enfin, les cellules ont produit les protéines IL-15 recombinantes dans leur surnageant de culture (cf. Matériels et Méthodes).

Pour pouvoir comparer les taux de production bruts des différents mutants de l'IL-15, les protéines recombinantes ont été produites dans des conditions calibrées :

- **multiplicité d'infection** (MOI) égale à 2,
- **2.10⁶ cellules d'insecte/mL** pour un volume de production total de 50 mL,
- **récolte** après 72 h d'infection.

Les taux de production bruts obtenus pour chacune des protéines sont précisés en **Figure 23**. Ils correspondent à la moyenne de trois productions pour chaque protéine.

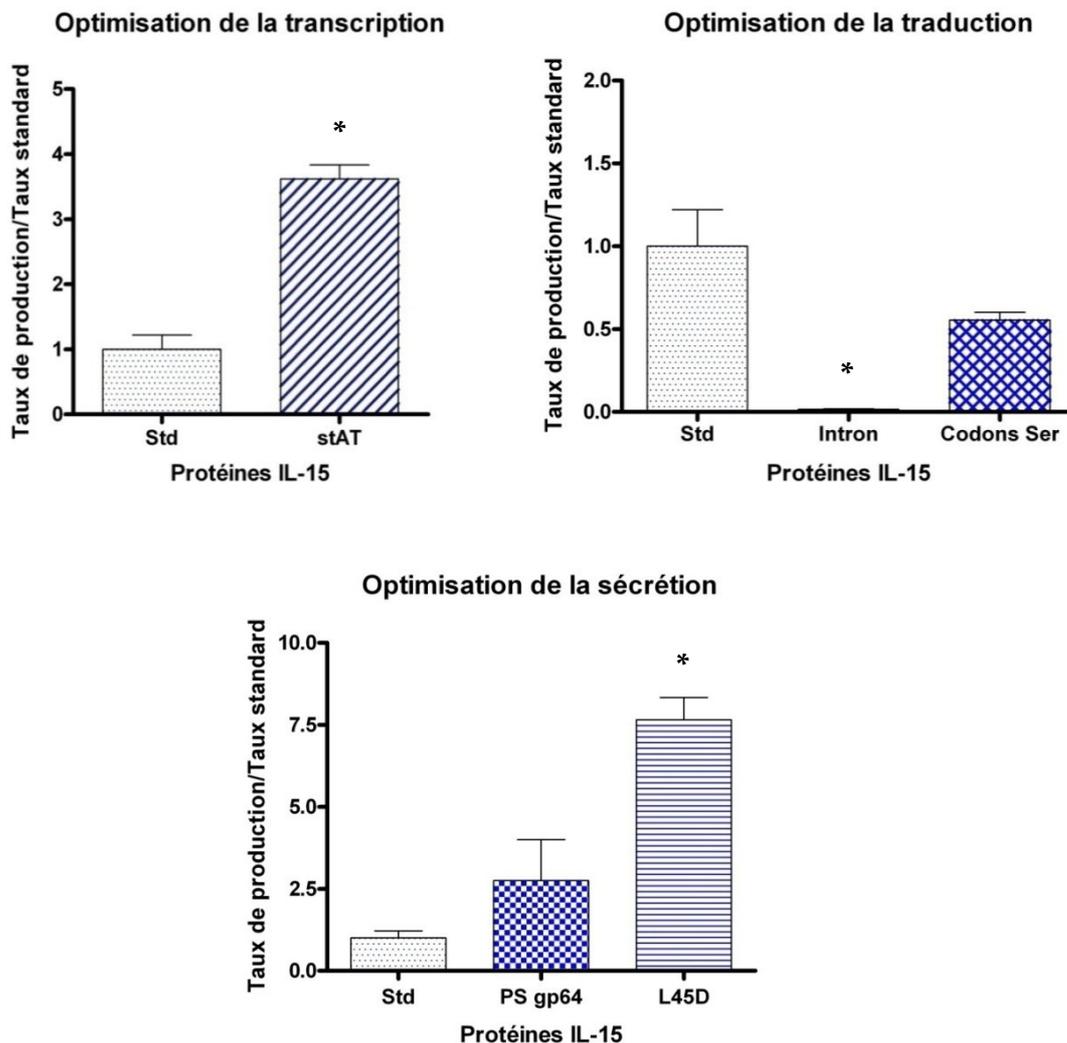


Figure 23 : Taux de production bruts des protéines optimisées par rapport au taux de production de PS PPL-FXa-IL-15 (Std)

*Dosages réalisés par ELISA MAB247 anti-IL-15/M2-HRP anti-FLAG et avec *, p < 0,05.*

Les modifications apportées à la séquence de PS PPL-FXa-IL-15 ont toutes eu une conséquence sur le taux de production brut de la protéine (**Figure 23**). Celles ayant pour but d'optimiser la transcription et la sécrétion de la protéine ont significativement augmenté le taux de production de l'IL-15 entre 2,7 et 7,6 fois. A l'inverse les modifications ayant pour objectif d'améliorer la traduction de l'IL-15 ont eu un effet négatif en diminuant voire en annihilant la production de la cytokine lors de l'insertion de l'intron de la β -globine.

Ces premiers résultats nous ont permis de déterminer les optimisations à conserver pour une production optimale de l'IL-15 dans le système baculovirus-cellules d'insecte.

4. Production optimisée de l'IL-15 et caractérisation de la protéine

Production de l'IL-15 optimisée

A partir des résultats précédents, nous avons choisi de produire une protéine IL-15 combinant les différentes optimisations positives pour son taux de production. La séquence choisie ainsi que les taux de productions bruts obtenus en conditions calibrées sont présentés en **Figure 24**.

La combinaison des trois optimisations PS gp64, mutation L45D et modification du stretch de A/T s'est avérée positive puisque la concentration brute d'IL-15 est passée de moins de 10 nM à plus de 80 nM (**Figure 24B**), soit un facteur d'augmentation de 10,5 par rapport à la séquence PS PPL-FXa-IL-15 (Std). La combinaison des optimisations s'est donc avérée meilleure pour la production d'IL-15 que chacune des optimisations séparément.

D'autre part, on peut remarquer que les optimisations apportées à la séquence de l'IL-15 affectent peu la production de la cytokine en intracellulaire mais surtout sa production dans le surnageant (**Figure 24C**). Ces optimisations favorisent donc très certainement le trafic intracellulaire et/ou la sécrétion de la protéine.

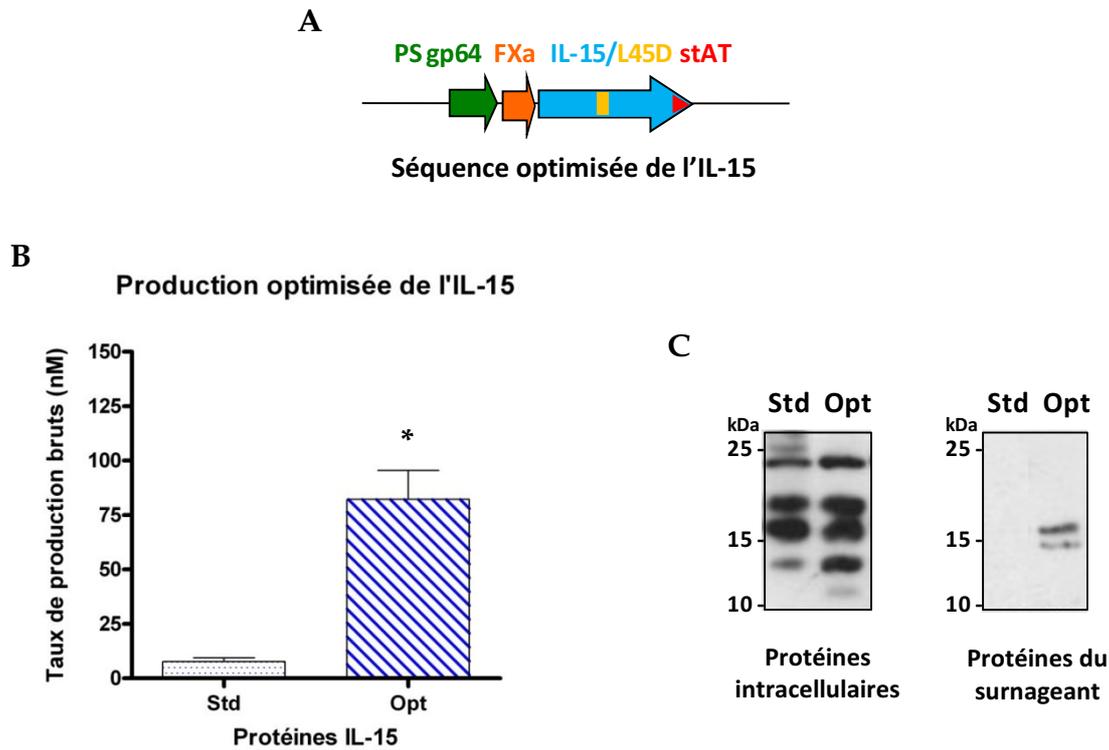


Figure 24 : Séquence optimale de l'IL-15 et production brute en système baculovirus-cellules d'insecte

(A) Représentation schématique de la séquence optimisée de l'IL-15. (B) Taux de productions bruts des protéines IL-15 standard (Std) ou optimisée (Opt). Dosages réalisés par ELISA MAB247 anti-IL-15/M2-HRP anti-FLAG et avec *, $p < 0,05$. (C) Caractérisation des protéines brutes séparées sur gel SDS-PAGE 15 % par Western-Blot M2-HRP anti-FLAG.

Purification de l'IL-15 optimisée et caractérisation de la protéine

Une fois la protéine IL-15 optimisée produite, nous avons procédé à sa purification sur colonne d'affinité M2-agarose anti-FLAG. Le suivi de cette purification ainsi que son rendement, évalué par des dosages ELISA et BCA, sont présentés en **Figure 25**.

Malgré un rendement de purification moyen (38 %), nous avons éliminé la grande majorité des contaminants du surnageant de production et obtenu de l'IL-15 optimisée (Opt.) a une pureté comprise entre 45 % (forme monomérique) et 70 % (formes mono- et multi-mériques) (**Figures 25A et 25C**).

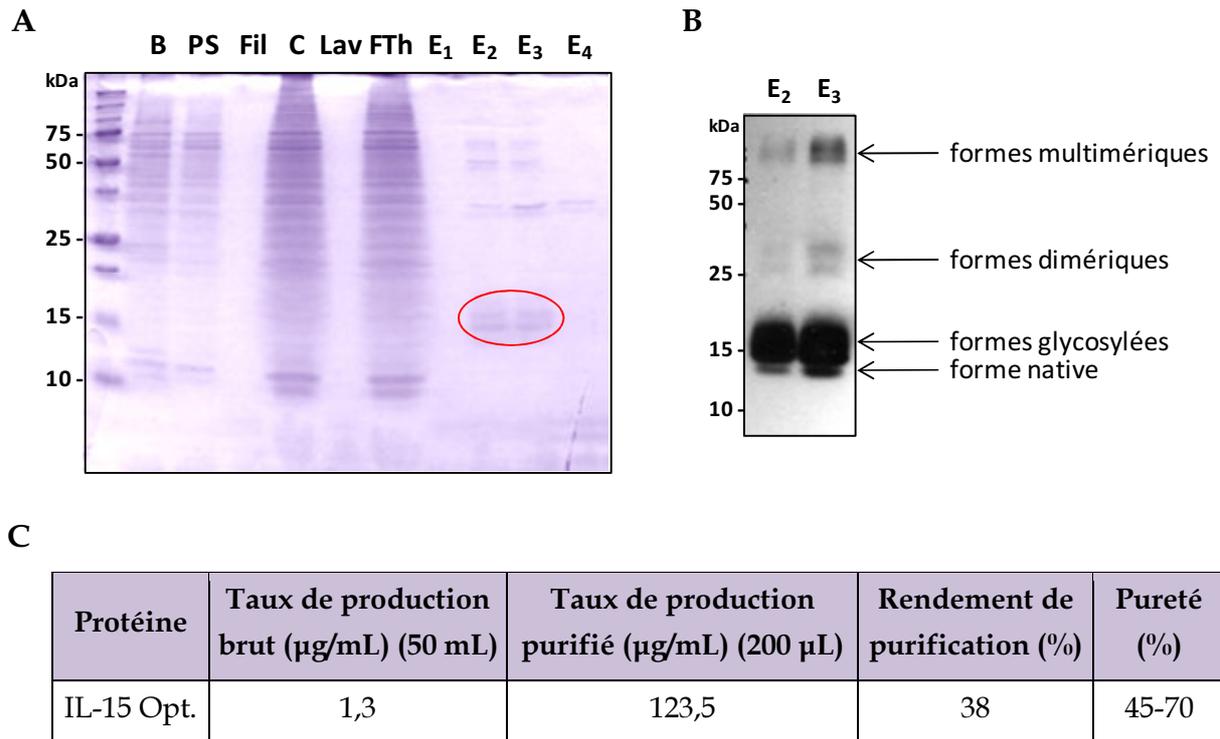


Figure 25 : Suivi de purification de la protéine IL-15 optimisée

(A) Suivi des étapes de purification de l'IL-15 optimisée sur gel SDS-PAGE 15 % coloré au bleu de Coomassie. Avec : B, brut ; PS, fraction post-saponification ; Fil, filtrat ; C, fraction concentrée ; Lav, lavage ; FTh, "Flow-Through" de colonne d'affinité ; E, fractions éluées n°1 à 4. (B) Analyse des fractions éluées n°2 et 3 sur gel SDS-PAGE 15 % puis Western-Blot M2-HRP anti-FLAG. (C) Tableau présentant les chiffres clés de la purification de l'IL-15 optimisée (dosages réalisés par ELISA et BCA).

Comme attendu d'après les prédictions du logiciel *Swiss-Prot*, l'IL-15 optimisée présente, sous sa forme native, un poids moléculaire de 14,5 kDa (**Figure 25B**). Cependant cette protéine semble également être produite sous forme glycosylée et sous forme agrégée (détection de dimères et de multimères d'IL-15 en analyse Western-Blot, **Figure 25B**).

Afin de caractériser plus précisément ces formes non natives d'IL-15, nous avons repris de l'IL-15 optimisée purifiée (fractions éluées n° 2 et 3) dans un tampon de charge non dénaturant (sans SDS ni β -mercaptoéthanol) et nous avons déposé cette protéine sur un gel natif non dénaturant (SDS-) (**Figure 26**). Comparée à l'IL-15 commerciale PeproTech de 13 kDa, produite en *E. coli* et ne présentant donc pas de glycosylations, l'IL-15 optimisée produite en système baculovirus-cellules d'insecte présente trois formes glycosylées qui disparaissent après traitement à la PNGase (Peptide N-Glycosidase) et correspondant probablement aux trois sites potentiels de N-glycosylations de la protéine (N71, N79 et N112) et des formes multimériques.

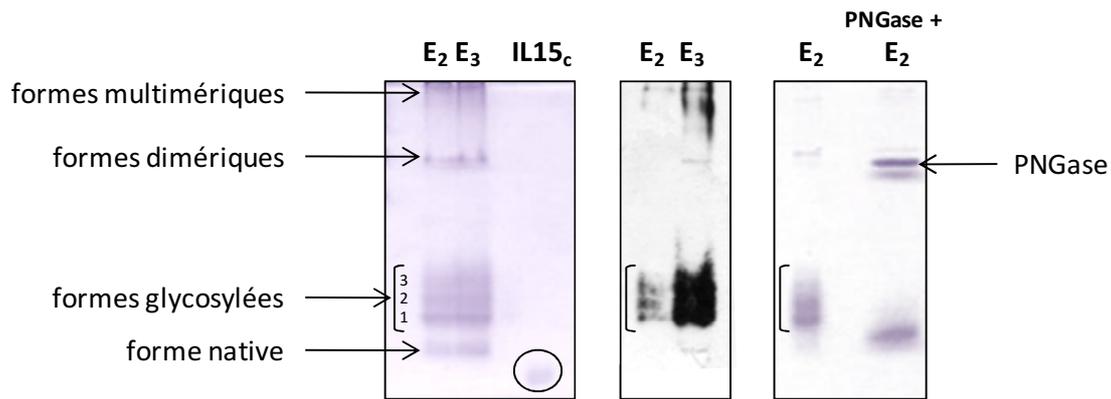


Figure 26 : Caractérisation de l'IL-15 optimisée sur gel natif

Étude de la forme native de l'IL-15 optimisée purifiée par migration de la protéine sur gel natif 15 % puis coloration au bleu de Coomassie (à gauche) ou transfert sur membrane PVDF et analyse Western-Blot M2-HRP anti-FLAG (au milieu). A droite, étude de l'IL-15 optimisée sur gel natif 15 % coloré au bleu de Coomassie après traitement à la PNGase. IL-15_c, IL-15 commerciale PeproTech.

Caractérisation biologique in vitro de l'IL-15 optimisée

Nous avons enfin vérifié que l'IL-15 optimisée ainsi purifiée présentait toujours ses caractéristiques biologiques d'induction de la prolifération de cellules présentant les récepteurs IL-15R α / β / γ _c de haute affinité ou IL-15R β / γ _c d'affinité intermédiaire (**Figure 27**).

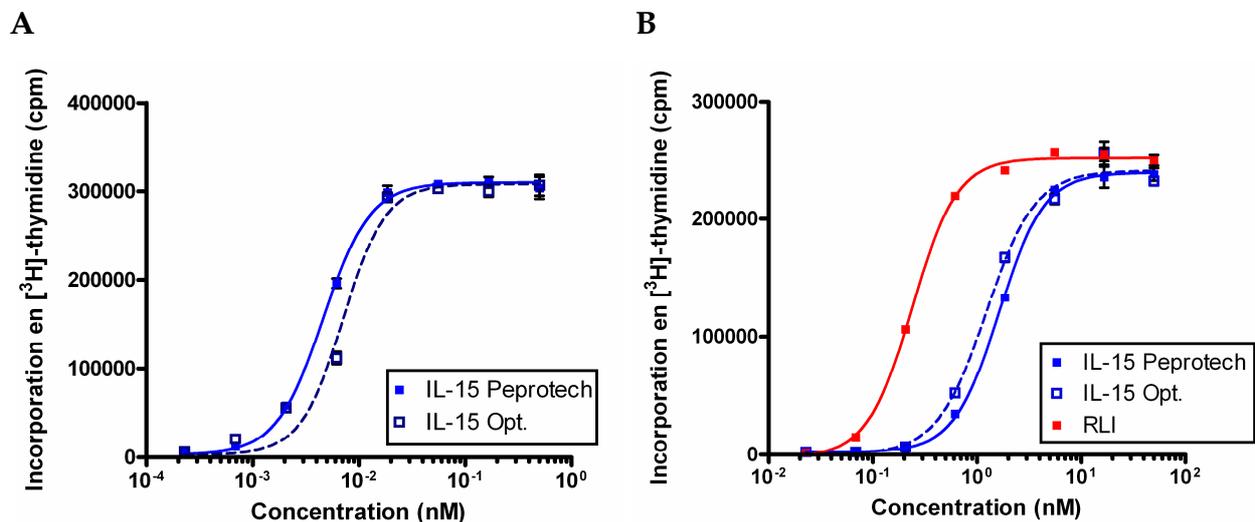


Figure 27 : Comparaison de l'activité proliférative de l'IL-15 commerciale PeproTech et de l'IL-15 optimisée (Opt.) sur différentes lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été incubées avec des concentrations croissantes d'IL-15 commerciale ou optimisée pendant 48 h. L'activité proliférative des cellules a été évaluée par mesure de l'incorporation en [³H]-thymidine. (A) Cellules IL-15R α / β / γ _c⁺ (CTLL-2). (B) Cellules IL-15R β / γ _c⁺ (32D β -IL-15). RLI, protéine de fusion IL-15/IL-15R α super-agoniste de l'IL-15.

Malgré le fait que l'IL-15 optimisée est en partie produite sous forme agrégée, la protéine présente une activité biologique semblable à celle de l'IL-15 commerciale PeproTech avec des EC_{50} de l'ordre du picomolaire sur la lignée CTLL-2 ($EC_{50} \text{ IL-15 PeproTech} = 5 \text{ pM}$; $EC_{50} \text{ IL-15 Opt} = 7 \text{ pM}$), correspondant à l'activation du récepteur trimérique, et avec des EC_{50} de l'ordre de 10^{-9} M sur la lignée 32D β ($EC_{50} \text{ IL-15 PeproTech} = 1,635 \text{ nM}$; $EC_{50} \text{ IL-15 Opt} = 1,230 \text{ nM}$), correspondant à l'activation du récepteur dimérique.

5. Application à la production de deux antagonistes de l'IL-15

Production optimisée des antagonistes IL-15/N65K et IL-15/L69R

Un seul acide aminé étant modifié entre la séquence de l'IL-15 et celle des deux antagonistes, nous avons choisi d'optimiser la production de ces antagonistes en leur apportant les mêmes modifications qu'à l'IL-15. Nous avons donc échangé leur peptide signal par celui de la gp64, muté l'acide aminé L45 en D45 et modifié le stretch de A/T par mutagenèse dirigée, à l'aide des oligonucléotides déjà présentés dans le **Tableau 4**. Les séquences ainsi que les taux de productions bruts obtenus en conditions calibrées pour chacun des antagonistes sont présentés en **Figure 28**.

Concernant l'antagoniste IL-15/N65K, la combinaison des trois optimisations PS gp64, mutation L45D et modification du stretch de A/T s'est avérée positive puisque sa concentration brute a été multipliée par plus de 25 (concentration initiale standard inférieure à 5 nM et optimisée supérieure à 130 nM) (**Figure 28B**). On peut également remarquer que la production de l'IL-15/N65K a été augmentée à la fois en intracellulaire et dans le surnageant (**Figure 28C**). Aussi, pour cette protéine, les optimisations ont probablement permis une optimisation de la transcription (modification du stretch de A/T) et du trafic intracellulaire/de la sécrétion (PS gp64 et mutation L45D) de la cytokine antagoniste.

Par contre, concernant l'antagoniste IL-15/L69R, nous avons tout d'abord rencontré des difficultés à amplifier les virus comportant la séquence de l'IL-15/L69R optimisée et à obtenir des titres viraux suffisants pour une production calibrée à une MOI de 2. Après de nombreuses amplifications virales dans diverses conditions, nous avons réussi à lancer la production de la cytokine antagoniste. Cependant, pour cette protéine, les optimisations apportées n'ont pas permis une augmentation de sa production (concentrations standard et optimisée comprises entre 5 et 10 nM) (**Figure 28B**). L'IL-15/L69R, optimisée ou non, est à peine détectable que ce soit en intracellulaire ou dans le surnageant de production (**Figure 28C**).

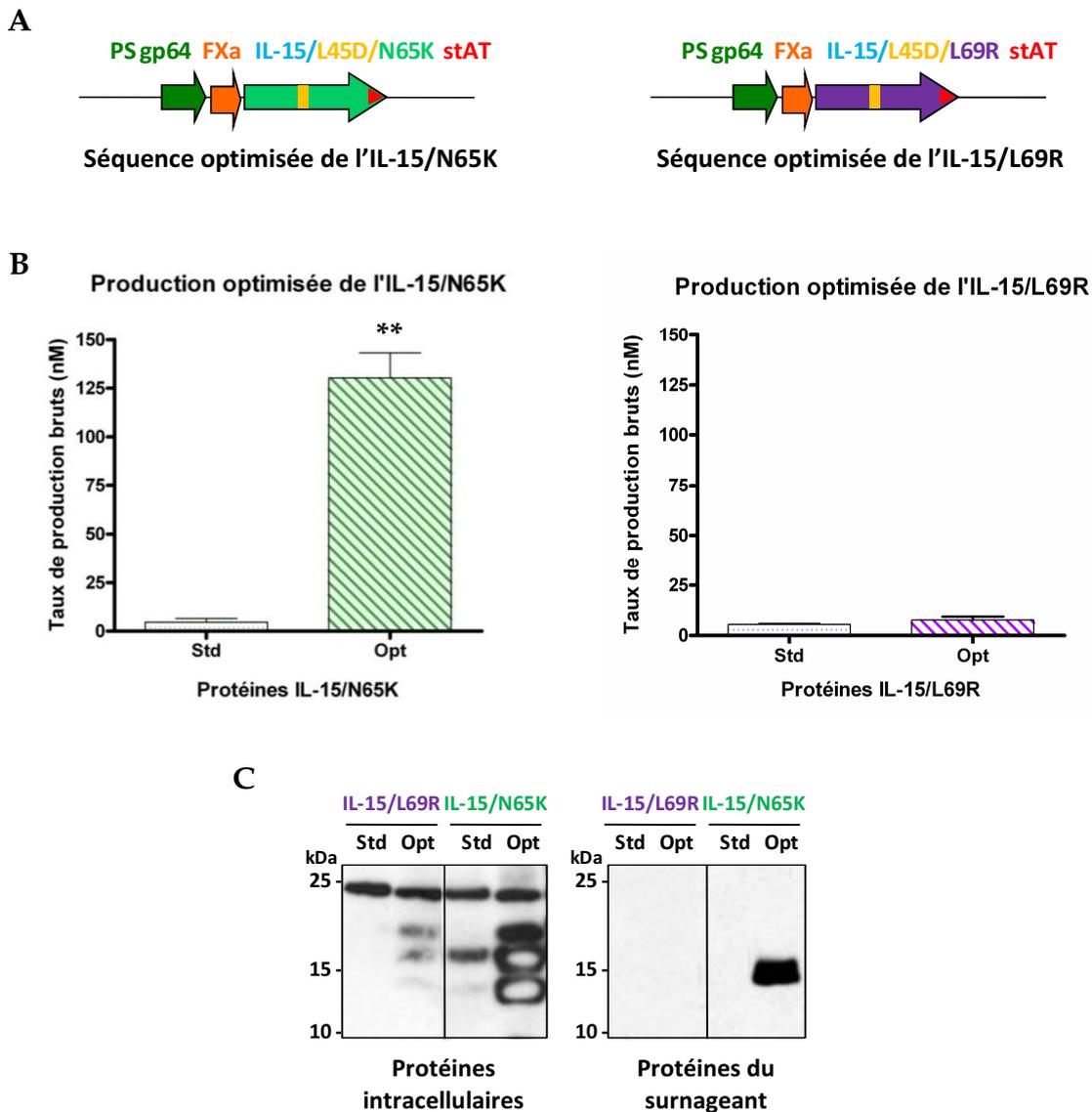


Figure 28 : Séquences optimales des antagonistes IL-15/N65K et IL-15/L69R et productions brutes en système baculovirus-cellules d'insecte

(A) Représentations schématiques des séquences optimisées des antagonistes. (B) Taux de productions brutes des protéines antagonistes standards (Std) ou optimisées (Opt). Dosages réalisés par ELISA MAB247 anti-IL-15/M2-HRP anti-FLAG et avec **, $p < 0,005$. (C) Caractérisation des protéines brutes par Western-Blot M2-HRP anti-FLAG.

L'amplification virale et la production des antagonistes de l'IL-15 en conditions calibrées ont nécessité beaucoup plus de temps que nous pensions, et nous n'avons pas pu procéder à leur purification. Cependant, nous avons tout de même pu vérifier que les protéines recombinantes brutes présentaient une activité biologique.

Caractérisation biologique in vitro des antagonistes optimisés de l'IL-15

Nous avons étudié les capacités des protéines optimisées brutes IL-15/N65K et IL-15/L69R à induire/inhiber la prolifération de cellules présentant les récepteurs IL-15R α / β / γ_c ou IL-15R β / γ_c (**Figure 29**). Nous avons également vérifié que le surnageant de production brut (milieu de culture) ne modifiait pas la prolifération cellulaire dans les mêmes conditions de dilution.

Comme attendu, les antagonistes IL-15/N65K et IL-15/L69R, incapables de transduire un signal via la chaîne réceptrice IL-15R β , n'ont induit aucune prolifération que ce soit sur la lignée CTLL-2 ou la lignée 32D β (**Figures 29A et 29C**). De plus, contrairement à l'IL-15 optimisée, ils ont tous les deux été capables d'inhiber totalement la prolifération de cellules CTLL-2 induite par 10 pM d'IL-15 commerciale PeproTech avec des IC₅₀ de 1,605 nM pour l'IL-15/N65K et de 0,395 nM pour l'IL-15/L69R (**Figure 29B**). Ces valeurs d'IC₅₀ sont assez élevées et elles semblent indiquer que l'antagoniste IL-15/L69R est 4 fois plus efficace que l'antagoniste IL-15/N65K. Cependant, ces résultats seront à confirmer avec des protéines antagonistes purifiées.

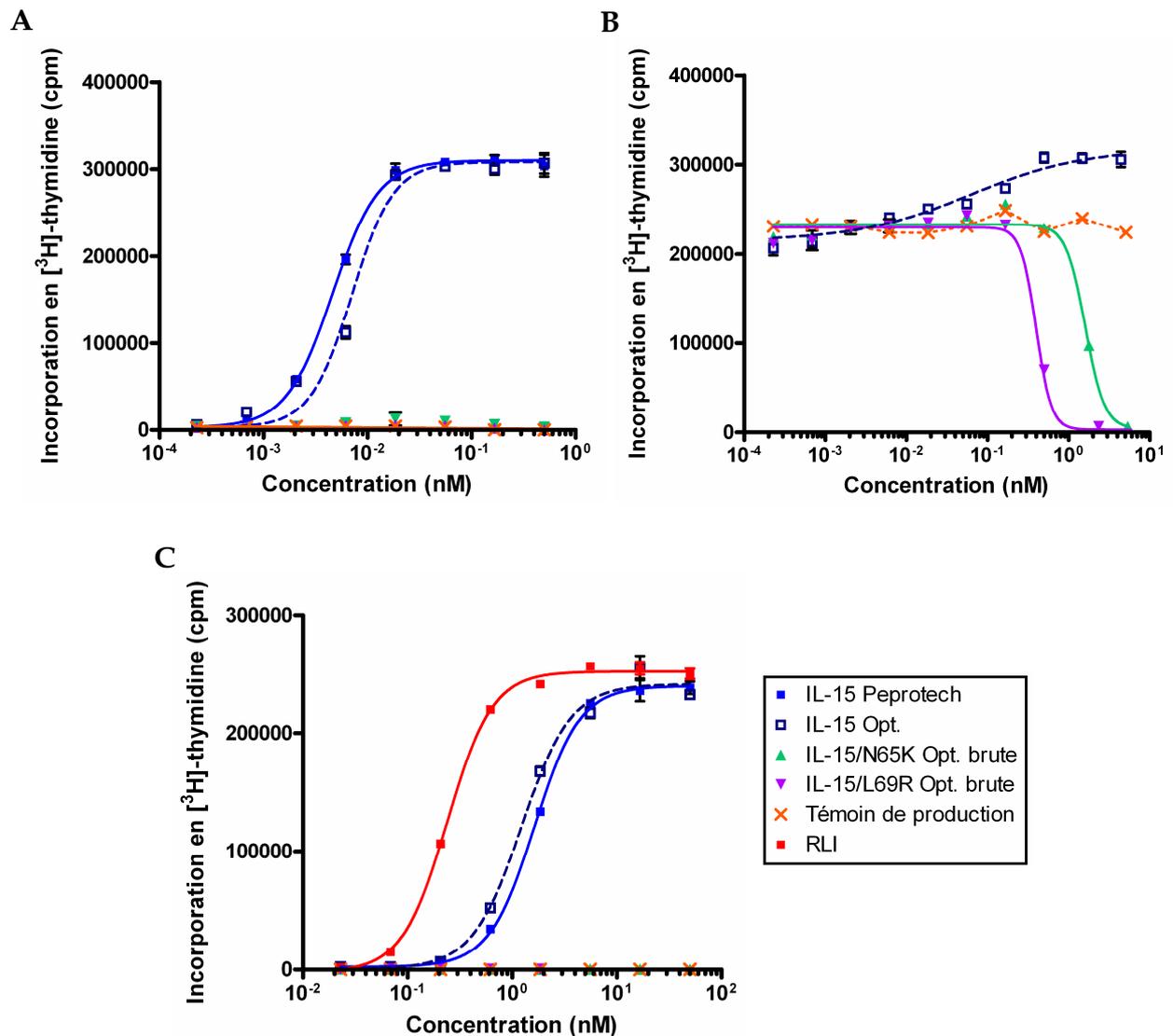


Figure 29 : Etude de l'activité proliférative et antagoniste des protéines IL-15/N65K et IL-15/L69R optimisés (Opt.) sur différentes lignées cellulaires

(A) Les cellules CTLL-2 (IL-15Ra/β/γ_c⁺) ont été incubées avec des concentrations croissantes de cytokines. (B) Les cellules CTLL-2 (IL-15Ra/β/γ_c⁺) ont été incubées avec des concentrations croissantes de cytokines recombinantes, en présence d'une concentration constante de 10 pM d'IL-15 commerciale PeproTech. (C) Les cellules 32Dβ-IL-15 (IL-15Rβ/γ_c⁺) ont été incubées avec des concentrations croissantes de cytokines. RLI, protéine de fusion IL-15/IL-15Ra super-agoniste de l'IL-15. Après 48 h d'incubation, l'activité proliférative des cellules a été évaluée par mesure de l'incorporation en [³H]-thymidine.

C. Conclusions et discussion

La régulation de la production de l'IL-15 est complexe et naturellement régulée aux niveaux de sa transcription, de sa traduction et de son trafic intracellulaire. De nombreuses études ont montré l'intérêt de modifier par exemple le peptide signal, la région 5' non traduite ou la région C-terminale de la séquence de l'IL-15 pour augmenter sa production (Bamford *et al.*, 1996 ; Bamford *et al.*, 1998 ; Onu *et al.*, 1997). Cependant, l'IL-15 serait majoritairement régulée aux étapes post-transcriptionnelles puisque plusieurs équipes ont mis en évidence une discordance entre les quantités en ARNm et en protéines sécrétées (Bamford *et al.*, 1996). Ces multiples points de régulation reflètent les difficultés de production d'IL-15 recombinante, notamment dans les cellules de mammifères.

Dans cette première partie, nous avons décrit une méthode efficace d'optimisation de la production de l'IL-15 humaine adaptée au système de production baculovirus-cellules d'insecte. Nous avons identifié les différentes étapes de mutagenèse dirigée nécessaires à l'amélioration de cette production et nous avons caractérisé la cytokine ainsi produite. Nous avons également appliqué cette méthode d'optimisation à la production de deux antagonistes de l'IL-15.

Nous avons choisi de produire de l'IL-15 recombinante humaine dans le système de production baculovirus-cellules d'insecte. Ce système d'expression est relativement long à mettre en œuvre (5 à 6 semaines sont nécessaires pour obtenir une protéine à partir du vecteur pFastBac) mais il est néanmoins couramment utilisé pour la production de protéines recombinantes actives. Il s'agit d'une méthode sûre (les baculovirus infectent exclusivement les cellules de lépidoptères) avec pour avantages un niveau de production élevé et une machinerie cellulaire assez proche du système des mammifères assurant la réalisation de modifications post-traductionnelles (clivage du peptide signal, repliement des protéines, glycosylations, sécrétion, ...) (Fernandez *et al.*, 1999).

Pour favoriser la production de l'IL-15, nous avons envisagé différentes étapes de mutagenèse dirigée affectant chacun des trois niveaux de régulation. Pour optimiser la transcription de l'IL-15, nous avons muté une succession de bases A/T en séquence 3' codante, région probablement peu stable et favorable à la formation de "hairpins", propices à l'arrêt de l'élongation. Cette modification s'est avérée positive et favorable à la transcription de la cytokine, puisqu'elle a permis une augmentation du taux de production de la protéine de 3,6 fois.

Les optimisations apportées pour tenter d'améliorer la traduction de l'IL-15 (insertion d'un intron présentant des sites d'épissage consensus et modification de codons Ser selon l'usage des codons) ont au contraire diminué la production de la cytokine. En particulier, l'insertion de l'intron de la β -globine en amont de la séquence du peptide signal et de l'IL-15

a significativement inhibé la production de la protéine. L'expression génique des baculovirus présente en effet un mécanisme en cascade dans lequel les produits des gènes plus précoces *trans*-activent les gènes plus tardifs. Dans notre cas, le promoteur polyhédrique présent dans le vecteur d'expression pFastBac correspond à un promoteur de gène tardif. Or, les productions de protéines utilisant l'intron de la β -globine ont été réalisées en présence de promoteurs de gènes très précoces, comme le SV40 (O'Hare *et al.*, 1981). Il est possible que dans le système de production baculovirus-cellules d'insecte, la combinaison d'un promoteur de gène tardif et d'un intron efficace pour des gènes très précoces ait altéré la cascade d'expression génique des baculovirus et par conséquent la production de la cytokine. De plus, à un stade tardif, les cellules d'insecte infectées par les baculovirus grossissent et leurs barrières nucléaires disparaissent avant leur éclatement. L'intérêt d'un intron favorisant le couplage du système d'épissage à celui de l'export des ARNm hors du noyau pourrait être limité à ce stade. Pour la production d'une protéine eucaryote dans un système procaryote, la variation de l'usage des codons est importante et elle doit toujours être prise en compte. Néanmoins, le fait que la modification des codons Ser selon l'usage des codons n'ait pas amélioré l'expression de l'IL-15 est en accord avec les résultats d'autres équipes (Jalah *et al.*, 2007 ; Schneider *et al.*, 1997), suggérant que des modifications plus globales de séquence plutôt que l'utilisation de codons « optimaux » permettent une augmentation des niveaux de production des protéines dans des systèmes d'expression eucaryotes.

La mutation L45D et la modification du peptide signal existant par celui de la gp64, une glycoprotéine de baculovirus, ont été toutes les deux favorables au trafic/à la sécrétion de l'IL-15 en augmentant son taux de production dans le milieu extracellulaire (facteurs 7,6 et 2,7 respectivement). L'acide aminé L45, exposé à la surface de l'IL-15, est impliqué dans l'interface de liaison de l'IL-15R α . Nous avons d'ailleurs montré que la protéine mutante IL-15/L45D présente une affinité supérieure à l'IL-15 non mutée pour sa chaîne réceptrice spécifique (Bernard *et al.*, 2004). Cette mutation pourrait stabiliser la conformation de la cytokine et favoriser ainsi son expression. En effet, la substitution d'un résidu hydrophobe (L45) par un résidu hydrophile accepteur de liaisons hydrogènes (D45) augmenterait partiellement la solubilité de la cytokine, et diminuerait ainsi son agrégation et sa dégradation associée au réticulum endoplasmique (Meusser *et al.*, 2005). Le peptide signal de la gp64 est spécifique au système de production baculovirus-cellules d'insecte et il est probablement le plus efficace pour la production de protéines dans ce système. Ce peptide signal endogène serait reconnu plus efficacement par les cellules d'insecte et permettrait un meilleur routage de la protéine dans la voie sécrétoire et/ou un meilleur clivage du peptide signal à l'excrétion. Nous avons ainsi observé une augmentation du taux de production de l'IL-15 lors du remplacement du peptide signal de la pré-prolactine, déjà très efficace par rapport au peptide signal endogène de la cytokine, par celui de la gp64.

Aussi, nous avons pu identifier les optimisations favorables à la production de l'IL-15 : la mutation du "stretch" de bases A/T, le PS gp64 et la mutation L45D.

Seules des modifications améliorant la transcription et le trafic intracellulaire de la cytokine ont été efficaces. Il est probable que les optimisations déjà présentes dans la séquence de l'IL-15 dont nous sommes partis (PS PPL-FXa-IL-15) favorisaient les étapes de traduction et sécrétion, et qu'elles étaient déjà optimales. En effet, la protéine produite à partir de la séquence PS PPL-FXa-IL-15 présente un taux de production 20 à 30 fois supérieur à l'IL-15 naturelle. Les modifications "stretch" de bases A/T et L45D ont permis à elles-seules, et par une simple étape de mutagenèse dirigée, d'augmenter encore considérablement le taux de production de la cytokine d'un facteur compris entre 3,5 et 8. Ces deux modifications ne sont pas spécifiques au système baculovirus-cellules d'insecte et elles pourraient donc s'appliquer à d'autres systèmes de production et permettre une augmentation de la production de l'IL-15 d'une manière rapide et efficace.

Nous avons combiné les trois modifications favorables à la production de l'IL-15 pour obtenir un taux de production optimum. L'IL-15 optimisée ainsi produite a présenté un taux de production multiplié par 10,5, taux supérieur à ceux obtenus précédemment (concentration brute de 87 nM \equiv 1,3 mg/L). Avec une modification de séquence inférieure à 4 % et une protéine optimisée présentant 99 % d'identité avec la cytokine « originelle », nous avons réussi à produire de l'IL-15 à un taux 200 à 300 fois supérieur à l'IL-15 naturelle. Notre méthode d'optimisation semble donc très efficace en comparaison avec la récente optimisation de l'expression de l'IL-15 humaine par utilisation d'algorithmes informatiques, décrivant une modification de plus de 50 % de la séquence nucléotidique, une identité protéique d'environ 90 % et une augmentation du taux de production de « seulement » 150 fois (Jalah *et al.*, 2007).

L'analyse Western-Blot des productions brutes d'IL-15 en intra- et extra-cellulaire a aussi révélé que la combinaison des trois optimisations favorisait surtout la sécrétion de la cytokine dans le surnageant de culture. Ce résultat confirmerait le fait que l'IL-15 est principalement régulée au niveau des étapes post-transcriptionnelles.

Nous avons ensuite procédé à la purification de cette IL-15 optimisée par une méthode de chromatographie d'affinité. Nous avons obtenu un rendement de purification plutôt moyen (38 %), probablement dû au fait que notre volume de production initial n'était que de 50 mL et que par conséquent la quantité de protéines initiales était faible (environ 65 μ g). Il serait nécessaire de réaliser une production à plus grande échelle (de l'ordre du litre) pour pouvoir évaluer plus spécifiquement ce rendement de purification. Comme attendu, la caractérisation de la protéine purifiée par analyse sur gels SDS-PAGE ou natifs, a révélé que

l'IL-15 optimisée présentait un poids moléculaire de 14,5 kDa et trois formes glycosylées, les cellules d'insecte possédant la machinerie nécessaire à la réalisation de N-glycosylations. Nous avons également constaté que l'IL-15 optimisée était produite à 35 % sous formes di- ou multimériques. Ce résultat confirmerait le fait que l'IL-15 a tendance à s'auto-agréger, comme l'ont suggéré plusieurs équipes ayant mis en évidence des dimères et des trimères d'IL-15 (Khawam *et al.*, 2009 ; Olsen *et al.*, 2007). Dans notre cas, la mutation IL-15/L45D pourrait améliorer la solubilité de la cytokine (IL-15 non optimisée produite à 100 % sous forme agrégée) mais les domaines hydrophobes, encore exposés à la surface de l'IL-15, seraient toujours favorables à l'interaction protéine-protéine. Une étape supplémentaire de chromatographie d'exclusion stérique serait nécessaire pour éliminer les derniers contaminants du milieu de culture et pour pouvoir séparer les formes monomériques d'IL-15 des formes multimériques, le plus souvent immunogènes.

De récents travaux ont montré une production efficace d'IL-15 humaine non optimisée dans le système *E. coli* avec des taux de production bruts très élevés (60 mg/L), soit 45 fois plus que notre taux optimal (Ward *et al.*, 2009). Cependant, les protéines produites en *E. coli* nécessitent de multiples étapes de solubilisation, renaturation, purification... et le rendement de purification final obtenu n'atteignait pas les 2 %. Aussi, nos résultats présentent une méthode simple et efficace pour produire des quantités non négligeables d'IL-15 humaine purifiée.

L'IL-15 optimisée produite en système baculovirus-cellules d'insecte a présenté une activité d'induction de prolifération identique à l'IL-15 commerciale, que ce soit sur des cellules IL-15R α / β / γ_c^+ ou IL-15R β / γ_c^+ . Même si 1/3 de cette protéine est présente sous forme agrégée, il semble que son activité biologique soit peu ou pas affectée. Il se peut également que nous ne puissions pas détecter une variation d'activité biologique liée à 35 % de protéines di- ou multimériques dans nos conditions expérimentales, l'étude de prolifération cellulaire n'étant pas assez sensible. Ce système d'expression permet donc la production de protéines recombinantes immédiatement actives sans étapes de renaturation par exemple. Des études de liaison de l'IL-15 optimisée, par Biacore et inhibition de la liaison à l'équilibre, à la chaîne IL-15R α et au complexe IL-15R β / γ_c devraient être également réalisées pour vérifier que notre cytokine présente bien les mêmes caractéristiques que l'IL-15 commerciale, même si nos résultats de prolifération semblent l'indiquer.

Étant donné que nous avons obtenu de bons résultats concernant l'optimisation de la production de l'IL-15, nous avons appliqué les mêmes optimisations de séquence (mutation du "stretch" de bases A/T, PS gp64 et mutation L45D) aux antagonistes IL-15/N65K et IL-15/L69R. La comparaison des taux de production bruts des deux antagonistes nous a révélé des résultats contradictoires : alors que nous avons réussi à optimiser la production de l'IL-15/N65K de manière très efficace (facteur >25), la concentration brute d'IL-15/L69R n'a pas été augmentée. Ce résultat peut suggérer que les optimisations de séquences affectent différemment ces deux cytokines, même si elles ne diffèrent que de deux acides aminés. Dans ce sens, une récente publication a montré des différences significatives de production entre l'IL-15 humaine et l'IL-15 simienne, alors que les deux protéines présentent 96 % d'homologie (soit 5 aa de différence) (Ward *et al.*, 2009). Néanmoins, nous avons rencontré des difficultés lors de l'amplification des virus présentant la séquence de l'antagoniste IL-15/L69R et il nous avait été difficile d'atteindre des titres viraux suffisants. Pour pouvoir lancer des productions en conditions calibrées (MOI de 2), nous avons dû utiliser un volume maximal de virus (30 % du volume total de production). Il est possible que, dans ces conditions, les cellules d'insecte n'aient pas été dans un « contexte optimum » pour produire la protéine. Une nouvelle production des virus contenant la séquence de l'IL-15/L69R devrait être envisagée afin de vérifier si le taux de production brut obtenu en conditions calibrées et en présence d'un volume de virus non maximal est identique ou non.

Même si nous n'avons pas eu le temps de procéder à la purification des protéines antagonistes optimisées, nous avons vérifié leurs activités d'induction et d'inhibition de la prolifération cellulaire. Les deux protéines IL-15/N65K et IL-15/L69R, incapables de lier la chaîne IL-15R β , n'ont induit aucune activité proliférative des cellules IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c^+$ ou IL-15R β/γ_c^+ . Néanmoins, ces cytokines sont bien actives puisqu'elles ont toutes les deux inhibé totalement la prolifération de cellules IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c^+$ induite par 10 pM d'IL-15 commerciale, même si l'antagoniste IL-15/L69R semble 4 fois plus efficace que l'IL-15/N65K. Les IC₅₀ des deux antagonistes sont cependant très élevées (IC₅₀ IL-15/N65K \approx 1600 pM et IC₅₀ IL-15/L69R \approx 400 pM) par rapport aux IC₅₀ obtenues lors des premiers tests réalisés dans les mêmes conditions avec les protéines non optimisées (IC₅₀ IL-15/N65K et IL-15/L69R \approx 20 pM, non montré, H. Perdreau). Il serait important de savoir si ce résultat est dû au fait que les antagonistes optimisés ne soient pas purifiés (par exemple, leurs dosages ne reposent que sur un ELISA) ou au fait que les optimisations apportées à leurs séquences altèrent leurs caractéristiques biologiques. La purification des deux protéines optimisées devrait donc être réalisée ainsi que la vérification de leurs activités d'induction et d'inhibition de prolifération et de leurs propriétés de liaison à la chaîne IL-15R α et d'absence de liaison au complexe IL-15R β/γ_c .

L'IL-15 est une cytokine complexe et de ce fait hautement régulée. Elle est à la fois impliquée dans le développement de pathologies auto-immunes/inflammatoires et de cancers et dans la défense contre des infections virales ou microbiennes. L'IL-15 présente néanmoins un fort potentiel thérapeutique, elle serait même le meilleur candidat pour les thérapies anti-cancéreuses. Aussi, que ce soit l'IL-15 ou ses antagonistes, l'optimisation de la production de ces cytokines est une étape indispensable à leur validation dans des modèles de pathologies *in vivo* ainsi qu'à leur développement futur en tant que molécules à visée thérapeutique.

*RÉSULTATS ET DISCUSSION,
PARTIE II*

PARTIE II : Étude de l'association IL-15/IL-15R α

Cette deuxième partie peut être subdivisée en deux sous-parties distinctes ayant néanmoins pour objectifs communs de caractériser la liaison de l'IL-15 à sa chaîne réceptrice spécifique IL-15R α et de mieux comprendre la spécificité de l'IL-15 à se fixer à une troisième chaîne réceptrice avec une haute affinité.

La première sous-partie concerne l'étude de la structure de l'IL-15 et plus précisément de l'importance de ses deux ponts disulfures pour sa liaison à l'IL-15R α et au complexe dimérique IL-15R β / γ_c .

La seconde sous-partie a pour objectif d'étudier les différentes configurations d'association de l'IL-15 et de l'IL-15R α à l'aide de protéines de fusion entre la cytokine et sa chaîne réceptrice.

A. Étude des ponts disulfures de l'IL-15

1. Contexte d'étude

L'IL-15 est une cytokine γ_c structurellement très proche des autres cytokines de cette famille. Ces cytokines ont toutes comme caractéristique de se fixer à des chaînes réceptrices transductrices de la famille des récepteurs de classe I et de partager la chaîne γ commune. De manière générale, les cytokines γ_c présentent un récepteur dimérique composé d'une chaîne α et de la chaîne γ_c . Malgré une nomenclature confuse, la chaîne IL-15R β est bien l'analogue des chaînes α des autres cytokines γ_c (Wang *et al.*, 2009). Par exemple, l'IL-15 se fixe à la chaîne IL-15R β et l'IL-4 se fixe à la chaîne IL-4R α . La chaîne α de l'IL-15 fait, elle, référence à une chaîne réceptrice additionnelle ne faisant pas partie de la famille des récepteurs de classe I et n'ayant pas d'équivalent chez les autres cytokines de cette famille (excepté l'IL-2).

Il a récemment été montré que l'organisation structurale des complexes IL-4/IL-4R α / γ_c et IL-2/IL-2R α /IL-15R β / γ_c était quasiment similaire en stœchiométrie 1:1:1, en l'absence de la troisième chaîne IL-2R α (LaPorte *et al.*, 2008). De plus, les complexes quaternaires IL-2/IL-2R et IL-15/IL-15R présentent une structure très semblable (partage d'un même récepteur dimérique et présence d'une troisième chaîne réceptrice de la même famille des récepteurs à domaine « sushi ») (Chirifu *et al.*, 2007). Aussi, nous avons supposé que l'organisation tridimensionnelle des complexes IL-4/IL-4R α / γ_c et IL-15/IL-15R α /IL-15R β / γ_c était également identique.

Afin de comprendre pourquoi l'IL-15, à l'opposé de l'IL-4, nécessite une troisième chaîne réceptrice pour former un récepteur de haute affinité, nous avons remplacé l'IL-15 par l'IL-4 par superimposition sur la base des quatre hélices dans le complexe récepteur trimérique de l'IL-15 (**Figure 30**).

A l'aide de cette représentation, nous pouvons remarquer que la conformation plus relâchée de la boucle CD de l'IL-4, en comparaison avec celle de l'IL-15, interpénètre le domaine sushi de l'IL-15R α . Cette conformation rend peu probable la possibilité d'une troisième chaîne réceptrice pour l'IL-4 dans une conformation proche de celle de l'IL-15R α . Cette différence de conformation des boucles CD de l'IL-4 et de l'IL-15 pourrait être due à la position du pont disulfure de l'IL-4 (C46-C99) qui ne se superpose pas à son homologue dans l'IL-15 (C42-C88). La présence d'un deuxième pont disulfure dans l'IL-15 (C35-C85), contraignant encore davantage la boucle CD, pourrait renforcer cet effet.

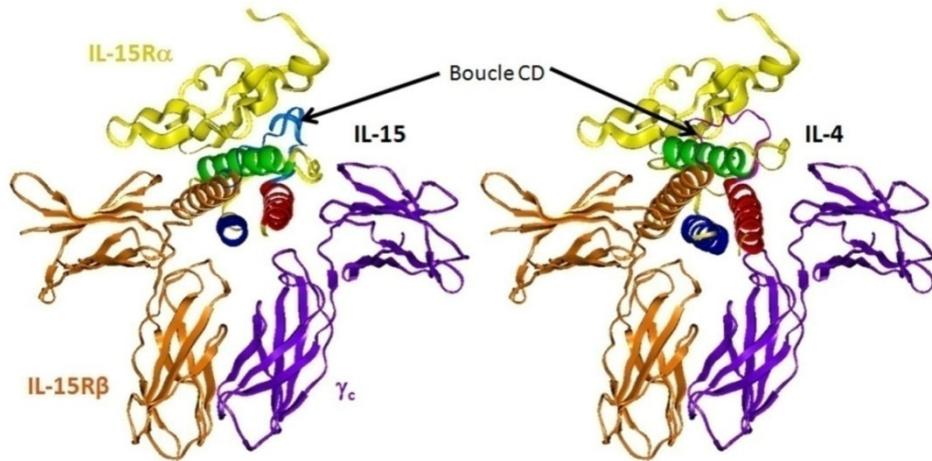


Figure 30 : Modélisation du complexe IL-15/IL-15R α /IL-15R β / γ_c et représentation de l'IL-4 dans ce complexe

D'après Agnès Quémener.

L'observation des représentations structurales des complexes de l'IL-15 et de l'IL-4 nous a permis de constater que l'IL-15, comme l'IL-2 d'ailleurs, présentait trois faces relativement planes correspondant aux interfaces d'interaction avec les trois chaînes réceptrices et lui donnant en coupe une forme particulière de triangle irrégulier (**Figure 31**). Cette forme particulière, en absence de la chaîne IL-15R α , laisserait la possibilité à l'IL-15 de se présenter sous trois orientations différentes à la surface d'interaction du récepteur dimérique IL-15R β / γ_c avant de trouver l'orientation efficace (puits d'affinité). La présence de la chaîne IL-15R α fixée à l'IL-15 limiterait ainsi les possibilités de présentation de la cytokine en privilégiant l'orientation efficace. Cette observation pourrait expliquer les différences d'affinité de l'IL-15 vis-à-vis des récepteurs dimérique ($K_d \sim 10^{-9}$ M) et trimérique ($K_d \sim 10^{-11}$ M). Ceci ne peut être appliqué à l'IL-4, comme aux autres cytokines γ_c , à cause de la conformation de ses boucles AB et CD ne permettant pas cette forme à trois faces (**Figure 31**).

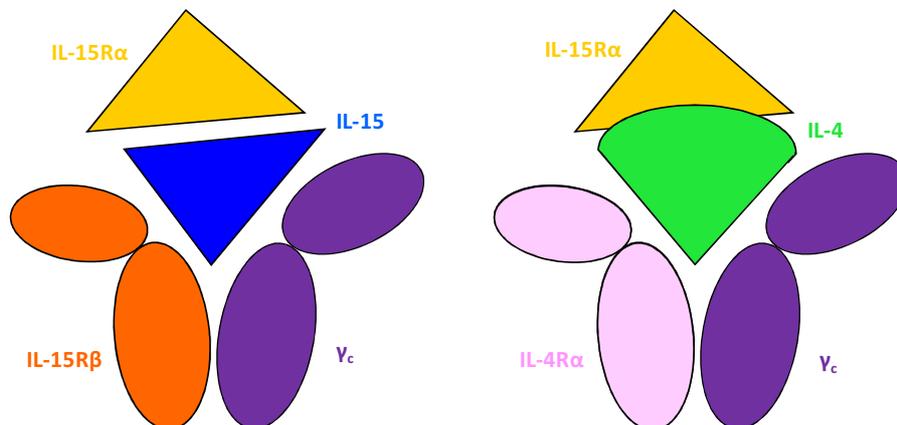


Figure 31 : Schématisation en coupe des complexes IL-15/IL-15R α /IL-15R β / γ_c et IL-4/IL-15R α /IL-4R α / γ_c

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que, tout comme pour l'IL-4, le relâchement de la structure de l'IL-15 au niveau de son interface avec l'IL-15R α conduirait à une cytokine super-agoniste qui n'aurait plus « besoin » de sa chaîne spécifique pour fixer le complexe IL-15R β / γ_c avec une haute affinité. La structure de l'IL-15 comprend deux ponts disulfures impliqués dans la stabilisation de la boucle CD et de l'interface IL-15/IL-15R α . Aussi, pour vérifier cette théorie, nous avons choisi de construire des mutants de l'IL-15 à structure relâchée en supprimant l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures de la cytokine. Nous nous sommes donc intéressés à la construction et à la caractérisation de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure.

2. Résultats

Construction de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure

L'IL-15 présente deux ponts disulfures (S-S) : le premier entre les cystéines 35 et 85, le second entre les cystéines 42 et 88 équivalent à l'unique pont disulfure de l'IL-2 (**Figure 32**). Pour analyser l'effet de chaque pont disulfure, nous avons envisagé la construction de trois mutants de l'IL-15 en modifiant à chaque fois deux acides aminés codant des cystéines par des alanines :

- **Mutant 1** : suppression (Δ) du pont S-S1 (IL-15/C35A/C85A ou IL-15 Δ (S-S1))
- **Mutant 2** : suppression (Δ) du pont S-S2 (IL-15/C42A/C88A ou IL-15 Δ (S-S2))
- **Mutant 3** : suppression (Δ) des deux ponts S-S (IL-15/C35A/C42A/C85A/ C88A ou IL-15 Δ (S-S1/S-S2))

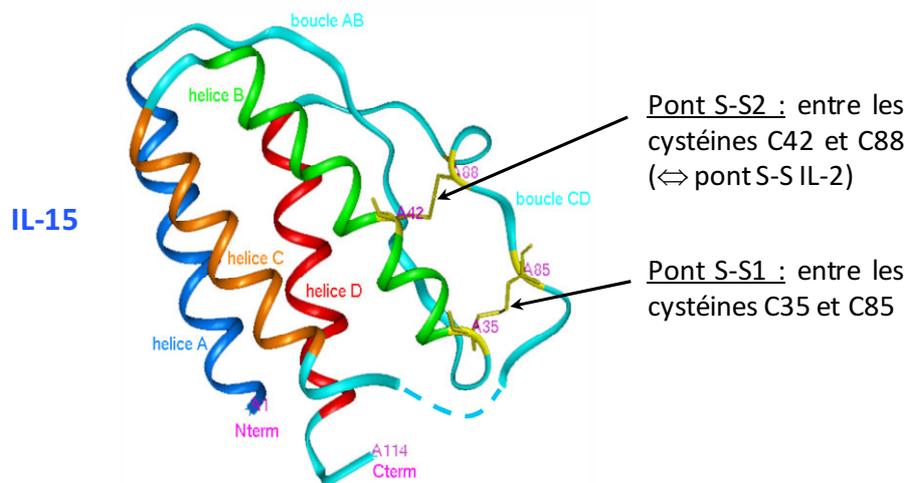


Figure 32 : Représentation en ruban de l'IL-15 et de ses deux ponts disulfures

D'après Chirifu et al. (2007) et Agnès Quéméner.

La suppression de ponts disulfures ayant fort probablement de lourdes conséquences sur la structure de l'IL-15 et sur sa production, nous avons choisi de construire les différents mutants sans ponts disulfures à partir d'une séquence optimisée de l'IL-15 (PS PPL-FXa-IL-15 stAT, cf. Résultats, Partie I) présentant un taux de production augmenté de 3,5 fois (**Figure 23**). Ces trois différents mutants ont donc été produits à partir de cette séquence par mutagenèse dirigée à l'aide des oligonucléotides présentés dans le **Tableau 5**. L'ensemble des étapes nécessaires à leur construction est présenté ci-après (**Figure 33**).

	Nom	Séquence	Fonction
(7)	Sens C35A	GTTCACCCCAGT G CCAAAGTAACAGC	Mutation C35A (TGC>GCC)
	Anti-sens C35A	GCTGTTACTTTGGCACTGGGGTGAAC	
(8)	Sens C42A	CAGCAATGAAGGCCTTTCTCTTGGAG	Mutation C42A (TGC>GCC)
	Anti-sens C42A	CTCCAAGAGAAAGGCCTTCATTGCTG	
(9)	Sens C85A	CAGAATCTGGAGCCAAAGAATGTGAGG	Mutation C85A (TGC>GCC)
	Anti-sens C85A	CCTCACATTCTTTGGCTCCAGATTCTG	
(10)	Sens C88A	GGATGCAAAGAAGCTGAGGAACTGG	Mutation C88A (TGT>GCT)
	Anti-sens C88A	CCAGTTCCTCAGCTTCTTTGCATCC	
(11)	Sens C85A (mutant C88A)	CAGAATCTGGAGCCAAAGAAGCTGAG	Mutation C85A (TGC>GCC) chez le mutant C88A
	Anti-sens C85A (mutant C88A)	CTCAGCTTCTTTGGCTCCAGATTCTG	

Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés pour la construction de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure

Avec en gras : mutation ponctuelle.

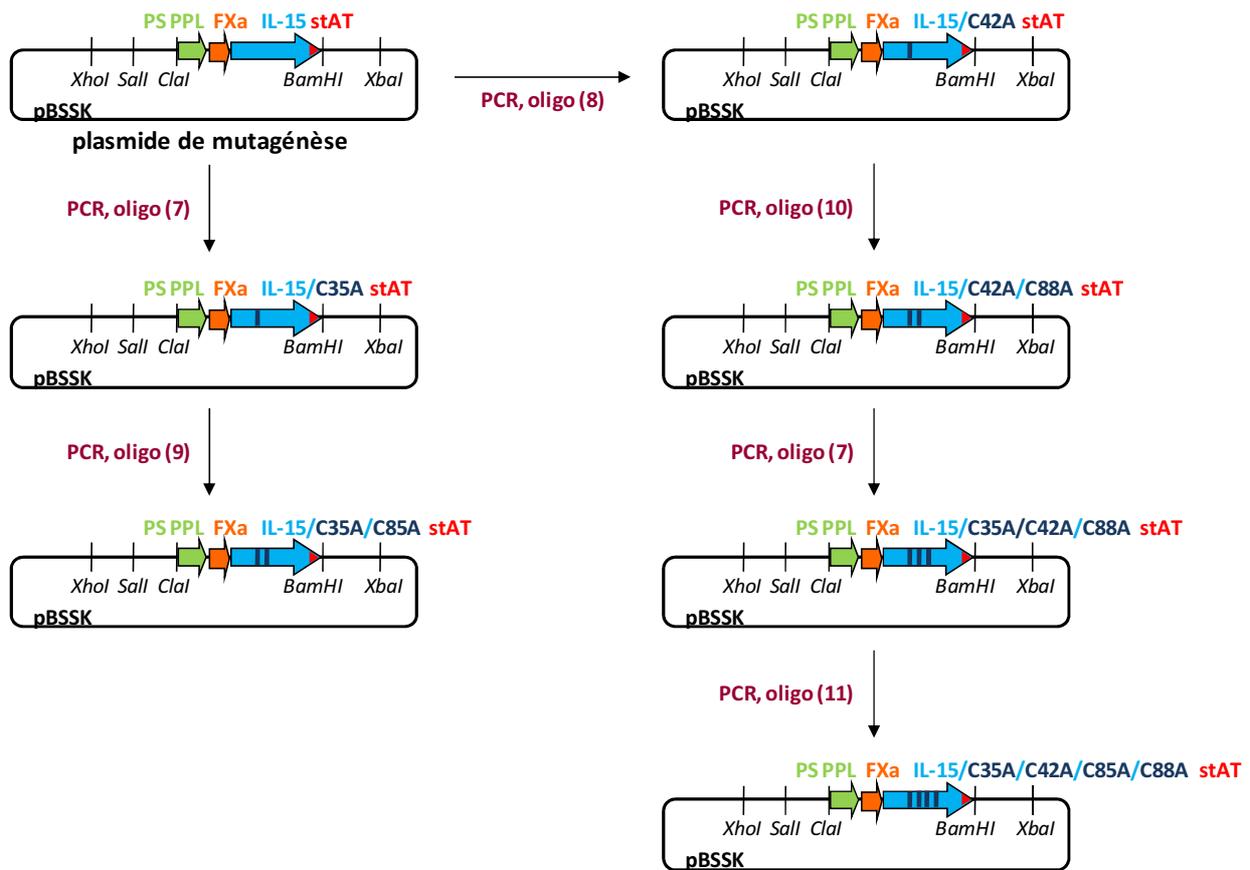


Figure 33 : Schéma bilan des mutations effectuées pour la construction des mutants de l'IL-15 sans pont disulfure

Avec FXa, étiquette FLAG et site de coupure du facteur Xa ; PS, peptide signal.

Production de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure

Dans un premier temps, afin de vérifier que les protéines mutantes sans pont disulfure pouvaient être produites, nous avons choisi de produire ces cytokines par transfection transitoire de cellules 293-EBNA. Pour cela, les différentes constructions présentes dans le vecteur de mutagenèse pBSSK ont été sous clonées entre les sites de restriction *ClaI* et *BamHI* d'un vecteur d'expression pour cellules de mammifères, le vecteur pEF-*neo*, présentant le promoteur humain de l'EF-1 α ("Elongation Factor-1 α ").

Avec ce système de production, nous avons réussi à produire les deux mutants de l'IL-15 ne présentant plus qu'un seul pont disulfure mais avec des taux de production beaucoup plus faible que pour l'IL-15 (Tableau 6). Le taux de production du mutant de l'IL-15 ne présentant plus aucun pont disulfure était, lui, trop faible pour pouvoir être détecté.

Dans un deuxième temps, les taux de production obtenus étant trop faibles pour envisager une caractérisation des protéines produites, nous avons choisi de produire ces trois mutants en système baculovirus-cellules d'insecte. Nous avons sous-clonés les constructions présentes dans le vecteur pBSSK entre les sites de restriction *Sall* et *XbaI* d'un vecteur d'expression pFB. Les constructions ont ensuite été transposées dans un bacmide et utilisées pour la transfection de cellules d'insecte. Enfin, les cellules ont produit les protéines IL-15 recombinantes dans leur surnageant de culture (cf. Résultats, Partie I et Matériels et Méthodes).

Avec ce second système de production, nous avons réussi à produire les mutants ne présentant plus qu'un pont disulfure avec des taux de production relativement faibles mais néanmoins au moins 10 fois supérieurs aux taux obtenus en transfection transitoire (**Tableau 6**). Cependant, nous n'avons toujours pas réussi à produire des concentrations détectables en mutant ne présentant plus aucun pont disulfure.

Protéines	Taux de production bruts (nM)	
	Système cellules 293-EBNA	Système baculovirus-cellules d'insecte
IL-15	2,1	32,3
IL-15Δ(S-S1)	0,8	8,9
IL-15Δ(S-S2)	0,1	2,4
IL-15Δ(S-S1/S-S2)	/	/

Tableau 6 : Taux de productions bruts des protéines IL-15 sans pont disulfure dans différents systèmes de production

Dosages réalisés par ELISA MAB247 anti-IL-15/M2-HRP anti-FLAG. Avec IL-15, protéine issue de la séquence PS PPL-FXa-IL-15 stAT (cf. Résultats, Partie I).

Purification des mutants de l'IL-15 à un pont disulfure et caractérisation des protéines

Malgré des taux de production relativement faibles, nous avons tenté une purification des deux mutants IL-15 Δ (S-S1) et IL-15 Δ (S-S2) sur colonne d'affinité M2-agarose anti-FLAG.

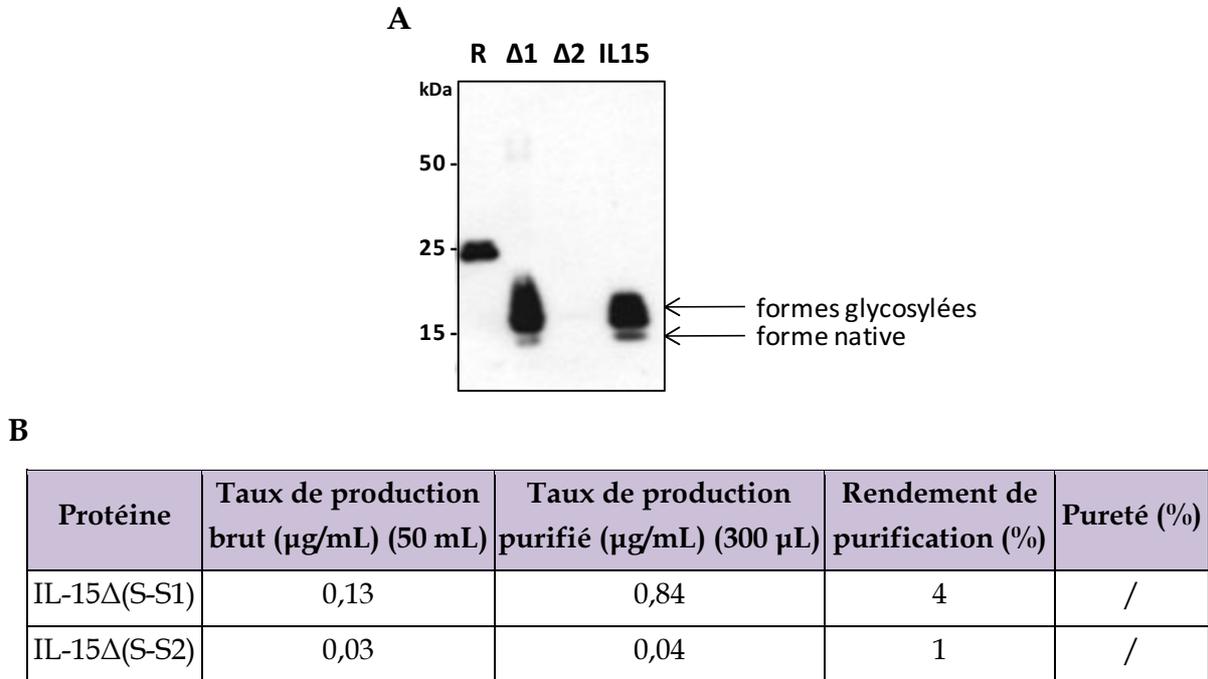


Figure 34 : Purification des mutants de l'IL-15 à un pont disulfure

(A) Caractérisation des protéines purifiées sur gel SDS-PAGE 15 % puis Western-Blot M2-HRP anti-FLAG. Avec : R, protéine de fusion RLI de 25 kDa ; Δ 1, IL-15 Δ (S-S1) ; Δ 2, IL-15 Δ (S-S2) ; IL-15, protéine produite à partir de la séquence PS PPL-FX α -IL-15 stAT (cf. Résultats, Partie I). (B) Tableau présentant les chiffres clés de la purification des protéines sans pont disulfure (dosages réalisés par ELISA).

Comme le montre la **Figure 34**, du fait de la faible concentration initiale des protéines, les rendements de purification obtenus se sont avérés très faibles (< 5 %) (**Figure 34B**). Nous avons également trop peu de protéines pour réaliser un suivi de purification sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, et nous n'avons donc pas pu évaluer la pureté des protéines purifiées. Seule une analyse Western-Blot M2-HRP anti-FLAG a pu être réalisée (**Figure 34A**). Cette analyse nous a permis de détecter la protéine IL-15 Δ (S-S1) et de vérifier que son profil était bien identique à celui de l'IL-15 (formes natives et glycosylées). Par contre, la protéine IL-15 Δ (S-S2) n'était toujours pas détectable dans ces conditions.

Caractérisation biologique in vitro des mutants de l'IL-15 à un pont disulfure

Enfin, nous avons voulu étudier les caractéristiques biologiques des protéines IL-15 Δ (S-S1) et IL-15 Δ (S-S2) purifiées par des études de prolifération cellulaire et d'inhibition de liaison (**Figures 35 et 36**).

Nous avons pu remarquer que le mutant IL-15 Δ (S-S1) était capable d'induire la prolifération de cellules présentant les récepteurs IL-15R α / β / γ_c et/ou IL-15R β / γ_c (**Figure 35**) mais avec une efficacité diminuée par rapport à l'IL-15. Sur la lignée Kit225, l' EC_{50} du mutant était 10 fois supérieure à celle de l'IL-15 commerciale PeproTech ($EC_{50} \text{ IL-15 PeproTech} = 40 \text{ pM}$; $EC_{50} \text{ IL-15}\Delta(S-S1) = 395 \text{ pM}$). Concernant la lignée 32D β , nous pensons également obtenir une valeur d' EC_{50} augmentée par rapport à l'IL-15 mais nous n'avons pas pu déterminer cette valeur du fait de la trop faible concentration en protéine IL-15 Δ (S-S1) purifiée.

Nous n'avons observé aucune induction de prolifération par le mutant IL-15 Δ (S-S2) que ce soit sur des cellules IL-15R α / β / γ_c^+ et/ou IL-15R β / γ_c^+ , même si, du fait de la faible concentration en protéine purifiée, nous n'avons pas pu tester des concentrations supérieures à 2 nM.

Les études d'inhibition de la liaison de l'IL-15 à la chaîne IL-15R α par les mutants à un pont disulfure ont révélé que l'IL-15 Δ (S-S1) était toujours capable de lier la chaîne spécifique de l'IL-15 mais avec une valeur d' IC_{50} assez élevée ($IC_{50} \text{ IL-15}\Delta(S-S1) = 0,630 \text{ nM}$ vs $IC_{50} \text{ IL-15} = 0,050 \text{ nM}$) (**Figure 36**). Nous n'avons pas pu déterminer si le mutant IL-15 Δ (S-S2) était toujours capable de lier l'IL-15R α du fait de sa trop faible concentration.

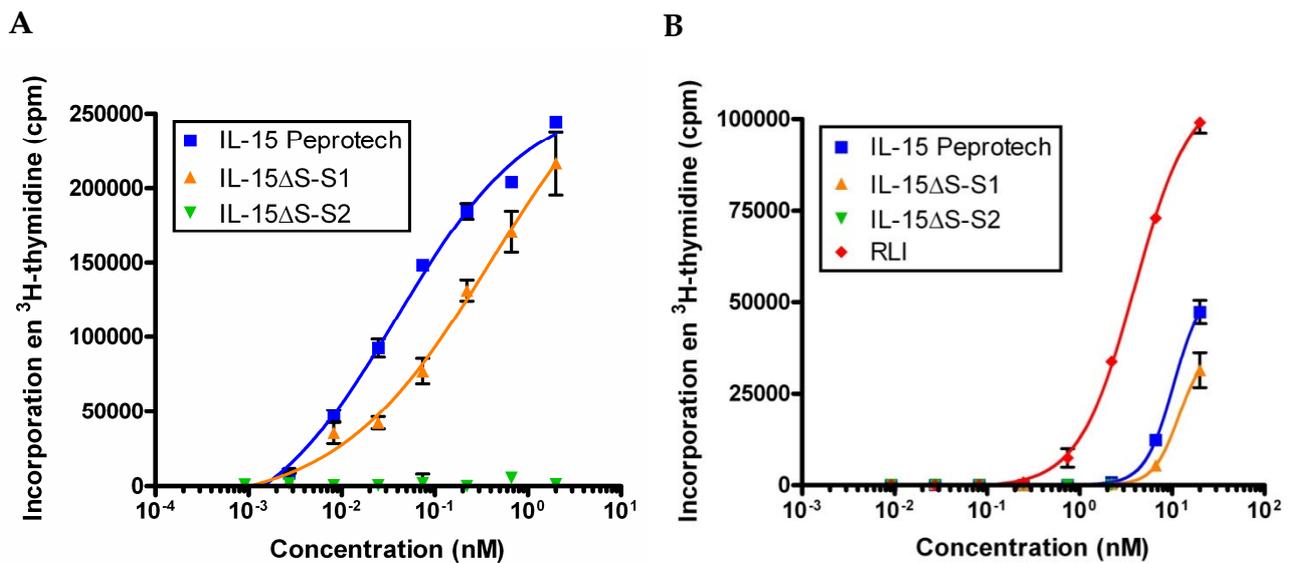


Figure 35 : Comparaison de l'activité proliférative de l'IL-15 commerciale Peprotech et des mutants de l'IL-15 à un pont disulfure sur différentes lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été incubées avec des concentrations croissantes d'IL-15 commerciale ou de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure pendant 48 h. L'activité proliférative des cellules a été évaluée par mesure de l'incorporation en ^3H -thymidine. (A) Cellules IL-15R α / β / γ c $^+$ et IL-15R β / γ c $^+$ (Kit225). (B) Cellules IL-15R β / γ c $^+$ (32D β).

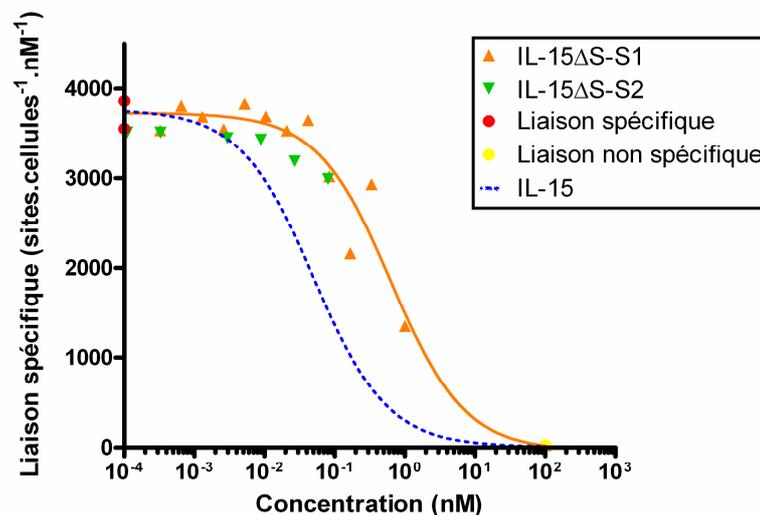


Figure 36 : Comparaison de l'inhibition de la liaison de l'IL-15 sur la chaîne IL-15R α par les mutants de l'IL-15 à un pont disulfure

Les cellules TF1 (IL-15R α $^+$) ont été incubées avec des concentrations croissantes de mutants de l'IL-15 sans pont disulfure et en présence d'une concentration fixe d'IL-15 radiomarquée (300 pM) pendant 1 h à 4°C. Les liaisons spécifiques ont été déterminées par soustraction des liaisons non spécifiques aux liaisons totales.

3. Bilan

Trois mutants de l'IL-15 sans pont disulfure ont été créés par mutagenèse dirigée à partir de la séquence PS PPL-FX α -IL-15 stAT : l'IL-15 Δ (S-S1), l'IL-15 Δ (S-S2) et l'IL-15 Δ (S-S1/S-S2). Les taux de production de ces trois cytokines ont été très faibles en comparaison avec l'IL-15 déjà peu produite, quelque soit le système de production. Nous avons tout de même pu étudier plus précisément les mutants ne possédant plus qu'un seul pont disulfure produits en système baculovirus-cellules d'insecte à des taux bruts de 2-10 nM. Nous avons obtenu de très faibles rendements de purification des protéines IL-15 Δ (S-S1) et IL-15 Δ (S-S2) (< 5%) et nous n'avons pas pu estimer leur pureté. Cependant, nous avons tenté d'évaluer leurs caractéristiques biologiques par des expérimentations de prolifération cellulaire et d'inhibition de liaison. Seul le mutant IL-15 Δ (S-S1) a montré une induction de la prolifération de cellules IL-15R α / β / γ $_c^+$ et IL-15R β / γ $_c^+$, mais avec des EC $_{50}$ significativement plus élevées que pour l'IL-15. Ce mutant a également été capable d'inhiber la liaison de l'IL-15 à la chaîne IL-15R α avec un IC $_{50}$ de l'ordre 0,6 nM (soit 10 fois plus que l'IL-15). Le mutant IL-15 Δ (S-S2), le moins bien produit, n'a montré aucune induction de prolifération aux concentrations testées et nous n'avons pas pu déterminer s'il était toujours capable de lier l'IL-15R α .

B. Étude de protéines de fusion entre l'IL-15 et l'IL-15R α

1. Contexte d'étude

Nous avons montré par modélisation que l'arrimage de l'IL-15 avec le domaine de liaison de sa chaîne spécifique IL-15R α (domaine sushi allongé des 13 premiers acides aminés du domaine 3, nommé sushi⁺ dans la suite de l'étude) est réalisable selon deux configurations qui, d'un point de vue topologique, dérivent l'une de l'autre par orientation opposée d'un partenaire par rapport à l'autre (Quemener *et al.*, 2006) (**Figure 37**). La récente détermination de la structure cristallographique du complexe IL-15/IL-15R α humain (Chirifu *et al.*, 2007) a confirmé l'existence de la configuration que nous avons appelée *solution 2*, topologiquement très proche du complexe IL-2/IL-2R α .

Néanmoins, en réalisant la recherche de solutions d'arrimage avec la structure cristallographique des deux partenaires, la configuration *solution 1* restait plausible d'un point de vue énergétique. Les conditions non physiologiques de cristallisation (expérimentation *in vitro*, concentration forte en protéines, tampon, ...) auraient-elles pu favoriser une solution par rapport à l'autre ? Nous avons donc tenté de montrer l'existence physiologique de cette autre solution.

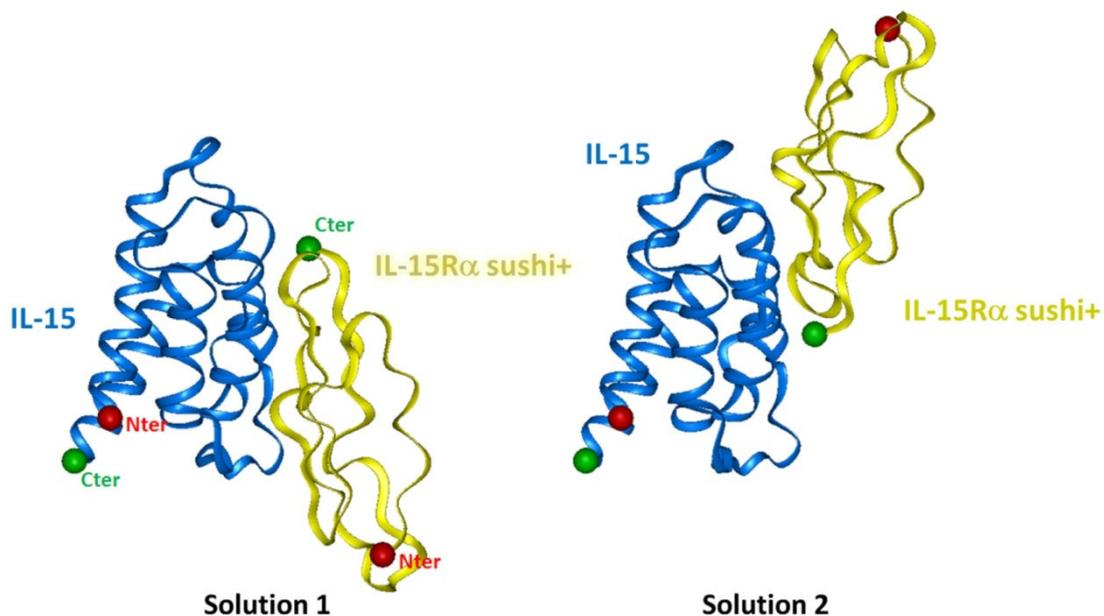


Figure 37 : Modélisation des deux configurations d'arrimage IL-15/IL-15R α

D'après Agnès Queméner.

Afin de vérifier que la *solution 1* pouvait bien exister, nous avons imaginé utiliser des protéines de fusion entre l'IL-15 (**I**) et l'IL-15R α sushi+ (**R**) reliées par un « linker » (**L**) déjà étudiées au laboratoire (Mortier *et al.*, 2006). Deux types de protéines de fusion peuvent être réalisés :

- des **RLI** : C^{ter} IL-15R α sushi+ \leftrightarrow N^{ter} IL-15,
- et des **ILR** : C^{ter} IL-15 \leftrightarrow N^{ter} IL-15R α sushi+.

D'après la modélisation du complexe IL-15/IL-15R α et sa structure cristallographique, nous avons pu déterminer la distance C α -C α entre les extrémités C^{ter} et N^{ter} de l'IL-15 et de l'IL-15R α pour la construction de protéines de fusion RLI ou ILR et nous en avons déduit le nombre minimal d'acides aminés du linker nécessaire à la réalisation du complexe (**Figure 38**).

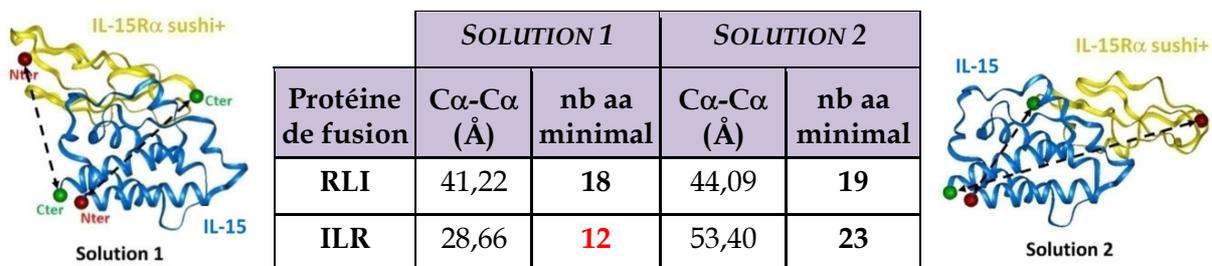


Figure 38 : Détermination du nombre d'acides aminés du linker nécessaire à la réalisation de protéines de fusion IL-15/IL-15R α

D'après Agnès Quémener.

Concernant la protéine de fusion RLI, qu'elle soit en configuration *solution 1* ou *solution 2*, aucune discrimination n'est envisageable (un aa d'écart). Par contre, concernant la protéine de fusion de type ILR, la *solution 1* nécessite seulement 12 aa alors que la *solution 2* nécessite au minimum 23 aa. Il serait donc possible de discriminer les deux conformations en réalisant une protéine ILR à linker < 23 aa obligeant le complexe, s'il se forme, à être dans la configuration *solution 1*.

2. Résultats

Construction de protéines de fusion IL-15/IL-15R α à linker « court »

Les protéines de fusion RLI et ILR déjà créées au laboratoire présentait des « linkers » de 20 et 26 aa respectivement. Nous ne pouvions donc pas discriminer les *solutions 1* et *2* avec ces protéines. Nous avons alors choisi de construire une protéine de fusion ILR à linker plus « court » (linker de 16 aa, SGGSGGGGSGGGGSLQ) à partir de la séquence présente au laboratoire. En parallèle, nous avons également construit un RLI à linker de 16 aa pour savoir si le complexe IL-15/IL-15R α était toujours capable de se former en situation tendue.

La séquence de la protéine de fusion RLI à linker « court » (RL_{XVI}I) a été réalisée par mutagenèse dirigée à partir de la séquence du RLI « originel » (linker de 20 aa) et à l'aide des oligonucléotides présentés dans le **Tableau 7**. La séquence de la protéine de fusion ILR à linker « court » (IL_{XVI}R) a été réalisée à partir d'une séquence présentant uniquement l'IL-15 et la chaîne IL-15R α sushi⁺ et par clonage du linker de 16 aa (préalablement construit par hybridation de deux oligonucléotides à T_h = 77°C) entre les sites de restriction *SpeI* et *PstI*. L'ensemble de ces étapes sont résumées et schématisées ci-après (**Figure 39**).

	Nom	Séquence	Fonction
(12)	Sens RL _{XVI} I	CCACCCAGCGGCGGCTCAGGGGGTGGAGGA AGTGGAGGTGGCGGGTCTCTGCAGAACTGG	Construction d'un RLI présentant un linker de 16 aa
	Anti-sens RL _{XVI} I	CCAGTTCTGCAGAGACCCGCCACCTCCACTT CCTCCACCCCTGAGCCGCGCTGGGTGG	
(13)	Sens IL _{XVI} R	<u>CTAGTAGCGGCGGCTCAGGGGGTGGAGGAA</u> <u>GTGGAGGTGGCGGGTCTCTGCA</u>	Construction d'un linker de 16 aa pour l'ILR
	Anti-sens IL _{XVI} R	<u>GAGACCCGCCACCTCCACTTCCTCCACCC</u> <u>TGAGCCGCGCTA</u>	

Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour la réalisation de protéines de fusion présentant un linker de 16 acides aminés

Avec en gras : linker de 16 aa et en souligné : site de restriction.

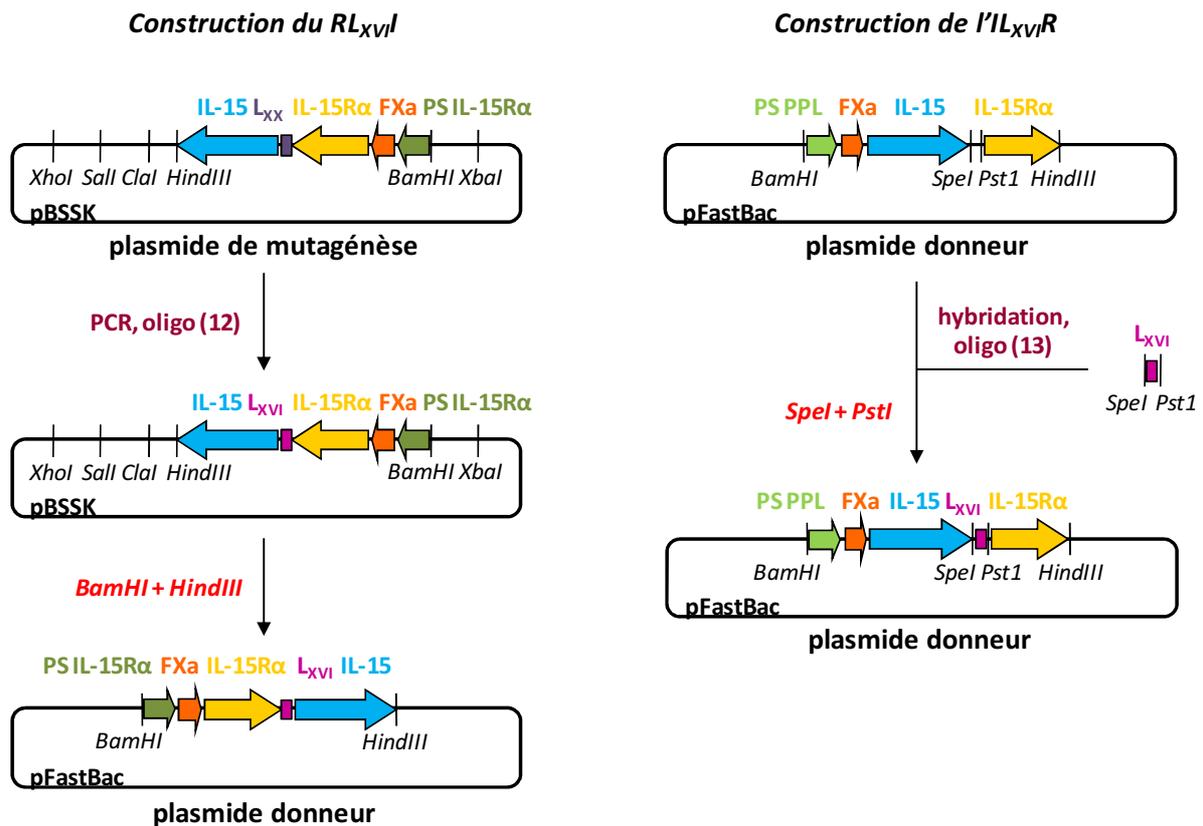


Figure 39 : Schéma bilan des étapes effectuées pour la construction des protéines de fusion à linker « court »

Avec L_{xx} , linker de 20 aa ; L_{xvi} , linker de 16 aa ; IL-15R α , IL-15R α sushi⁺ ; FXa, étiquette FLAG et site de coupure du facteur Xa ; PS, peptide signal.

Production de protéines de fusion IL-15/IL-15R α à linker « court »

Les protéines de fusion RLI et ILR « originelles » étant produites en système baculovirus-cellules d'insecte, nous avons choisi de produire les protéines de fusion à linker « court » dans ce même système de production. Aussi, les constructions des deux protéines de fusion ont été clonées dans le vecteur d'expression pFastBac, puis transformées dans des bactéries compétentes. Après transposition du gène d'intérêt dans un bacmide et purification du bacmide recombinant, les cellules d'insecte ont été transfectées avec ces constructions. Ces cellules ont alors produit les protéines recombinantes dans leur surnageant de culture (cf. Matériels et Méthodes).

D'après les prévisions de poids moléculaire du logiciel *Swiss-Prot*, les protéines de fusion à linker « court » devraient présenter un poids de 24 kDa (vs 24,2 kDa pour le RLI et 24,6 kDa pour l'ILR).

Tout comme les protéines de fusion « originelles », les protéines IL_{XVI}R et RL_{XVI}I présentent de bons taux de production bruts en système baculovirus-cellules d'insecte (Tableau 8).

Protéines	Taux de production bruts (nM)
IL-15	9
IL _{XVI} R	181
RL _{XVI} I	85
ILR [#]	127
RLI [#]	263

Tableau 8 : Taux de productions bruts des protéines de fusion dans le système baculovirus-cellules d'insecte

Dosages réalisés par ELISA MAB247 anti-IL-15/M2-HRP anti-FLAG. Avec IL-15, protéine issue de la séquence PS PPL-FXa-IL-15 et #, protéines produites par Y. Boublik et V. Solé en système baculovirus-cellules d'insecte.

Purification et caractérisation des protéines de fusion à linker « court »

Une fois les protéines IL_{XVI}R et RL_{XVI}I produites, nous avons procédé à leur purification sur colonne d'affinité M2-agarose anti-FLAG. Le suivi de ces purifications ainsi que leurs rendements, évalués par des dosages ELISA et BCA, sont présentés en **Figure 40**.

Comme attendu, les protéines de fusion purifiées présentent un poids moléculaire d'environ 25 kDa. On peut également remarquer que chacune de ces protéines, qu'elles aient ou non un linker « court », présente deux formes : une forme native et une forme glycosylée (**Figures 40A et 40B**).

La protéine de fusion IL_{XVI}R, la mieux produite, a été purifiée avec un très bon rendement (69 %) alors que la protéine de fusion RL_{XVI}I, moins bien produite, a été purifiée avec un rendement très moyen (15 %) (**Figure 40C**). Par contre la méthode de purification a été très efficace pour les deux protéines, puisque leurs puretés ont été évaluées à plus de 92 % pour chacune d'entre elles.

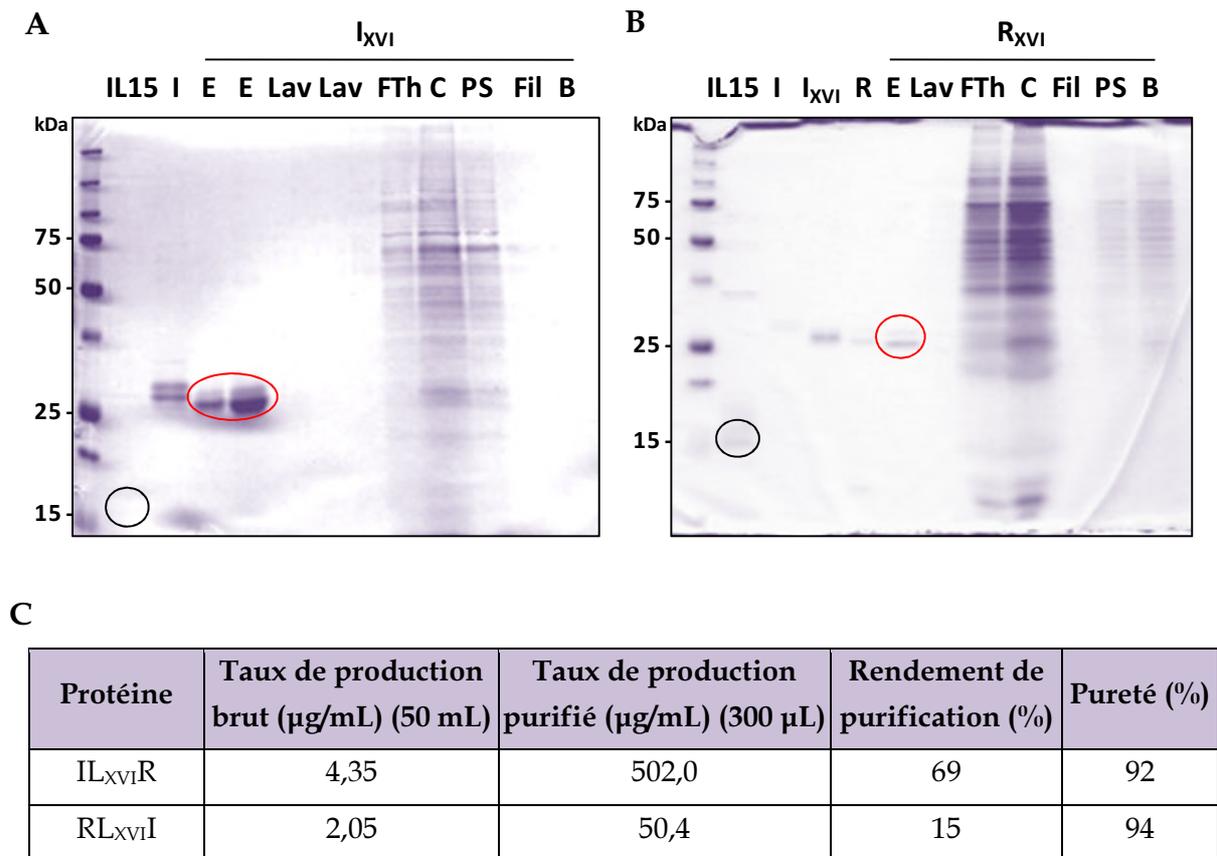


Figure 40 : Suivi de la purification des protéines de fusion

(A) Suivi de purification de l'IL_{XVI}R sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au bleu de Coomassie. (B) Suivi de purification du RL_{XVI}I sur gel SDS-PAGE 15 % coloré au bleu de Coomassie. Avec : IL15, IL-15 optimisée produite en baculovirus-cellules d'insecte et purifiée ; I, ILR ; I_{XVI} , IL_{XVI}R ; R, RLI ; R_{XVI} , RL_{XVI}I ; E, éluat ; Lav, lavage de la colonne ; FTh, "Flow-Through" ; C, fraction concentrée ; PS, fraction post-saponification ; Fil, filtrat ; B, brut. (C) Tableau présentant les chiffres clés de la purification des protéines de fusion (dosages réalisés par ELISA et BCA).

Afin de caractériser les formes natives des protéines de fusion purifiées, nous avons déposé les fractions éluées de ces protéines sur des gels natifs non dénaturant (SDS). Comme le montre la **Figure 41**, les protéines de fusion IL_{XVI}R et RL_{XVI}I présentent les mêmes profils que les protéines purifiées ILR et RLI respectivement : toutes ces protéines sont produites sous formes natives, glycosylées et agrégées (détection de dimères et de multimères). Cependant, il semble que les protéines de fusion de type ILR soient principalement produites sous formes agrégées, comparées aux protéines de fusion de type RLI. En particulier, nous n'avons pas pu détecter de formes monomériques d'IL_{XVI}R dans nos conditions expérimentales.

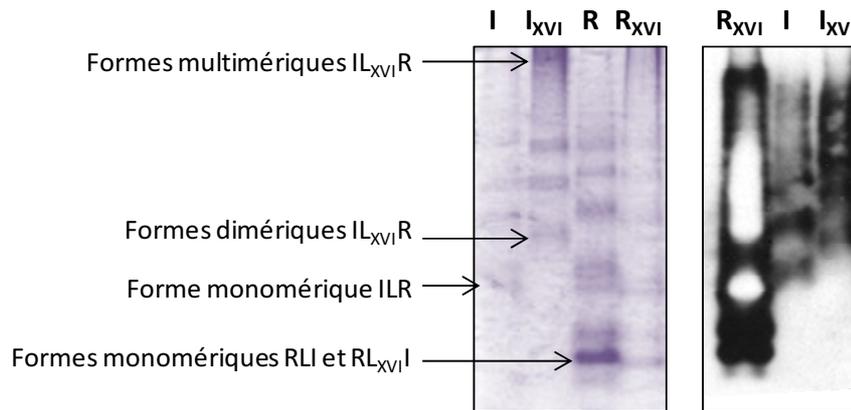


Figure 41 : Caractérisation des formes natives des protéines de fusion

Etudes des formes natives des protéines de fusion purifiées par migration des protéines sur gels natifs 15 % puis coloration au bleu de Coomassie (à gauche) ou transfert sur membrane PVDF et analyse Western-Blot M2-HRP anti-FLAG (à droite). Avec I, ILR ; I_{XVI}, IL_{XVI}R ; R, RLI et R_{XVI}, RL_{XVI}I (les protéines ILR et RLI ont été purifiées par V. Solé selon le même protocole).

Caractérisation biologique in vitro des protéines de fusion à linker « court »

Nous avons enfin comparé les activités prolifératives des protéines de fusion à linker « court » purifiées avec celles de l'ILR et du RLI sur des cellules présentant les récepteurs IL-15R α / β / γ_c de haute affinité et/ou IL-15R β / γ_c d'affinité intermédiaire.

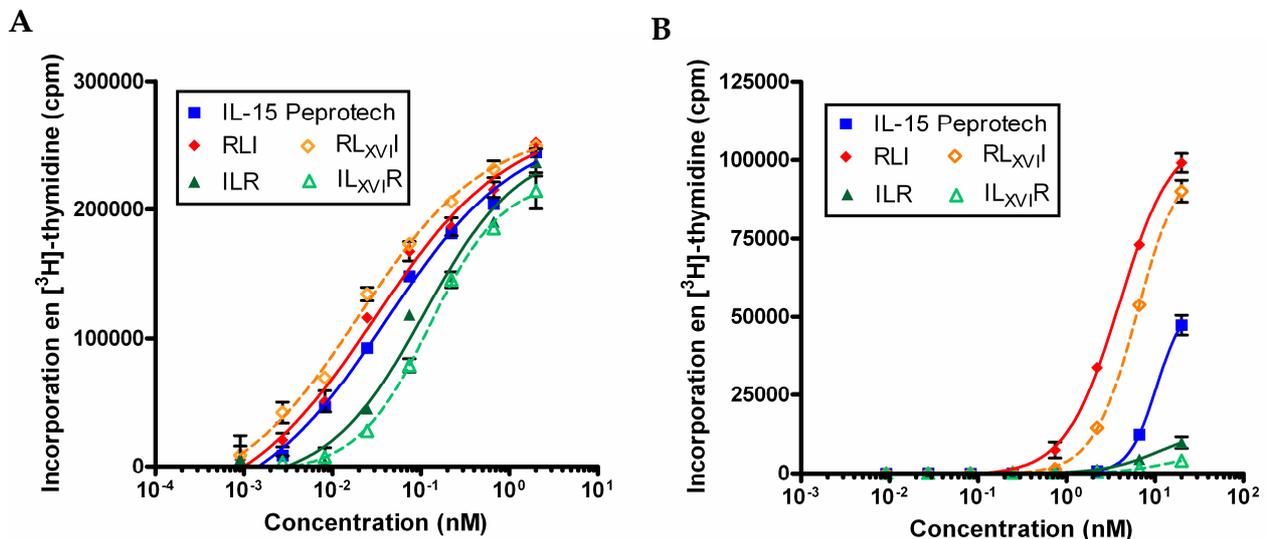


Figure 42 : Comparaison de l'activité proliférative de l'IL-15 commerciale PeproTech et des protéines de fusion sur différentes lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été incubées avec des concentrations croissantes d'IL-15 commerciale ou de protéines de fusion pendant 48 h. L'activité proliférative des cellules a été évaluée par mesure de l'incorporation en [³H]-thymidine. (A) cellules IL-15R α / β / γ_c ⁺ et IL-15R β / γ_c ⁺ (Kit225) et (B) cellules IL-15R β / γ_c ⁺ (32D β).

Quelque soit le type cellulaire, nous avons remarqué que les deux protéines de type RLI induisaient des proliférations semblables et de même pour les deux protéines de type ILR (**Figure 42**).

Toutes les protéines de fusion ont induit la prolifération de cellules Kit225 (IL-15R α / β / γ_c^+ et IL-15R β / γ_c^+) avec des EC₅₀ en accord avec l'activation de récepteurs trimériques de haute affinité (EC₅₀ ~10⁻¹⁰-10⁻¹¹ M). Cependant, alors que les EC₅₀ obtenues pour les protéines de type RLI étaient semblables à celle obtenue pour l'IL-15 commerciale PeproTech (EC₅₀ comprises entre 20 et 40 pM), les protéines de type ILR présentait des EC₅₀ quatre fois plus élevées de l'ordre de 10⁻¹⁰ M (EC₅₀ ILR = 0,108 nM et EC₅₀ IL_{XVI}R = 0,125 nM) (**Figure 42A**).

Concernant la lignée 32D β (IL-15R β / γ_c^+), seules les protéines de fusion de type RLI ont montré une induction de prolifération en accord avec leur activité super-agoniste de l'IL-15. Nous n'avons obtenu qu'un très faible effet prolifératif des deux protéines de type ILR à partir d'une concentration de 20 nM (**Figure 42B**). Ces protéines de fusion ILR ne seraient donc pas capables d'activer des récepteurs dimériques.

3. Bilan

Deux protéines de fusion à linker « court » (16 acides aminés) en configuration RLI et ILR ont été construites par mutagenèse dirigée à partir des séquences de RLI et ILR « originelles » déjà présentes au laboratoire. Ces protéines de fusion ont été efficacement produites en système baculovirus-cellules d'insecte (85-185 nM). Alors que nous avons obtenu des rendements de purification très différents (69 % pour l'IL_{XVI}R et 15 % pour le RL_{XVI}I), les deux protéines de fusion ont présenté une pureté > 92 %. L'analyse plus fine des formes natives de ces protéines a révélé qu'elles étaient en partie produites sous formes agrégées, notamment la protéine de fusion en configuration ILR. Nous avons ensuite vérifié les caractéristiques biologiques de ces deux protéines de fusion par des études de prolifération cellulaire. Le RL_{XVI}I a montré une induction de prolifération des cellules IL-15R α / β / γ_c^+ et/ou IL-15R β / γ_c^+ avec des EC₅₀ équivalentes à celles du RLI « originel » et en accord avec son activité super-agoniste. L'IL_{XVI}R, tout comme l'ILR « originel », a induit la prolifération des cellules IL-15R α / β / γ_c^+ et IL-15R β / γ_c^+ mais avec une EC₅₀ 4 fois plus élevée que l'IL-15 et nous n'avons pas pu déterminer son EC₅₀ sur les cellules IL-15R β / γ_c^+ du fait de sa trop faible induction proliférative.

C. Conclusions et discussion

L'association de l'IL-15 avec l'IL-15R α est unique dans la famille des cytokines γ_c . La structure de l'IL-15 est relativement rigide : elle présente une courte boucle AB et un pont disulfure localisé entre les cystéines 42 et 88 qui stabilise la boucle CD. Ces deux boucles AB et CD, engagées dans la liaison de l'IL-15R α , maintiennent l'interface ligand-récepteur (Olsen *et al.*, 2007). La structure de l'IL-15R α est elle aussi rigidifiée par un court feuillet β et deux coudes β . Aussi, les structures de la cytokine et de sa chaîne réceptrice spécifique présentent peu de réarrangements lors de la formation du complexe IL-15/IL-15R α (Chirifu *et al.*, 2007). La surface de liaison entre l'IL-15 et l'IL-15R α est assez étroite (10 Å x 25 Å sur chaque molécule) mais le complexe formé est néanmoins extrêmement stable du fait d'importantes complémentarités géométriques et électrostatiques et de la présence de nombreuses molécules d'H₂O à leur interface. Ainsi, l'IL-15 se lie à l'IL-15R α avec une haute affinité (Kd $\sim 10^{-10}$ M).

Dans cette deuxième partie, nous avons tenté de caractériser la liaison de l'IL-15 à sa chaîne réceptrice spécifique IL-15R α par deux types d'approche. La première a consisté en l'étude de mutants de l'IL-15 ne présentant plus qu'un seul pont disulfure dans le but de créer une protéine IL-15 super-agoniste ayant une haute affinité pour le récepteur dimérique IL-15R β/γ_c . La seconde a porté sur l'étude de protéines de fusion entre l'IL-15 et sa chaîne réceptrice spécifique pouvant permettre une discrimination entre deux types de configuration d'arrimage du complexe IL-15/IL-15R α .

Pour vérifier si le relâchement de la structure de l'IL-15 au niveau de son interface avec l'IL-15R α pouvait générer une protéine IL-15 super-agoniste, nous avons supprimé, par mutagenèse dirigée, l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures de cette cytokine : IL-15 Δ (S-S1), IL-15 Δ (S-S2) et IL-15 Δ (S-S1/S-S2).

Quel que soit le système de production utilisé, les mutants de l'IL-15 sans pont disulfure ont présenté de très faibles taux de production en comparaison avec l'IL-15 déjà très peu produite (au minimum 3 fois inférieurs au taux d'IL-15). Les deux mutants présentant un seul pont disulfure ont été produits avec des concentrations de l'ordre de 2-9 nM en système baculovirus-cellules d'insecte mais nous n'avons pas pu détecter de mutant IL-15 Δ (S-S1/S-S2). Ces résultats reflètent probablement que le relâchement d'un pont disulfure entraîne une modification de l'ensemble de la structure de la molécule et que plus les modifications apportées aux mutants sont destructurantes, plus les taux de production bruts des protéines sont faibles. Les cellules d'insecte présentent une machinerie cellulaire proche du système de mammifères, et elles rencontrent vraisemblablement des difficultés à produire des protéines non structurées. Ainsi, par un mécanisme de surveillance cellulaire, ces

protéines mal conformées seraient dirigées vers les lysosomes plutôt que vers le réticulum endoplasmique (Ellgaard & Helenius, 2003).

Nous avons tout de même purifié ces protéines à un pont disulfure par une méthode de chromatographie d'affinité. Quelque soit le mutant, nous avons obtenu de très faibles rendements de purification (< 5 %), fort probablement parce que nous avons très peu de protéines au départ (6,5 et 1,5 μ g de protéines pour l'IL-15 Δ (S-S1) et l'IL-15 Δ (S-S2) respectivement), et nous n'avons pas pu estimer leur pureté.

Malgré des quantités très faibles en protéines, nous avons vérifié si les mutants de l'IL-15 à un pont disulfure présentaient une activité biologique. Le mutant IL-15 Δ (S-S1) a à la fois induit la prolifération de cellules IL-15R α / β / γ c^+ et/ou IL-15R β / γ c^+ et a été capable de lier la chaîne IL-15R α , même si dans toutes ces expérimentations il présentait une efficacité 10 fois moindre par rapport à l'IL-15 non mutée. Ce pont disulfure S-S1 (C35-C85) est probablement structurant puisque le mutant IL-15 Δ (S-S1) présente une activité biologique diminuée par rapport à l'IL-15 naturelle, mais il n'est pas essentiel à la liaison de la chaîne IL-15R α . Le relâchement de la structure de l'IL-15 induit par la suppression de ce pont S-S1 ne serait pas suffisant pour que la cytokine se présente directement au complexe dimérique avec une orientation efficace et montre une activité super-agoniste. Le mutant IL-15 Δ (S-S2) n'a montré aucune induction de prolifération cellulaire et aucune liaison à la chaîne IL-15R α aux concentrations testées. En effet, ce mutant était le moins bien produit et nous n'avons pas pu vérifier ses caractéristiques à des concentrations supérieures à 2 nM. Néanmoins, en comparaison avec l'IL-15 Δ (S-S1), la cytokine IL-15 Δ (S-S2) semble avoir perdu son activité biologique. Le pont S-S2 (C42-C88) serait plus structurant et essentiel à la liaison de la chaîne IL-15R α . Ce résultat est en accord avec les données de cristallographie indiquant que ce pont est homologue à l'unique pont disulfure de l'IL-2 et qu'il stabilise la surface de liaison de l'IL-15 avec sa chaîne réceptrice spécifique (Chirifu *et al.*, 2007). Cela pourrait également expliquer son très faible taux de production : le relâchement de la structure de l'IL-15 en l'absence du pont S-S2 induirait une déstructuration trop importante de la cytokine, qui serait alors dégradée. Incapable de lier le complexe IL-15R β / γ c , cette protéine ne présenterait donc en aucun cas une activité super-agoniste.

Cette méthode nous a montré que la suppression d'un pont disulfure était trop ou pas assez déstructurante, selon le pont disulfure, pour permettre le relâchement de la structure de l'IL-15 au niveau de son interface avec l'IL-15R α et la création d'une cytokine super-agoniste. Une approche moins déstructurante et plus ciblée (comme des mutations ponctuelles d'acides aminés) devrait être envisagée pour tenter de répondre à notre hypothèse.

Afin de discriminer les deux configurations possibles d'arrimage de l'IL-15 avec sa chaîne IL-15R α , nous avons construit des protéines de fusion de type ILR et RLI présentant un linker « court », obligeant le complexe, s'il se forme, à se trouver dans la configuration *solution 1*.

Les deux protéines de fusion ILR et RLI à linker « court » (16 acides aminés) ont été créées par mutagenèse dirigée et efficacement produites en système baculovirus-cellules d'insecte (85-185 nM \equiv 2-4,4 mg/L). Ces très bons taux de production bruts des protéines de fusion, déjà obtenus avec les premières formes de RLI et ILR, corrélaient avec le fait que l'IL-15 seule est très peu produite mais, qu'associée avec son récepteur spécifique, son taux de production est significativement accru. L'IL-15R α se comporterait comme un chaperon pour la production de l'IL-15, en s'associant dès le réticulum endoplasmique/le Golgi pour limiter sa dégradation et pour ensuite favoriser son trafic intracellulaire et sa sécrétion (Duitman *et al.*, 2008 ; Meusser *et al.*, 2005 ; Mortier *et al.*, 2008). Ainsi, comme il a été suggéré récemment (Bergamaschi *et al.*, 2009), le complexe IL-15/IL-15R α pourrait être considéré comme une seule cytokine hétérodimérique, à l'image de la forme active d'IL-12p75. En effet, cette dernière est produite à partir de deux gènes séparés, le premier codant un domaine cytokine (p35) présentant une structure homologue à celle des cytokines à quatre hélices α et le second codant un domaine récepteur (p40) à structure homologue au domaine extracellulaire des récepteurs hématopoïétiques (Sieburth *et al.*, 1992 ; Trinchieri *et al.*, 2003).

Nous avons ensuite procédé à la purification de l'IL_{XVI}R et du RL_{XVI}I par une méthode de chromatographie d'affinité. Les rendements de purification obtenus ont encore une fois révélé que l'efficacité d'une purification dépend en grande partie de la quantité et de la concentration initiale en protéines (rendement de 69 % pour l'IL_{XVI}R produit à une concentration de 185 nM et rendement de 15 % pour le RL_{XVI}I produit à une concentration de 85 nM). Néanmoins, notre méthode de purification s'est avérée efficace puisque la pureté des deux protéines de fusion s'est élevée à plus de 92 %. Tout comme la cytokine IL-15 seule et les premières protéines de fusion, l'analyse des formes non dénaturées des protéines de fusion à linker « court » a révélé qu'elles étaient produites à la fois sous formes monomériques et/ou di- et multimériques. Contre toute attente, nous avons observé la formation de monomères de RL_{XVI}I, suggérant que dans la configuration RLI, un complexe IL-15/IL-15R α peut se former même en situation « tendue » après une réduction de longueur de linker de 4 aa. A l'opposé, nous n'avons pas pu détecter d'IL_{XVI}R sous forme monomérique. Cette observation suggère que le complexe IL-15/IL-15R α ne se forme pas ou très peu lorsque le linker de la protéine de fusion ILR est trop court, mais que certainement plusieurs complexes « ouverts » s'associent entre eux par affinité du domaine IL-15 pour le domaine récepteur. Ce résultat tendrait à conclure que la configuration *solution 1* n'est pas envisageable.

Toutefois, nous avons vérifié les caractéristiques biologiques des deux protéines de fusion par des études de prolifération cellulaire. Le RL_{XVI}I a montré une induction de prolifération des cellules IL-15R α / β / γ _c⁺ et/ou IL-15R β / γ _c⁺ avec des EC₅₀ équivalentes à celles du RLI « originel » et en accord avec son activité super-agoniste. Le linker « court » de cette protéine de fusion ne semble donc pas affecter ses propriétés biologiques. Par contre, l'IL_{XVI}R a induit la prolifération des cellules IL-15R α / β / γ _c⁺ et IL-15R β / γ _c⁺ avec une EC₅₀ 4 fois plus élevée que l'IL-15 et nous n'avons pas pu déterminer son EC₅₀ sur les cellules IL-15R β / γ _c⁺ du fait de sa trop faible induction proliférative.

Étonnamment, nous avons obtenu les mêmes résultats avec l'ILR « originel », qui pourtant peut être détecté en faible proportion sous forme monomérique. Il semblerait que les deux protéines de fusion en configuration ILR étudiées présentent des propriétés biologiques altérées. Pourtant, ces protéines de type ILR ne diffèrent des protéines de type RLI que par une différence de 3 aa et par la position de leur linker. Il serait possible que l'ILR « originel » présente un linker trop long (> 3 aa par rapport au nombre d'acides aminés calculés nécessaires à la formation du complexe IL-15/IL-15R α) et que cela occasionne une gêne stérique l'empêchant de lier correctement le complexe dimérique IL-15R β / γ _c. À l'opposé, l'IL_{XVI}R présenterait un linker trop court ne lui permettant pas de s'associer sous forme monomérique et d'induire un signal efficace de prolifération cellulaire. Cependant, le RLI et RL_{XVI}I existent aussi en partie sous formes di- et multimériques et ils présentent toujours une activité super-agoniste... La création de protéines de fusion de type ILR avec des linkers de tailles intermédiaires aurait pu être envisagée, mais cela nécessite un travail important alors que la caractérisation de l'IL_{XVI}R semble déjà nous indiquer que seule la configuration IL-15/IL-15R α nommée *solution 2* est possible... Une autre hypothèse pourrait être que la position du linker en configuration ILR génère une gêne stérique pour la liaison du complexe IL-15R β / γ _c et modifie les caractéristiques biologiques des protéines. En effet, de récents résultats de notre équipe ont montré que le RLI perdait son activité d'induction proliférative sur des cellules IL-15R β / γ _c⁺ (32D β) lorsqu'il présentait une étiquette His en C^{ter} de l'IL-15 (non montré, S. Morisseau et G. Teppaz).

Néanmoins, les premières expérimentations réalisées avec de l'ILR « originel » non purifié avaient montré une activité biologique quasiment identique à celle du RLI quel que soit le type cellulaire étudié (augmentation de l'EC₅₀ entre 1 et 3 fois) (Mortier *et al.*, 2006 ; non montré, G. Bouchaud). Il serait probable que, dans la configuration ILR, l'IL-15 synthétisée en premier par le ribosome s'associe *in situ* au domaine récepteur de l'ILR synthétisé immédiatement avant sur le polysome. Les protéines de fusion de type ILR seraient ainsi majoritairement produites sous formes di- et multimériques et ce phénomène d'agrégation s'accroîtrait largement lors de la purification de ces protéines. Les propriétés biologiques altérées des protéines de fusion ILR seraient alors liées à leur propre « nature ». Dans ce sens, des travaux réalisés dans notre équipe ont montré que les formes di- et multi-

mériques de RLI (séparées par chromatographie d'exclusion stérique) présentaient une activité biologique diminuée par rapport à la forme monomérique (non montré, V. Solé). De manière comparable aux résultats obtenus avec les protéines de fusion en configuration ILR, les formes agrégées de RLI présentaient une EC₅₀ entre 3 et 5 fois supérieure à celle de l'IL-15 sur cellules IL-15R α / β / γ_c^+ et IL-15R β / γ_c^+ (Kit225) et leurs EC₅₀ n'avaient pas pu être déterminées sur cellules IL-15R β / γ_c^+ (32D β) du fait de leurs trop faibles inductions prolifératives.

L'association de l'IL-15 avec sa chaîne IL-15R α est unique de part sa spécificité élevée et sa haute affinité. Nous avons révélé qu'il n'était pas possible de créer une protéine IL-15 super-agoniste en relâchant sa structure par une suppression de ponts disulfures. Les deux ponts disulfures de l'IL-15 maintiennent la boucle CD, impliquée dans la liaison de l'IL-15R α , mais seul le pont S-S entre les acides aminés C42 et C88 est essentiel. Nos travaux suggèrent également que l'IL-15 s'associe avec l'IL-15R α selon une seule configuration, présentant une topologie très proche du complexe IL-2/IL-2R α .

*RÉSULTATS ET DISCUSSION,
PARTIE III*

PARTIE III : *Cis-* et *trans-*présentation de l'IL-15 et analyse des dynamiques d'activation de l'IL-15R

A. Introduction

La transduction du signal de l'IL-15 est principalement assurée par les deux chaînes transductrices IL-15R β et γ_c et met en jeu les trois voies majeures d'activation Jak/STAT, MAPK et PI3K/Akt. La chaîne spécifique IL-15R α n'est actuellement pas considérée comme ayant un rôle majeur dans la transduction du signal de l'IL-15. Cependant, son domaine cytoplasmique peut interagir avec TRAF2 et Syk, même si le rôle de ces interactions n'est pas bien défini *in vivo*.

L'originalité de l'IL-15 est sa capacité à être *trans*-présentée. Dans ce contexte, la chaîne IL-15R α , exprimée à la surface de cellules productrices d'IL-15 (cellules dendritiques, macrophages, ...), présente l'IL-15 en *trans* à des cellules cibles IL-15R β/γ_c^+ (cellules NK ou T CD8 $^+$ mémoires). En tant qu'évènement co-stimulateur au niveau de la synapse immunologique, la *trans*-présentation de l'IL-15 apparaît aujourd'hui comme le mécanisme d'action dominant de cette cytokine *in vivo*.

Une forme soluble de la chaîne IL-15R α (sIL-15R α) est naturellement produite par un clivage de la forme IL-15R α membranaire faisant intervenir des métalloprotéases. Ce sIL-15R α présente toujours une haute affinité pour l'IL-15 et inhibe efficacement la prolifération induite par l'IL-15 de cellules IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c^+$ *in vitro* (Mortier *et al.*, 2004). De plus, le sIL-15R α préserve son aptitude à *trans*-présenter l'IL-15 et de fortes concentrations en complexe soluble IL-15/IL-15R α assurent l'activation de cellules NK *in vitro* et *in vivo* (Rubinstein *et al.*, 2006 ; Stoklasek *et al.*, 2006).

Notre équipe avait préalablement créé la protéine de fusion RLI (**Figure 43**), constituée du domaine de liaison de la chaîne IL-15R α liée à l'IL-15 par un « linker » (Mortier *et al.*, 2006). Cette molécule présente une haute affinité pour le récepteur IL-15R β/γ_c . L'activité agoniste du RLI a été démontrée *in vivo* sur le développement et la différenciation de cellules NK dans un modèle de souris HIS (Huntington *et al.*, 2009). Le RLI a également montré une activité inhibitrice du développement de métastases pulmonaires et hépatiques dans un modèle murin de mélanome B16-F10 et a induit la réduction de la progression métastatique dans un modèle murin de cancer colorectal HCT-116 (Bessard *et al.*, 2009).

Dans cette étude, nous avons utilisé la protéine de fusion RLI comme un outil nous permettant d'étudier le mécanisme de *trans*-présentation. Afin de comparer les modes de *cis*- et *trans*-présentations de l'IL-15, nous avons analysé l'expression des chaînes réceptrices de l'IL-15, les propriétés de liaison des cytokines et l'induction des voies de signalisation dans une lignée lymphocytaire T humaine exprimant les récepteurs IL-15R α / β / γ_c et IL-15R β / γ_c (lignée Kit225).

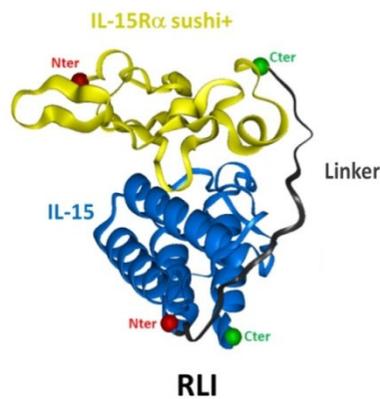


Figure 43 : La protéine de fusion RLI (IL-15R α sushi⁺-Linker-IL-15)

D'après Agnès Quéméner et avec IL-15R α -sushi⁺, sIL-15R α domaine sushi allongé de 13 aa.

Les résultats présentés ci-après ont été soumis au journal "European Cytokine Network" et ont été acceptés pour publication le 30 juillet 2010 (cf. Annexe 1).

B. Résultats

Pour toutes nos expérimentations, nous avons utilisé de faibles doses d'IL-15 pour stimuler les récepteurs trimériques de haute affinité (*cis*-présentation) et la protéine de fusion RLI pour mimer la *trans*-présentation de l'IL-15 aux récepteurs dimériques.

1. Différentes propriétés de liaison aux récepteurs à l'IL-15

Pour pouvoir étudier les propriétés de liaison de l'IL-15 et du RLI aux récepteurs exprimés à la surface cellulaire des Kit225, nous avons tout d'abord radiomarqué ces cytokines à l'¹²⁵I et vérifié que leurs activités biologiques n'étaient pas affectées par une étude de prolifération cellulaire sur la lignée Kit225 (cf. Matériels et Méthodes et **Figure 44**).

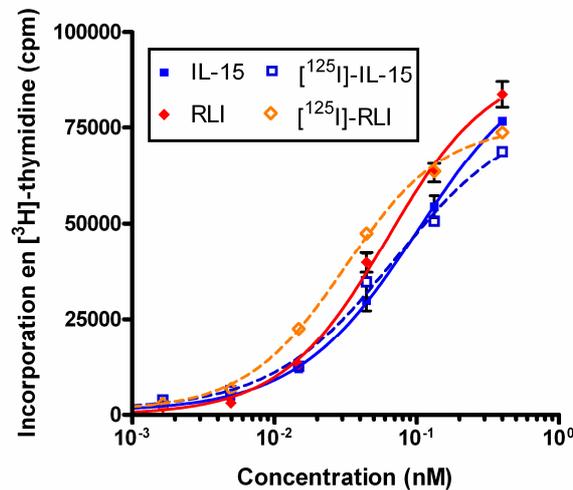


Figure 44 : Comparaison de l'activité proliférative des cytokines radiomarquées et non radiomarquées

La lignée cellulaire Kit225 a été incubée avec des concentrations croissantes d'IL-15, de RLI ou de cytokines radiomarquées pendant 48 h. L'activité proliférative des cellules a été évaluée par mesure de l'incorporation en [³H]-thymidine.

Une fois, l'activité biologique des cytokines radiomarquées vérifiée, nous avons étudié spécifiquement leurs propriétés de liaison aux récepteurs membranaires. Comme attendu, nous avons obtenu deux sites de liaison pour l' [¹²⁵I]-IL-15 : le premier, de haute affinité, correspondant aux récepteurs trimériques IL-15R α / β / γ _c (K_d = 0,035 nM ; B_{max} = 295 sites/cellule), et le deuxième, d'affinité intermédiaire, correspondant aux récepteurs dimériques IL-15R β / γ _c (K_d = 19,5 nM ; B_{max} = 2785 sites/cellule) (**Figure 45A**). A l'opposé, nous avons montré que l' [¹²⁵I]-RLI ne se liait qu'à un seul type de récepteurs de haute affinité (K_d = 0,185 nM ; B_{max} = 3065 sites/cellule) correspondant aux récepteurs dimériques IL-15R β / γ _c (**Figure 45B**).

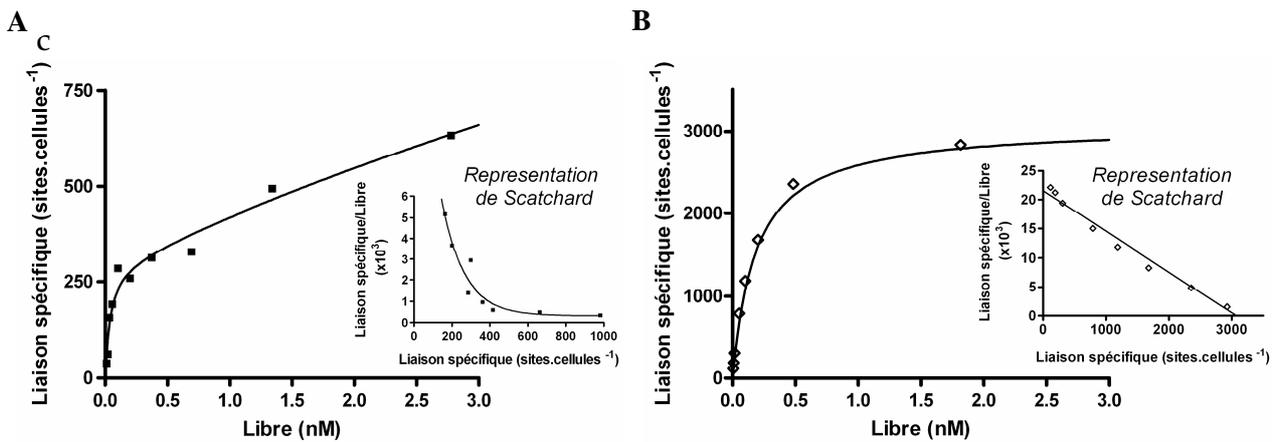


Figure 45 : Propriétés de liaison de l'IL-15 et du RLI sur les cellules Kit225

Les cellules Kit225 ($IL-15R\alpha/\beta/\gamma_c^+$) ont été incubées avec des concentrations croissantes d'IL-15 radiomarquée (A) ou de RLI radiomarqué (B) pendant 1 h à 4°C. Les liaisons spécifiques ont été déterminées par soustraction des liaisons non spécifiques aux liaisons totales. Les représentations de Scatchard sont positionnées en inset.

2. Cinétiques d'expression des chaînes réceptrices membranaires et d'internalisation des cytokines

Cinétiques d'expression des chaînes réceptrices IL-15R α et IL-15R β

L'expression des chaînes IL-15R α et IL-15R β à la surface des cellules Kit225 a été mesurée par cytométrie de flux. Le traitement des cellules par de l'IL-15 a induit une réduction rapide de l'expression membranaire de la chaîne IL-15R α , détectable dès 15 min et entraînant une disparition quasi-complète de cette chaîne à 24 h de traitement (**Figure 46A**). Au contraire, après traitement par du RLI, l'expression de l'IL-15R α est restée inchangée pendant les premières heures, puis, a diminué légèrement jusque 24 h (**Figure 46A**).

Le traitement par de l'IL-15 n'a pas montré de diminution de l'expression de la chaîne IL-15R β même après 24 h de stimulation (**Figure 46B**). Le RLI, quant à lui, a induit une diminution tardive (24 h) mais notable de l'expression de cette chaîne (**Figure 46B**).

Nous avons donc montré que l'IL-15 et le RLI induisent bien une diminution de l'expression membranaire des chaînes réceptrices de l'IL-15R mais avec des cinétiques différentes, l'effet de l'IL-15 sur son récepteur de haute affinité étant plus rapide que celui du RLI sur son propre récepteur.

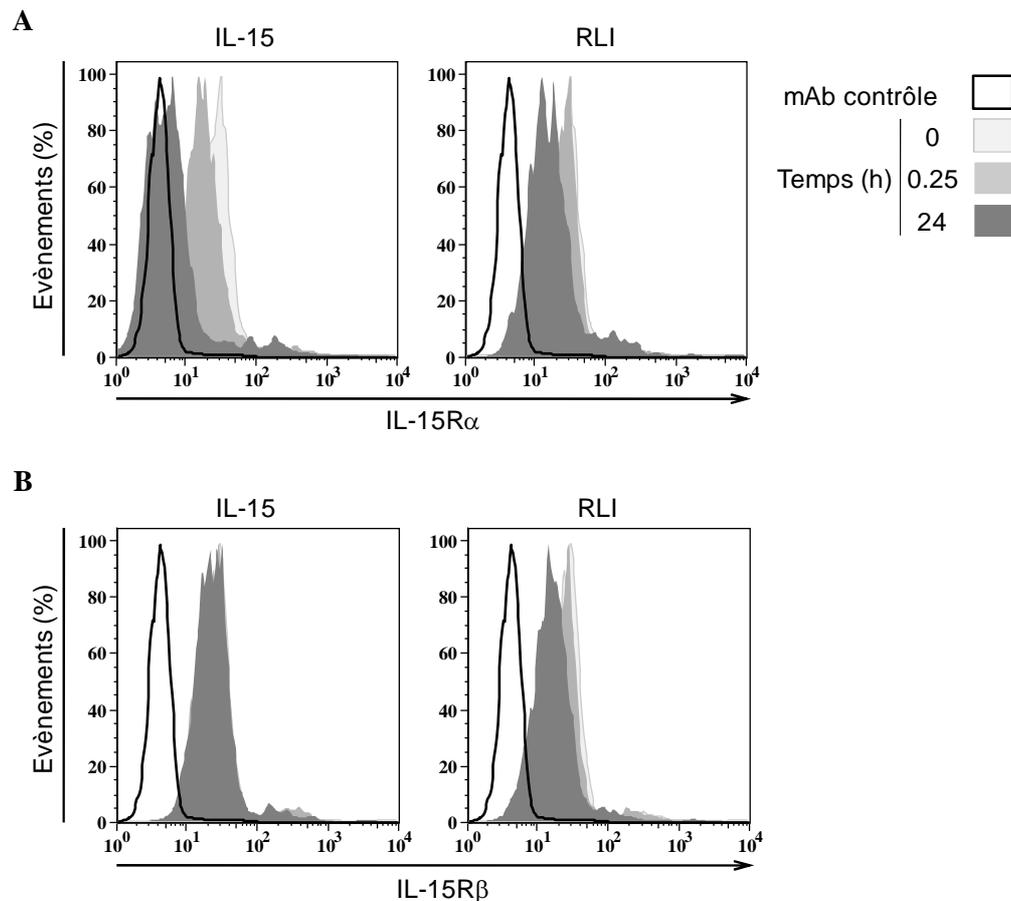


Figure 46 : Expression des chaînes IL-15R α et IL-15R β membranaires après traitement par de l'IL-15 ou du RLI

Les cellules Kit225 ont été incubées entre 0 et 24 h avec 500 pM d'IL-15 ou de RLI. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec des anticorps anti-IL-15R α ou anti-IL-15R β . L'expression des chaînes réceptrices a été évaluée par cytométrie de flux : (A) Expression de l'IL-15R α après traitement par de l'IL-15 ou du RLI, (B) Expression de l'IL-15R β après traitement par de l'IL-15 ou du RLI.

Cinétiques d'internalisation de l'IL-15 et du RLI

Nous avons ensuite étudié les cinétiques d'internalisation des cytokines. Pour cela, nous avons dans un premier temps radiomarké les cytokines et vérifié leur activité biologique (cf. III.B.1). Puis nous avons suivi l'internalisation des cytokines après équilibration des cellules Kit225 avec les cytokines radiomarkées et une variation de température de 4°C à 37°C (Figure 47).

Les deux cytokines [125 I]-IL-15 et [125 I]-RLI ont été efficacement internalisées (entre 40 et 50 % de l'internalisation maximale) mais nous avons obtenu une internalisation très rapide de l' [125 I]-IL-15 ($Int_{50} = 1,1$ min) comparée à celle de l' [125 I]-RLI ($Int_{50} = 23,1$ min) (Figures 47A et 47B). Ces différences en termes de cinétiques d'internalisation sont comparables à celles observées pour la diminution de l'expression des chaînes réceptrices.

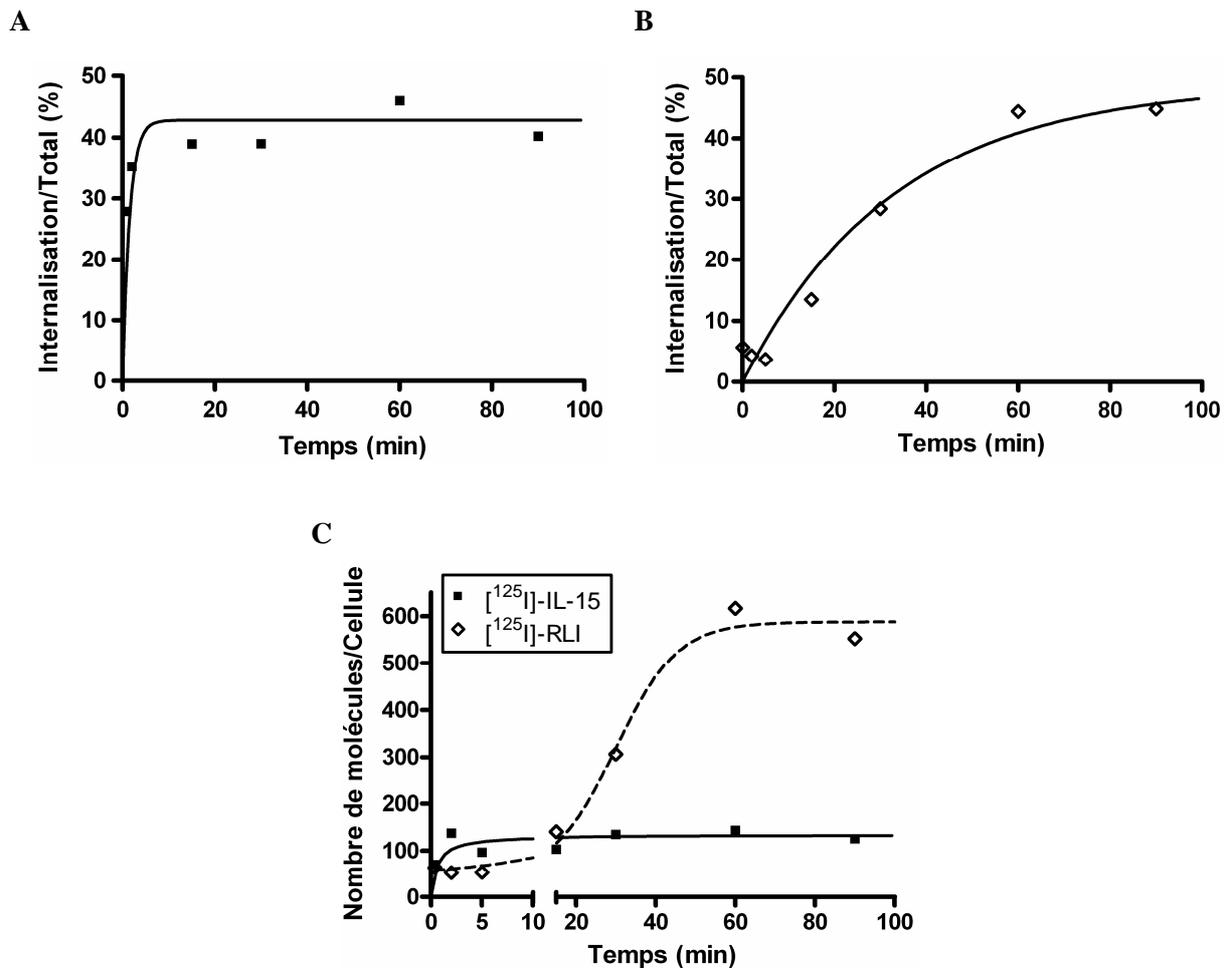


Figure 47 : Caractéristiques d'internalisation de l' [125 I]-IL-15 et de l' [125 I]-RLI

Les cellules Kit225 ont été équilibrées pendant 1 h à 4°C avec 1 nM d' [125 I]-IL-15 ou d' [125 I]-RLI. La température a alors été élevée à 37°C et l'internalisation des cytokines a été déterminée à différents temps d'incubation. (A) Internalisation de l' [125 I]-IL-15. (B) Internalisation de l' [125 I]-RLI. (C) Internalisations de l' [125 I]-IL-15 et de l' [125 I]-RLI exprimées en nombre de molécules internalisées par cellule.

D'autre part, nous avons obtenu un nombre maximal de molécules [125 I]-IL-15 internalisées par cellule 5 fois inférieur au nombre de molécules [125 I]-RLI (Figure 47C). Cela reflète le fait que le récepteur de haute affinité IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ ne correspond qu'à une faible proportion de l'IL-15R total. Cela permet également d'expliquer pourquoi l'internalisation de l'IL-15R β suite au traitement par de l'IL-15 ne peut être détectée (Figure 46B).

3. Étude des voies de signalisation de manières temps- et concentrations-dépendantes

Pour pouvoir comparer les transductions de signal induites par l'IL-15 et le RLI, l'activation des trois voies Jak/STAT, PI3K/Akt et MAPKs a été évaluée par l'étude des phosphorylations des protéines STAT5, STAT3, Akt et p44/42 MAPK (Erk 1/2). Dans un premier temps, les cellules Kit225 ont été stimulées pendant 15 min avec des concentrations croissantes de cytokines allant de 0 à 1500 pM (**Figure 48**). Les deux cytokines ont montré une activation des trois voies de signalisation d'une manière dépendante de leur concentration et, pour chaque cytokine, les profils d'activation de chaque molécule étaient comparables. Cependant, l'efficacité des cytokines s'est montrée différente : nous avons obtenu des signaux d'intensité maximale avec de l'IL-15 à 50 pM, alors qu'au moins 350 pM de RLI étaient nécessaires pour atteindre des intensités similaires. L'IL-15 semble donc être plus efficace que le RLI après une stimulation de 15 min.

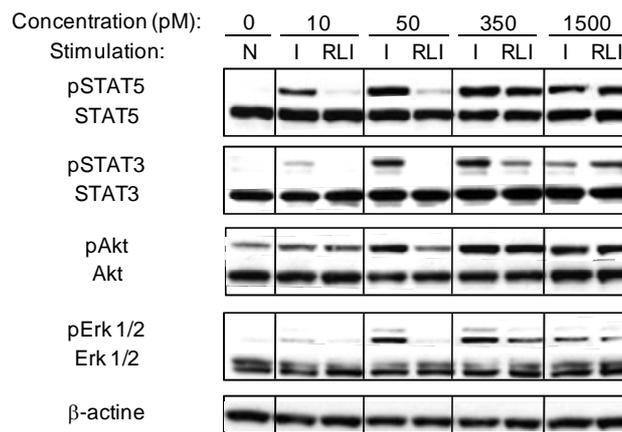


Figure 48 : Effet de la concentration en cytokines sur la transduction du signal

Les cellules Kit225 ont été stimulées pendant 15 min à 37°C avec les concentrations indiquées d'IL-15 (I) ou de RLI. Les cellules ont ensuite été lysées et la phosphorylation des protéines STAT5, STAT3, Akt et Erk 1/2 a été évaluée par Western-Blot. La protéine β-actine a été utilisée comme témoin interne. N, cellules non stimulées.

Nous avons ensuite comparé les cinétiques d'activation des voies de signalisation induites par des concentrations maximales d'IL-15 (50 pM) ou de RLI (350 pM) entre 0 et 48 h (**Figures 49A** et **49B**). Cette fois encore, l'IL-15 et le RLI ont montré des profils d'activation comparables pour toutes les protéines de signalisation et nous avons choisi de présenter uniquement la quantification densitométrique de la phosphorylation de STAT5. Suite à la stimulation par de l'IL-15, nous avons observé une signalisation forte, rapide (détectable dès 5 min de stimulation et maximale à partir de 15 min) mais transitoire (l'intensité de signalisation diminuant fortement à partir de 1 h de stimulation et devenant quasiment

indélectable à partir de 3-6 h). Le RLI a induit une signalisation aussi forte et rapide mais beaucoup plus persistante (des signaux de forte intensité étant maintenu jusque 16 h de stimulation avant de diminuer progressivement mais étant toujours détectable à 48 h).

Or nous avons préalablement montré que l'IL-15 et le RLI induisent une prolifération identique de cellules Kit225 après 48 h d'incubation (Mortier *et al.*, 2006), avec des valeurs d'EC₅₀ en accord avec une activation des récepteurs de haute affinité (EC₅₀ ~ 10⁻¹¹ M). Aussi, nous avons comparé les signalisations induites par des concentrations identiques d'IL-15 ou de RLI (50 pM) entre 0 et 48 h (**Figures 49C et 49D**). Dans ce contexte, nous avons obtenu une réponse au RLI plus tardive qu'à l'IL-15 (à partir de 30 min vs à partir de 5 min) mais plus persistante (signal toujours détectable à 48 h). Le calcul des Aires Sous la Courbe (ASC) nous a également indiqué que les intégrations des signaux de pSTAT5/STAT5 entre 0 et 48 h étaient semblables quelque soit la cytokine stimulatrice (11,4 et 16,2 unités × heure après traitement par IL-15 et RLI respectivement). Ce résultat est en accord avec le fait que 50 pM d'IL-15 et de RLI induisent une prolifération cellulaire identique. De plus, le calcul des ASC pour différentes concentrations en IL-15 et RLI a révélé que ces ASC étaient proportionnelles aux réponses prolifératives, suggérant que ces réponses dépendent d'une transmission intégrative et non pas de l'intensité maximale de signalisation.

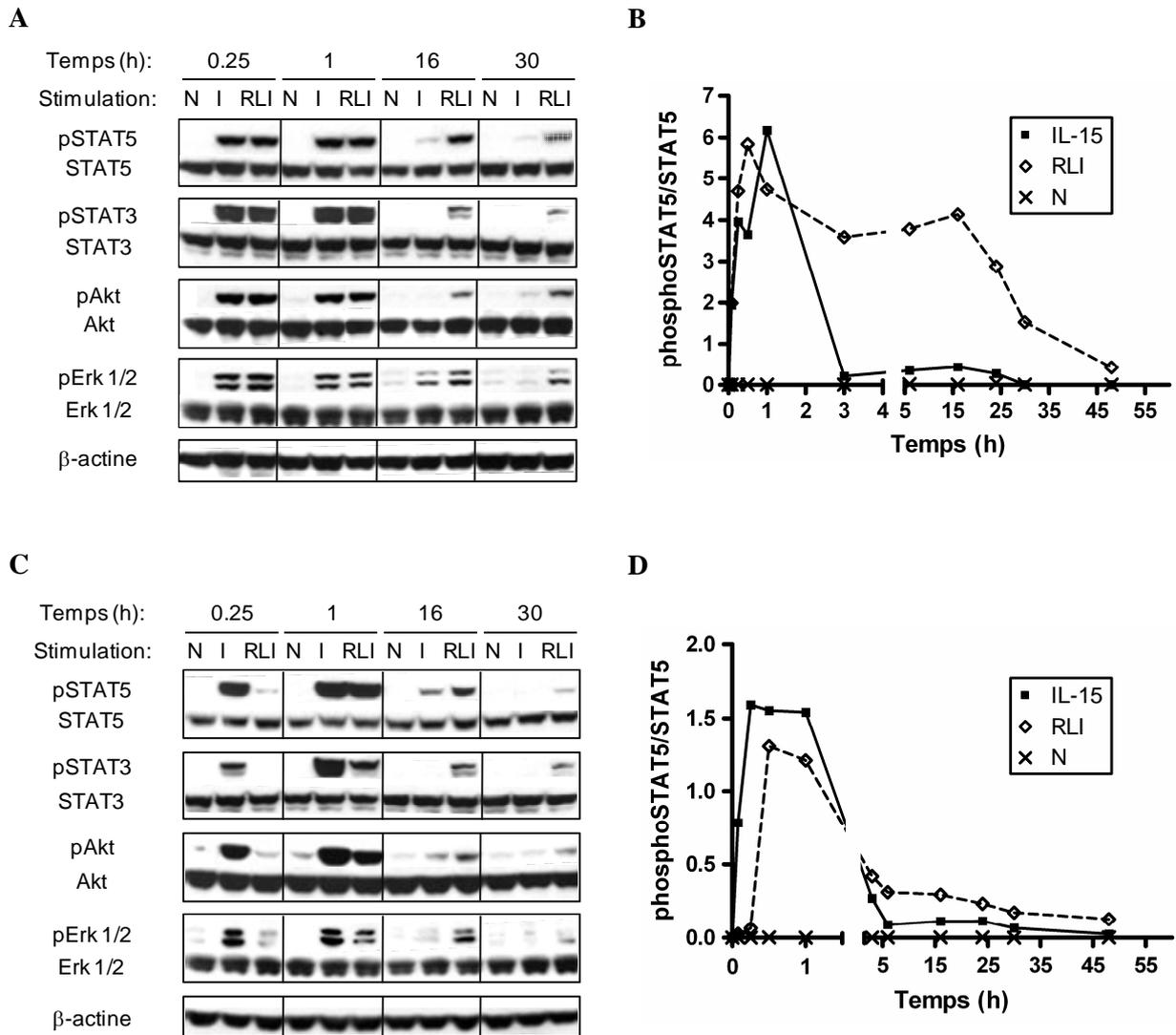


Figure 49 : Cinétiques de transduction du signal induites par l'IL-15 ou le RLI

Les cellules Kit225 ont été stimulées avec de l'IL-15 (I) ou du RLI entre 0 et 48 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été traitées comme pour la Figure 40. N, cellules non stimulées. (A) Les cellules ont été stimulées avec 50 pM d'IL-15 (I) ou 350 pM de RLI, (B) et la phosphorylation de STAT5 a été évaluée par quantification densitométrique. (C) Les cellules ont été stimulées avec 50 pM d'IL-15 (I) ou de RLI, (D) et la phosphorylation de STAT5 a été évaluée par quantification densitométrique. La protéine β-actine a été utilisée comme témoin interne.

4. Caractérisation de l'effet persistant du RLI comparé à l'IL-15

Effet persistant du RLI sur la prolifération résiduelle des cellules Kit225

Le RLI, contrairement à l'IL-15, est toujours capable de maintenir une signalisation après 5 h de stimulation (**Figure 49**). Pour caractériser plus spécifiquement cet effet persistant, nous avons tout d'abord comparé la réponse proliférative de cellules Kit225 après une incubation de 3 jours en présence de 500 pM d'IL-15 ou de RLI puis 24 h de sevrage.

Après vérification que l'activité spécifique des cytokines n'était pas affectée pendant ces 3 jours d'incubation, nous avons observé que la réponse proliférative résiduelle était significativement supérieure lorsque les cellules avaient été en contact avec du RLI plutôt qu'avec de l'IL-15 (**Figure 50**). Ce résultat indique que le RLI présente une capacité plus importante que l'IL-15 pour l'induction d'activation sur le long terme.

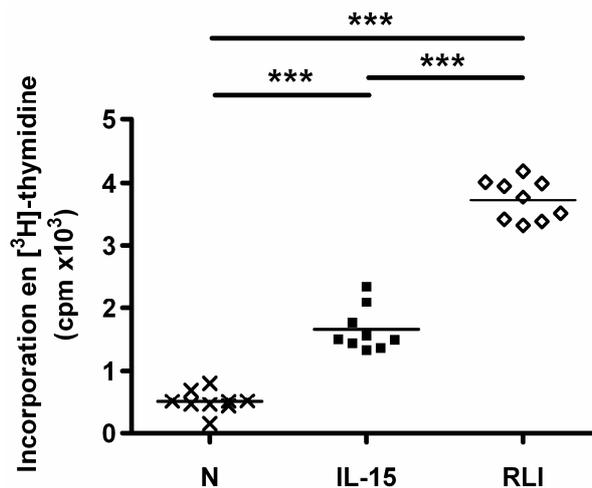


Figure 50 : Comparaison de la prolifération résiduelle des cellules Kit225 après stimulation par l'IL-15 ou par le RLI

Les cellules Kit225 ont été incubées pendant 3 jours à 37°C avec 500 pM de l'IL-15 ou de RLI. Les cellules ont ensuite été lavées et sevrées pendant 24 h. La réponse proliférative résiduelle a été évaluée 48 h après par mesure de l'incorporation en [³H]-thymidine. N, cellules non stimulées. ***, $p < 0,001$.

Effet persistant du RLI sur la transduction du signal après une nouvelle stimulation cytokinique

Dans notre organisme, nos cellules sont continuellement soumises à de nombreux signaux qui modulent leurs activités. Ainsi, nous avons voulu comparer les effets d'une nouvelle stimulation cytokinique sur nos cellules. Dans un premier temps, nous avons incubé les cellules Kit225 pendant 24 h avec 300 pM d'IL-15. Nous avons ensuite re-stimulé ces cellules pendant 1 h avec 50 pM d'IL-15 ou de RLI (induisant la même intensité de signalisation) et analysé la phosphorylation de STAT5 (**Figure 51**). En absence de pré-traitement, et en accord avec les résultats obtenus précédemment (**Figure 49C**), l'IL-15 et le RLI induisent une phosphorylation de STAT5 identique et de forte intensité. Au contraire, lorsque les cellules ont été pré-incubées avec de l'IL-15, la seconde réponse à l'IL-15 est significativement réduite alors que la seconde réponse au RLI est beaucoup moins affectée. Ce résultat est en accord avec le fait que l'IL-15 induit une diminution importante de l'expression de la chaîne IL-15R α , qui affecte principalement les récepteurs de haute affinité. Les récepteurs d'affinité intermédiaire sont alors toujours disponibles pour le RLI qui peut induire un signal sur le long terme.

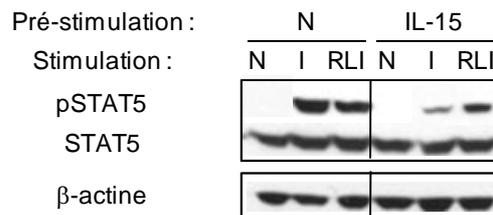


Figure 51 : Transduction du signal après re-stimulation cytokinique

Les cellules Kit225 ont été incubées avec 300 pM d'IL-15 pendant 24 h à 37°C, puis de nouveau stimulées pendant 1 h à 37°C avec 50 pM d'IL-15 (I) ou de RLI. Les cellules ont ensuite été lysées et la phosphorylation de STAT5 a été analysée par Western-Blot. La protéine β -actine a été utilisée comme témoin interne. N, cellules non stimulées.

C. Conclusions et discussion

De nombreuses études décrivent l'existence des deux modes d'action de l'IL-15 (*cis*- et *trans*-présentation) et discutent de leur importance relative dans le contexte de l'activation immunitaire. Alors que le mécanisme de *trans*-présentation de l'IL-15 semble majoritaire *in vivo*, la *cis*-présentation de l'IL-15 interviendrait dans certains contextes pathologiques.

Dans cette troisième partie, nous avons comparé sur la même lignée cellulaire les effets de la *cis*-présentation de l'IL-15 aux récepteurs IL-15R α / β / γ_c à ceux du RLI mimant le mécanisme de *trans*-présentation de l'IL-15 aux complexes IL-15R β / γ_c . Nous avons montré que ces deux modes d'action de l'IL-15 étaient associés à différentes dynamiques d'activation des récepteurs et de transduction du signal.

Les cellules Kit225 présentent deux types de récepteur à l'IL-15 : une majorité (90 %) de récepteurs d'affinité intermédiaire ($K_d \sim 10^{-8}$ nM) et une petite proportion de récepteurs de haute affinité ($K_d \sim 10^{-10}$ M). La protéine de fusion RLI, elle, ne se fixe qu'à un seul type de récepteurs correspondant aux récepteurs dimériques de l'IL-15.

L'analyse de l'expression des chaînes réceptrices IL-15R α et IL-15R β après stimulation des cellules par de l'IL-15 ou du RLI a mis en évidence différentes cinétiques. Dans le contexte de *cis*-présentation de l'IL-15, nous avons pu observer une rapide disparition de l'IL-15R α membranaire, reflétant l'internalisation des complexes IL-15R α / β / γ_c . Nous n'avons pas pu mettre en évidence une disparition parallèle de l'IL-15R β dans nos conditions expérimentales, les récepteurs trimériques IL-15R α / β / γ_c ne représentant que 10 % des récepteurs comprenant la chaîne IL-15R β . Dans le contexte de *trans*-présentation de l'IL-15, nous avons observé une internalisation des complexes IL-15R β / γ_c , comme le révèle la disparition de l'IL-15R β membranaire, mais avec une cinétique beaucoup plus lente comparée à l'internalisation de l'IL-15R α par l'IL-15. Nous avons également remarqué que le RLI induisait une faible internalisation de l'IL-15R α , alors que la protéine de fusion était incapable de fixer cette chaîne (non montré, G. Bouchaud). Ce résultat est en accord avec la notion que l'IL-15R α se trouverait pré-associée ou dans la proximité de l'IL-15R β avant la liaison de la cytokine. Une telle proximité moléculaire des chaînes réceptrices de l'IL-15 dans des rafts lipidiques à la surface des cellules Kit225 a d'ailleurs été suggérée par des analyses de cytométrie en flux et de FRET associé à de la microscopie confocale (Vamosi *et al.*, 2004).

Nous avons aussi observé des différences de cinétiques d'internalisation des cytokines, en corrélation avec les cinétiques obtenues pour l'expression des récepteurs. En effet, l'internalisation du RLI par le récepteur IL-15R β / γ_c s'est révélée beaucoup plus lente que celle de l'IL-15 par le complexe IL-15R α / β / γ_c (Int_{50} vingt fois supérieure pour le RLI que pour l'IL-15). La réponse proliférative résiduelle plus importante dans le cas du RLI, après

disparition des cytokines du surnageant, est également en accord avec une cinétique d'internalisation plus lente du RLI. Ces résultats ont donc montré que les cinétiques d'internalisation des complexes cytokine-récepteur étaient plus lentes dans le contexte de *trans*-présentation que dans le contexte de *cis*-présentation de l'IL-15. Cela pourrait être lié à un rôle spécifique de l'IL-15R α dans la rapidité d'internalisation des récepteurs trimériques. Cela pourrait également être expliqué par des interactions différentes des complexes récepteurs avec d'autres molécules membranaires, comme les MHC I et II retrouvées à la proximité de l'IL-15R par des analyses FRET (Vamosi *et al.*, 2004), ou avec le cytosquelette sous-jacent, récemment montré comme ayant un rôle majeur pour le complexe IL-7/IL-7R (Rose *et al.*, 2010).

Un grand nombre d'études portent à la compréhension des cascades de signalisation induites par l'activation de l'IL-15R. Aujourd'hui, on considère que les domaines intracellulaires des chaînes IL-15R β et γ_c sont les acteurs majeurs de l'initiation de la transduction du signal de l'IL-15. Ces chaînes réceptrices induisent de nombreuses voies de signalisation et principalement les voies Jak/STAT, Ras/MAPK/Erk et PI3K/Akt. Dans notre étude, nous avons montré que l'IL-15 et le RLI activent ces trois voies majeures, et une analyse plus globale à l'aide d'un kit Phospho-Kinase Array (R&D Systems) n'a révélé aucune différence qualitative entre les protéines phosphorylées par l'IL-15 ou le RLI (non montré, H. Perdreau). Ces résultats indiquent donc que les mêmes voies de signalisation sont induites par les mécanismes de *cis*- et *trans*-présentation de l'IL-15, en accord avec le fait que la réponse biologique dépend du complexe IL-15R β/γ_c .

Cependant, nos analyses de transduction du signal en fonction de la concentration et du temps ont révélé des différences majeures entre les modes d'activation de l'IL-15 et du RLI. Nous avons montré qu'après 15 min de stimulation, l'IL-15 est 5 à 7 fois plus efficace comparée au RLI. Par exemple, la phosphorylation maximale de STAT5 est observée avec 50 et 350 pM d'IL-15 et de RLI respectivement. Cette différence est exactement corrélée avec celle retrouvée entre les constantes d'affinité de l'IL-15 pour l'IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ ($K_d = 0,035$ nM) et du RLI pour l'IL-15R β/γ_c ($K_d = 0,185$ nM).

A ces concentrations optimales (50 pM d'IL-15 et 350 pM de RLI), les cinétiques d'induction de phosphorylation sont rapides et identiques pour les deux cytokines. Ces résultats suggèrent ainsi que l'induction de la signalisation dépend de l'affinité des cytokines pour l'IL-15R. Pour des temps de stimulation plus longs, la durée de transduction du signal est très différente entre l'IL-15 et le RLI. Les signaux induits par l'IL-15 disparaissent rapidement, alors qu'ils persistent et ne décroissent que lentement dans le cas du RLI. Ces dernières observations sont en accord avec de récents résultats montrant *ex vivo* que la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 dans des cellules T CD8⁺ persiste plus longtemps après *trans*-présentation de l'IL-15 par des cellules dendritiques IL-15R α^+ qu'après

stimulation de ces cellules par de l'IL-15 soluble (120 h vs 24 h respectivement) (Sato *et al.*, 2007). Ces observations corrélaient également avec les différences de cinétiques d'internalisation des deux cytokines (20 fois plus rapide pour l'IL-15 que pour le RLI) et d'expression des chaînes réceptrices membranaires après stimulation cytokinique (disparition plus rapide après stimulation par de l'IL-15 qu'avec du RLI). Cela suggère que la durée d'induction de signaux est liée au temps de résidence du complexe cytokine-récepteur au niveau de la membrane plasmique.

Nous avons ensuite analysé plus spécifiquement ces différences en termes de cinétiques d'internalisation des ligands et de signalisation pour leurs impacts biologiques. Pour des concentrations en IL-15 et RLI, préalablement montrées comme induisant des réponses prolifératives identiques à 48 h, nous avons trouvé que les intégrations d'intensité de signalisation étaient similaires. Plus généralement, les intégrations d'intensité de stimulation, mesurées par le calcul des Aires Sous la Courbe (ASC), se sont révélées proportionnelles à la concentration en cytokine utilisée. Ce résultat indique que la réponse proliférative cellulaire est basée sur un mode de transmission intégratif (proportionnel aux ASC) plutôt que sur la cinétique de signalisation. Néanmoins, ces observations devront être confirmées dans un contexte plus physiologique de *trans*-présentation mettant en œuvre une cellule *trans*-présentatrice de l'IL-15 et une cellule cible.

Du fait que l'IL-15 libre ne puisse pas être détectée dans des fluides biologiques en conditions physiologiques, il a été suggéré que l'IL-15 agissait principalement comme une protéine associée à la membrane plasmique par sa chaîne réceptrice IL-15R α . L'IL-15R α se comporterait alors comme un chaperon pour la production, le trafic intracellulaire et la sécrétion de la cytokine (Mortier *et al.*, 2008). Cependant, de l'IL-15 libre peut être détectée dans le sérum de patients atteints de pathologies inflammatoires, de maladies auto-immunes ou d'infections pathogènes (Bouchaud *et al.*, 2010 ; Silva *et al.*, 2005 ; Waldmann, 2004), suggérant aussi un fonctionnement par *cis*-activation des complexes IL-15R trimériques (Olsen *et al.*, 2007 ; Schluns *et al.*, 2005 ; Vamosi *et al.*, 2004). Un modèle structural a d'ailleurs proposé que la haute flexibilité du domaine linker et/ou de la région riche en prolines/thréonines de l'IL-15R α permettrait la présentation de l'IL-15 que ce soit en mode *cis* ou en mode *trans* (Olsen *et al.*, 2007).

Ainsi, l'IL-15 pourrait être *cis*-présentée dans certaines situations, notamment inflammatoires. Dans un premier temps, la régulation positive de l'expression de l'IL-15R α en condition pathologique assurerait une rapide expansion de cellules T et NK antigène-spécifiques et une importante réponse immunitaire (Stonier & Schluns, 2010). Puis, l'intense régulation négative de la chaîne IL-15R α par l'IL-15, comme montrée dans cette étude, éviterait les graves conséquences induites par une activation excessive du système immuni-

taire comme la surproduction de cytokines inflammatoires, des lyses cellulaires et des réponses cellulaires adaptatives incohérentes. Dans ce sens, il a récemment été montré *in vitro* que la sensibilité de cellules NK humaines à l'IL-15 soluble était accrue dans les premières phases d'activation alors que leur réponse était redirigée plus tardivement vers l'IL-2 et l'IL-15 *trans*-présentée (Pillet *et al.*, 2009). Ces auteurs décrivent une expression séquentielle des chaînes IL-2R α et IL-15R α qui jouerait un rôle clé dans la coordination des réponses immunes innées et adaptatives. La plus lente régulation négative des complexes IL-15R β / γ_c , comme présentée dans cette étude, permettrait ensuite aux cellules de rester compétentes pour la *trans*-présentation de l'IL-15, mécanisme qui a été montré comme ayant un rôle majeur dans le maintien de cellules T CD8⁺ mémoires sur le long terme.

Nous avons récemment montré qu'une forme soluble d'IL-15R α (sIL-15R α) était retrouvée en concentration élevée dans le sérum de patients atteints de cancers de la tête et du cou (Badoual *et al.*, 2008) et en concentration augmentée dans le sérum des patients atteints de maladie de Crohn et répondeurs au traitement par de l'infliximab (Bouchaud *et al.*, 2010). La protéine sIL-15R α , générée par épissage alternatif ou par clivage protéolytique de la forme membranaire IL-15R α , agirait dans ces contextes en tant que chaperon de l'IL-15, augmentant son activité biologique. Cet IL-15R α soluble *trans*-présenterait alors l'IL-15 à des cellules cibles sans nécessiter de contact inter-cellules. De plus, il a été montré que le sIL-15R α accroît la demi-vie de l'IL-15. Il permettrait ainsi la diffusion de la cytokine et son action sur d'autres types cellulaires et tissulaires exprimant les récepteurs IL-15R β / γ_c (Stoklasek *et al.*, 2006). D'une manière similaire, l'IL-6 est connue pour se lier à une forme soluble naturelle de sa chaîne spécifique IL-6R pour former un complexe capable de stimuler des cellules exprimant la chaîne transductrices gp130, en absence d'IL-6R membranaire (Scheller *et al.*, 2006). Ce mécanisme, appelé « *trans*-signalisation » de l'IL-6, est impliqué dans le maintien de maladies inflammatoires chroniques (Rose-John *et al.*, 2006). Au vu de nos résultats, il serait intéressant de vérifier si la *cis-* et la *trans*-signalisation de l'IL-6 sont également impliquées dans différentes dynamiques d'activation du récepteur à l'IL-6.

Les modes de *cis-* et *trans*-présentation de l'IL-15 génèrent donc différentes cinétiques d'expression des récepteurs, d'internalisation des cytokines et de signalisations cellulaires. Cette distribution contrôlée de l'IL-15, à la fois spatialement et temporellement, pourrait constituer un programme limitant les conséquences indésirables d'une puissante cytokine. Les mécanismes de *cis-* et *trans*-présentation pourraient également jouer un rôle dans la coordination entre les immunités innée et adaptative. Ainsi, une meilleure compréhension du système IL-15/IL-15R est nécessaire à la création et au développement de traitements immunothérapeutiques basés sur l'utilisation de cytokines comme adjuvants.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES - ET PERSPECTIVES -

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

A travers trois études distinctes, nous nous sommes intéressés à la biologie de l'IL-15, de la régulation de son ADN et de sa production à ses voies de signalisation, en passant par l'étude de l'association du complexe hautement spécifique IL-15/IL-15R α .

Dans une première partie, nous avons optimisé la production de l'IL-15 dans le système baculovirus-cellules d'insecte en modifiant sa séquence ADN par de multiples étapes de mutagenèse dirigée. Nous avons réussi à augmenter le taux de production de cette cytokine d'un facteur 10 en favorisant principalement sa transcription et son trafic intracellulaire/sa sécrétion. La purification de l'IL-15 optimisée ainsi que l'analyse de ses caractéristiques protéiques ont révélé que cette cytokine était N-glycosylée et produite à 35 % sous formes agrégées. Ces résultats ont appuyé la notion de nécessité d'un chaperon pour la production efficace de l'IL-15 (en particulier l'IL-15R α). Néanmoins, l'IL-15 ainsi produite était directement active et présentait une activité biologique identique à l'IL-15 commerciale.

Nous avons ensuite appliqué les mêmes optimisations de séquence à deux antagonistes de l'IL-15 : l'IL-15/N65K et l'IL-15/L69R. Le taux de production de la protéine IL-15/N65K a été augmenté d'un facteur 25 alors que celui de la protéine IL-15/L69R n'a pas été optimisé. Cependant, ces deux protéines étaient bien actives et elles inhibaient totalement la prolifération de cellules IL-15R α / β / γ_c ⁺ induite par de l'IL-15.

Afin de valider la future utilisation des cytokines IL-15, IL-15/N65K et IL-15/L69R en tant que molécules thérapeutiques, la production de lots importants de chacune de ces protéines devrait être envisagée. Leurs purifications et leurs caractérisations *in vitro* devraient ensuite être réalisées, pour enfin pouvoir tester ces molécules dans des modèles de pathologies *in vivo* (modèles de cancers pour l'IL-15 et modèles d'inflammations pour les antagonistes de l'IL-15).

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'association de l'IL-15 avec sa chaîne réceptrice spécifique IL-15R α . Dans un premier temps, nous avons révélé qu'il n'était pas possible de créer une protéine IL-15 « super-agoniste » en relâchant la structure de la cytokine par suppression de chacun de ses ponts disulfures. Nous avons cependant vérifié que les deux ponts disulfures de l'IL-15 maintiennent la boucle CD, impliquée dans la liaison de l'IL-15R α , mais que seul le pont disulfure entre les acides aminés C42 et C88 est essentiel. Une méthode moins destructurante devrait être envisagée, comme des mutations ponctuelles d'acides aminés, pour créer une IL-15 à haute affinité pour le complexe dimérique IL-15R β / γ_c .

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la discrimination des deux configurations possibles d'arrimage de l'IL-15 avec sa chaîne IL-15R α , par l'intermédiaire de protéines de fusion présentant des « linkers » de tailles différentes. Toutes les protéines de fusion étudiées ont été produites très efficacement, confirmant le rôle de l'IL-15R α en tant que chaperon pour la production de l'IL-15. Par contre, l'analyse des caractéristiques des protéines purifiées a révélé que, en configuration ILR (C^{ter} IL-15-Linker-N^{ter} IL-15R α sushi⁺), les protéines de fusion étaient majoritairement produites sous formes agrégées et qu'elles présentaient une activité biologique diminuée par rapport à l'IL-15 seule. Nos travaux ont ainsi suggéré que l'association de l'IL-15 avec sa chaîne réceptrice spécifique n'était réalisable que dans la seule configuration démontrée par l'étude cristallographique du complexe IL-15/IL-15R α , et présentant une topologie très proche du complexe IL-2/IL-2R α . La cristallisation des différentes protéines de fusion de type RLI et ILR pourrait être envisagée pour vérifier les configurations d'association de ces molécules.

Dans une troisième partie, nous avons caractérisé les modes de *cis*- et *trans*-présentation de l'IL-15. Nous avons utilisé de faibles doses d'IL-15 pour stimuler les récepteurs trimériques de haute affinité (*cis*-présentation) et la protéine de fusion RLI pour mimer la *trans*-présentation de l'IL-15 aux récepteurs dimériques. Nos expérimentations ont montré que ces deux modes d'action de l'IL-15 généraient différentes cinétiques d'expression des chaînes réceptrices de l'IL-15, d'internalisation des cytokines et de signalisations cellulaires. En effet, l'IL-15 était internalisée très rapidement et elle induisait une forte régulation négative de l'IL-15R α et une courte réponse cellulaire. A l'opposé, le RLI était internalisé plus lentement mais il maintenait l'expression de l'IL-15R α et induisait une réponse cellulaire persistante. Nos résultats ont également suggéré que la durée d'induction de signalisation était liée au temps de résidence des complexes cytokines-chaînes réceptrices à la surface membranaire et que la réponse proliférative dépendait de l'intégration globale des signaux cellulaires plutôt que de la cinétique et de l'intensité de signalisation.

Ainsi, l'IL-15 pourrait être *cis*-présentée dans certaines situations, notamment inflammatoires, et assurerait une intense réponse immunitaire. Puis, l'internalisation rapide et efficace de l'IL-15R α éviterait les conséquences induites par une excessive activation du système immunitaire. La plus lente internalisation des complexes IL-15R β / γ_c permettrait ensuite aux cellules de rester compétentes pour le mécanisme de *trans*-présentation de l'IL-15 et maintiendrait une immunité sur le long terme.

Pour aller plus loin, des études seraient à envisager afin de déterminer les protéines intracellulaires recrutées spécifiquement lors de l'induction du signal cellulaire (signalosome), par des méthodes de gels d'électrophorèse à 2 dimensions et de spectrométrie de masse. Il serait également important d'analyser le rôle du cytosquelette ainsi que des rafts lipidiques par des études d'ultracentrifugation, d'immunoprécipitation, de Western-Blot et par l'utilisation de la technologie FRET. L'ensemble de ces résultats seraient ensuite à

confirmer, dans un premier temps, sur des lymphocytes primaires humains, puis par une étude plus physiologique de *trans*-présentation impliquant une cellule présentatrice d'antigène IL-15R α ⁺ et une cellule cible IL-15R β / γ _c⁺.

Ces travaux devraient contribuer à la compréhension des mécanismes d'expression et de fonctionnement de l'IL-15, une cytokine à la fois puissante et complexe, afin d'envisager et de développer son utilisation en tant que molécule thérapeutique.

MATÉRIELS ET
- **MÉTHODES** -

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels

Cytokines recombinantes

IL-15 recombinante humaine (PeproTech Inc)

IL-2 recombinante humaine (Chiron)

IL-3 recombinante murine (R&D Systems)

GM-CSF recombinant humain (R&D Systems)

RLI, protéine de fusion entre hIL-15 et hIL-15R α , produite en système baculovirus-cellules Sf9 à l'aide du système d'expression *Bac-to-Bac*[®] (Invitrogen) et purifiée sur une colonne d'affinité anti-FLAG-agarose (Sigma-Aldrich)

Anticorps

MAB247 anti-hIL-15, monoclonal murin (R&D Systems)

AF247 anti-hIL-15R α , polyclonal de chèvre (R&D Systems)

AF224-NA anti-hIL-15R β , polyclonal de chèvre (R&D Systems)

AF284 anti- γ_c , polyclonal de chèvre (R&D Systems)

F0107 anti-IgG de chèvre, polyclonal de singe couplé à la phycoérythrine (PE) (R&D Systems)

Control isotypique d'IgG de chèvre (Santa-Cruz Biotechnologies)

M2-peroxydase anti-FLAG, monoclonal murin couplé à la peroxydase (Sigma-Aldrich)

M2-affinity agarose gel anti-FLAG, monoclonal murin couplé à de l'agarose (Sigma-Aldrich)

B-E29 anti-hIL-15, monoclonal murin (Diaclone)

#9351 anti-phospho-STAT5, polyclonal murin (Cell Signaling Technology)

#9131 anti-phospho-STAT3, polyclonal murin (Cell Signaling Technology)

#9271 anti-phospho-Akt, polyclonal murin (Cell Signaling Technology)

#9272 anti-Akt, polyclonal murin (Cell Signaling Technology)

#9106 anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2), polyclonal murin (Cell Signaling Technology)

#9102 anti-p44/42 MAPK (Erk 1/2), polyclonal murin (Cell Signaling Technology)

610191 anti-STAT5, monoclonal murin (BD Transduction Laboratories)

610190 anti-STAT3, monoclonal murin (BD Transduction Laboratories)

MAB1501R anti- β -actine, monoclonal murin (Millipore)

Lignées cellulaires

Toutes les cellules d'origine humaine ou murine ont été cultivées à 37°C, sous 5 % de CO₂, en atmosphère saturée en eau, dans du milieu RPMI-1640 ou DMEM en présence de Sérum de Veau Foetal (SVF) et de L-glutamine à 2 mM. Les conditions spécifiques de chacun des types cellulaires utilisés sont précisées ci-après :

Kit225, lignée non adhérente de lymphome leucémique T humain, exprimant les chaînes hIL-15R α , hIL-2R α hIL-15R β et h γ_c , et cultivée en milieu RPMI-1640, SVF (6 %) et hIL-2 (5 ng/mL).

32D β , lignée non adhérente de lymphoblaste murin, exprimant les chaînes hIL-15R β et m γ_c , et cultivée en milieu RPMI-1640, SVF (10 %), mIL-3 (0,4 ng/mL), β -mercaptoéthanol (10 μ M) et généticine (250 μ g/mL).

CTLL-2, lignée non adhérente de lymphocyte T cytotoxique murin, exprimant les chaînes mIL-15R α , mIL-2R α , mIL-15R β et m γ_c , et cultivée en milieu RPMI-1640, SVF (8 %) et hIL-2 (15 ng/mL).

TF-1, lignée érythroleucémique humaine non adhérente exprimant les chaînes hIL-15R α , hIL-2R α et h γ_c , et cultivée en milieu RPMI-1640, SVF (10 %) et hGM-CSF (1 ng/mL).

293-EBNA, lignée adhérente humaine issue de tissu rénal embryonnaire et transformée par l'adénovirus 5 humain (EBNA-1, "*Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1*"). Elle est cultivée en milieu DMEM, glucose (1 mg/mL), SVF (10 %) et généticine (250 μ g/mL).

II. Méthodes

Mutagenèse de l'IL-15 et de ses mutants antagonistes

Les plasmides bluescript SK polylinker (pBSSK) contenant les inserts PS PPL-FXa-IL-15, PS PPL-FXa-IL-15/N65K et PS PPL-FXa-IL-15/L69R ont été générés au laboratoire par le Dr. A. Plet. Les changements ponctuels de bases nucléotidiques ont été réalisés sur ces constructions à l'aide d'oligonucléotides complémentaires comportant les mutations désirées (Sigma-Aldrich) et suivant le protocole du *Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Les séquences ont ensuite été purifiées et vérifiées par séquençage automatique (F. Gros, IFR 26, Faculté de Médecine de Nantes).

Production de protéines recombinantes par transfection transitoire de cellules 293-EBNA

Les cellules 293-EBNA ont été transfectées selon un protocole standard au phosphate de calcium. Pour cela, les gènes d'intérêt ont tout d'abord été clonés dans le vecteur pEF-*neo*. La veille de la transfection, les cellules 293-EBNA ont étéensemencées à $0,3 \cdot 10^6$ cellules/mL dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre. Les cellules ont ensuite été transfectées par un mélange constitué de 40 µg de plasmide d'intérêt, de CaCl₂ 125 mM et de tampon HBS 1x ("*HEPES Buffered Saline*"). Les surnageants de culture contenant les protéines d'intérêt ont été récoltés 48 h après transfection. La concentration des protéines a enfin été déterminée par dosage ELISA utilisant les anticorps MAB247 anti-IL-15 et M2-peroxydase anti-FLAG, avec pour standard la protéine FLAG-IL-15, préalablement dosée par ELISA MAB247 anti-IL-15/B-E29-biotine anti-IL-15 contre l'IL-15 commerciale PeproTech.

Production de protéines recombinantes en système baculovirus-Sf9

Les protéines recombinantes de l'IL-15 ont été produites à l'aide du système commercial *Invitrogen Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System*. Ce système est composé (**Figure 52**) :

- d'un vecteur d'expression (pFastBac™) portant le promoteur de la polyhédrine (promoteur fort à niveau d'expression très élevé) et un élément de transposition Tn7,
- d'une souche d'*E. Coli* (DH10Bac™) contenant un vecteur navette viral (« bacmide » comportant le génome du baculovirus *Autographa californica multicaudatus nucleopolyhedrovirus* ou *AcMNPV* et un site de transposition Tn7) et un plasmide « helper » permettant la génération de bacmides recombinants,
- et de la lignée cellulaire d'insecte Sf9 (issue du lépidoptère *Spodoptera frugiperda*) cultivée en suspension à 27°C dans du milieu Sf900 SFM II (Invitrogen).

Cette technique a consisté dans un premier temps au clonage du gène d'intérêt dans le vecteur pFastBac™ et à sa transformation dans les bactéries compétentes DH10Bac™. Après transposition du gène d'intérêt dans le bacmide, les clones positifs ont été identifiés par criblage blanc/bleu (la transposition induit la rupture du gène *LacZ*) et sélection antibiotique (Kanamycine, Gentamicine, Tétracycline). Les bacmides recombinés ont ensuite été purifiés par un protocole classique de préparation d'ADN de haut poids moléculaire. Un million de cellules d'insectes ont été transfectées avec 1 µg de chaque bacmide recombinant à l'aide de lipofectamine (Cellfectin®, Invitrogen) et mises en culture pendant une semaine. Après transfection, les particules virales étaient présentes dans les surnageants de culture. Les virus ont ensuite été amplifiés sur 6 jours de culture dans des cellules Sf9 selon les

recommandations du système *Bac-to-Bac*[®]. La quantification des titres viraux a été effectuée par la technique des plaques. La production des protéines recombinantes a enfin été réalisée en infectant des cellules d'insecte à 2.10^6 cellules/mL avec le virus amplifié en conditions calibrées, c'est-à-dire à une multiplicité d'infection (MOI) de 2, sur trois jours d'infection.

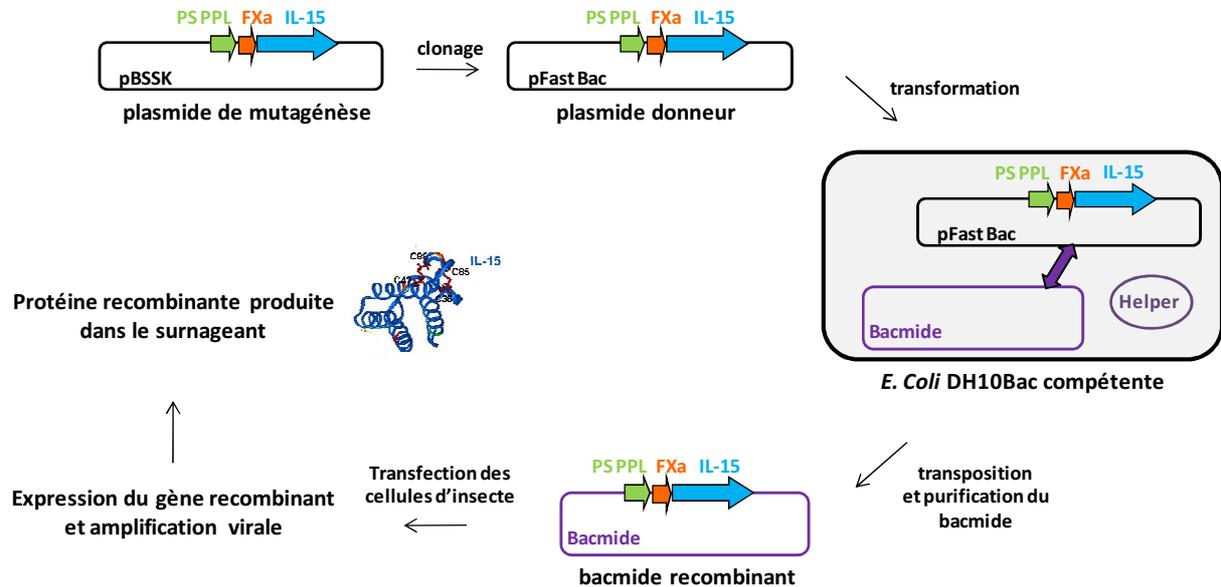


Figure 52 : Production d'une protéine recombinante en système baculovirus-cellules d'insecte

Exemple de la production d'IL-15 recombinante à partir de la séquence PS PPL-FXa-IL-15.

Purification des protéines produites en système baculovirus-Sf9

Les protéines recombinantes ont été produites dans le surnageant de production. Le surfactant contenu dans le milieu de production a été éliminé par saponification des lipides en ajoutant du NaOH 10 N jusqu'à l'obtention d'un pH de 8,5. Le surnageant a été centrifugé à 7.500 rpm pendant 15 min et filtré sur unité de filtration sous vide 0,45 μ m. Le surnageant a alors été concentré et changé de tampon pour du Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM en chambre Amicon avec une membrane de porosité égale à 5.000 Da.

Les protéines ont ensuite été purifiées sur une colonne d'affinité M2-agarose anti-FLAG (Sigma-Aldrich) et éluées avec du tampon glycine-HCl 0,1 M pH 3,5. Les protéines purifiées ont été concentrées et reprises dans du tampon PBS à l'aide de Vivaspin (Sartorius) de porosité égale à 5.000 Da. La concentration des protéines a été déterminée avec le BC Assay Kit (Uptima) utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard et par dosage ELISA utilisant les anticorps MAB247 anti-IL-15 et M2-peroxydase anti-FLAG avec pour standard la protéine FLAG-IL-15. Leur pureté a été vérifiée par électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie ou Western-Blot.

Dosage ELISA des protéines recombinantes

L'anticorps MAB247 anti-IL-15 a été fixé au fond des puits d'une plaque 96 puits à fond plat Maxisorb à une concentration de 2 µg/mL sous 100 µL de PBS pendant une nuit à 4°C. Les puits ont ensuite été saturés pendant 1 h à 37°C sous 200 µL de PBS-BSA 0,5 %. Le MAB247 immobilisé a ensuite été incubé en présence d'une gamme de concentrations croissantes de protéine FLAG-IL-15 non mutée ou en présence de différentes dilutions de protéines FLAG-IL-15 mutées pendant 1 h 30 min à 37°C sous 100 µL de PBS-Tween 20 0,01 %-BSA 0,5 %. Chaque puits a ensuite été lavé 3 fois en PBS-Tween 20 0,01 % et incubé avec 100 µL d'anticorps M2-peroxydase anti-FLAG au 1/2000^{ème} en PBS pendant 1 h à 37°C. Après trois nouveaux lavages, les puits ont été incubés pendant 30 min à température ambiante avec 100 µL d'une solution de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine et de peroxyde d'hydrogène (TMB solution, Uptima Interchim). La réaction enzymatique et la coloration ont été arrêtées par ajout de 50 µL de H₂SO₄ 1,8 M et la D. O. de chaque puits a été mesurée (450 nm moins 570 nm). Les valeurs de D. O. mesurées ont enfin été analysées par une régression non-linéaire multiparamétrique permettant de quantifier les protéines FLAG-IL-15 mutées par rapport à la gamme de concentration de FLAG-IL-15 non mutée.

Analyse de la pureté des protéines recombinantes par électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie ou Western-Blot

Des échantillons de chaque protéine recombinante ont été repris dans du bleu Laemmli ou du bleu non dénaturant, chauffés 5 min à 95°C et déposés sur des gels SDS-PAGE 12 ou 15 % ou sur des gels natifs (SDS). Après migration, les protéines ont été soit directement visibles par coloration du gel au bleu de Coomassie, soit transférées sur des membranes PVDF (*Immobilon-P PolyVinylidene DiFluoride*, Millipore). Pour l'analyse Western-Blot, les membranes ont été saturées avec du PBS-Tween 20 0,05 %-lait déshydraté 5 % pendant 1 h à température ambiante. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois en PBS-Tween 20 0,05 % et incubées avec l'anticorps M2-peroxydase anti-FLAG au 1/1000^{ème} en PBS-Tween 0,05 %-lait déshydraté 0,5 % pendant 1 h à température ambiante. Après plusieurs lavages en PBS-Tween 20 0,05 %, la visualisation des protéines spécifiques a été réalisée par un système de chimiluminescence (*BM Chemiluminescence Substrate*, Roche) selon les instructions du fournisseur. L'évaluation de la pureté des protéines a été réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant (GE Healthcare).

Prolifération cellulaire

L'activité proliférative de l'IL-15, de ses mutants et du RLI a été mesurée par l'incorporation de [³H]-thymidine par les cellules Kit225, 32Dβ ou CTLL-2. Après un lavage dans du milieu de culture et 4-24 heures de sevrage sans cytokines selon le type cellulaire, les cellules ont été réparties dans des plaques 96 puits à fond plat à raison de 10.000 cellules par puits pour 100 µL. Les cellules ont été maintenues en culture pendant 48 h en présence de concentrations croissantes en cytokines, puis incubées 16 h supplémentaires avec 0,5 µCi/puits de [³H]-thymidine (Amersham). Pour les puits témoins, les cellules ont été incubées dans les mêmes conditions mais sans cytokines. Enfin, les cellules ont été récupérées sur un filtre en fibre de verre (Wallac, Perkin Elmer) à l'aide d'un *Harvester* 96 (Tomtec Inc). Puis la radioactivité incorporée a été mesurée par un compteur β (1450

Microbeta, Wallac, Perkin Elmer) en présence de liquide de scintillation *BetaPlate Scint* (Wallac, Perkin Elmer). La radioactivité de chaque puits était représentative des divisions cellulaires effectuées durant les 16 dernières heures d'incubation avec la [³H]-thymidine. Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide des logiciels Excel et GraphPad Prism.

Radiomarquages de l'IL-15 et du RLI

L'IL-15 recombinante humaine et le RLI ont été radiomarqués par de l' [¹²⁵I]-iode selon la méthode Chloramine T (Tejedor & Ballesta, 1982). Cette technique consiste à fixer l'iode radioactive sur les noyaux aromatiques des tyrosines et histidines, principalement, par substitution des atomes d'hydrogène. Dans cette technique, l'agent oxydant (Chloramine T ou "*N-chloro-p-toluène-sulfonamide sodium salt*") n'est pas en contact direct avec la cytokine, ce qui évite sa dénaturation. Le système réactionnel est constitué de deux phases : une phase solide génératrice de chlore gazeux (Cl₂) à partir de la Chloramine T et une phase liquide contenant la cytokine et l'¹²⁵I. Ce système ainsi que la réaction d'iodation sont présentés ci-dessous (Figure 53) :

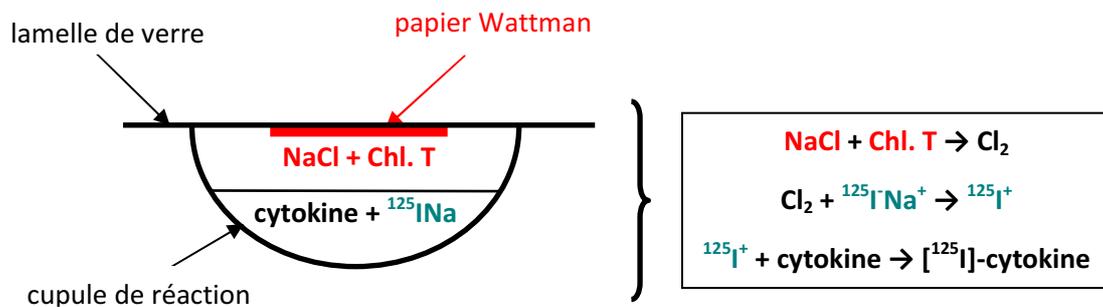


Figure 53 : Système et réaction d'iodation d'une cytokine

Une cupule en polypropylène, contenant la phase liquide de la réaction, a tout d'abord été fixée sur un support. Le volume réactionnel de 50 µL correspondait à 1 µg d'IL-15 et 0,3 mCi d'¹²⁵INa dans du tampon phosphate pH 7,4 (19,6 % KH₂PO₄ 100 mM, 80,4 % Na₂HPO₄ 100 mM), Tween 20 0,02 %. La phase solide de la réaction était constituée d'une pastille de papier Wattman de 1 cm de diamètre imbibée de NaCl 1 M, séchée à température ambiante et déposée sur une lamelle de verre. La pastille a été imbibée de 30 µL de Chloramine T dissoute extemporanément à 70 mM dans du tampon borate 25 mM pH 8,5. L'iodination de la cytokine a été initialisée en renversant la lamelle sur la cupule et en assurant l'étanchéité de la réaction par du silicone. Après 10 min à température ambiante, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 20 µL de KI 100 mM.

La séparation de l'iode libre et de la cytokine radiomarquée a ensuite été effectuée par chromatographie d'exclusion-diffusion sur une colonne *Sephadex G-25 Medium* (Amersham) dans du tampon phosphate pH 7,4. La cytokine marquée a été éluée par du tampon phosphate avant l'excès d'¹²⁵I qui n'avait pas réagi. Des fractions de 5 gouttes ont été recueillies et les fractions de plus haute radioactivité ont été réunies et conservées à 4°C.

Le rendement de l'iodation et la concentration de la cytokine radiomarquée ont été estimés par la technique de précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) : 2 µL du mélange réactionnel avant et après passage sur la colonne ont été mélangés dans 500 µL de PBS-BSA 0,5 % et 200 µL de TCA 30 %. Le mélange a été incubé 15 minutes à 4°C. Une fraction de 100 µL a été prélevée et la radioactivité totale a été mesurée par un compteur γ (1480 Automatic Gamma Counter). Le reste a été centrifugé rapidement (2 min, 12.000 tr/min), puis 100 µL de surnageant ont été prélevés et la radioactivité non précipitable a été mesurée. Ce surnageant comprenait en effet l'iode libre non fixée à l'IL-15 puisque les protéines marquées ont précipité en présence de TCA et se sont retrouvées dans le culot après centrifugation.

On a ainsi obtenu les résultats suivants :

- Radioactivité précipitable :

$$\% \text{ TCA} = 100 \times [(\text{cpm}_{\text{avant centri.}} - \text{cpm}_{\text{après centri.}}) / (\text{cpm}_{\text{avant centri.}})]$$

- Radioactivité spécifique (cpm/fmol) :

$$\text{RAS} = (\text{cpm}_{\text{avant colonne}}) \times [(\% \text{ TCA}_{\text{avant colonne}}) / (n_{\text{cytokine}})]$$

- Concentration en cytokine radiomarquée (M) :

$$C_{[^{125}\text{I}]\text{-cytokine}} = (\text{cpm}_{\text{après colonne}}) \times [(\% \text{ TCA}_{\text{après colonne}}) / (\text{RAS} \times V_f)]$$

Avec : cpm, radioactivité mesurée en coups par minute ; centri., étape de centrifugation ; colonne, étape de séparation sur colonne de chromatographie ; n_{cytokine} , quantité de cytokine en fmol ; C, concentration en cytokine (M) ; V_f , volume final en µL.

L'activité biologique de la cytokine radiomarquée a ensuite été vérifiée par dosage biologique en testant sa capacité proliférative sur la lignée Kit225, et en utilisant la cytokine non marquée comme référence. La concentration vérifiée par ce dosage a été utilisée pour le calcul de la RAS, qui présentait en moyenne une valeur de 2000 cpm/fmol pour l' [^{125}I]-IL-15 et de 4000 cpm/fmol pour l' [^{125}I]-RLI (2 aa Y pour le RLI versus 1 aa Y pour l'IL-15, cf. **Figure 54**). La cytokine radiomarquée a pu être conservée à 4°C en présence de BSA 0,05 % et est restée stable pendant 4 jours.

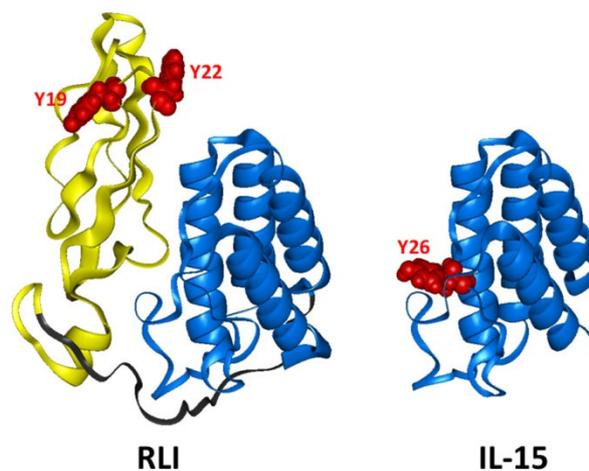


Figure 54 : Modélisation de l'IL-15 et du RLI et représentation des résidus Y accessibles pour la fixation de l'iode radioactif.

D'après Agnès Quéméner.

Etude de la liaison à l'équilibre

L'étude de la liaison à l'équilibre et la linéarisation de Scatchard permettent de déterminer le nombre de sites de fixation maximal d'une cytokine sur un type de récepteur donné et d'évaluer l'affinité de cette fixation. Les cellules Kit225 ou TF-1, à raison de 1.10^6 cellules/puits dans une plaque 96 puits à fond rond, ont été incubées en présence d'une gamme croissante de cytokine radiomarquée dans 50 μ L de PBS-BSA 0,5 % et sous agitation douce à 4°C pendant 1 heure. La liaison non spécifique a été obtenue dans les mêmes conditions en présence d'un excès de 100 fois de cytokine non radiomarquée. Les cellules ont été récupérées et déposées dans des tubes pour Scatchard (microtubes de 300 μ L en polypropylène) contenant 200 μ L d'un mélange 90 % dibutylphtalate (DBP)-10 % huile de paraffine. Après centrifugation (3 min, 12.000 rpm), les tubes ont été rapidement congelés dans de l'azote liquide et coupés au dessus du culot cellulaire. Le surnageant contenait la cytokine libre, le culot cellulaire comprenait la fraction de cytokine liée. Ensuite la radioactivité des deux fractions a été mesurée par un compteur γ . Les données obtenues ont été analysées sur les logiciels Excel et GraphPad Prism, en utilisant une régression non linéaire multiparamétrique à 1 ou 2 sites de liaison à l'équilibre. Les résultats ont pu être ensuite représentés sous la forme de linéarisation de Scatchard.

Inhibition de la liaison à l'équilibre

Les cellules Kit225 ou TF-1 ont été incubées, à raison de 1.10^6 cellules/puits dans une plaque 96 puits à fond rond, en présence d'une gamme croissante d'antagoniste (IL-15/N65K ou IL-15/L69R) et en présence d'une concentration fixe d'IL-15 radiomarquée (300 pM) dans un volume de 50 μ L de PBS-BSA 0,5%. La liaison non spécifique et la liaison spécifique ont été obtenues en absence d'antagoniste, et en présence ou non d'un excès de 100 fois d'IL-15 non marquée. Après agitation douce à 4°C pendant 1 heure, les cellules ont été récupérées, déposées dans des tubes pour Scatchard et traitées comme décrit ci-dessus pour l'étude de la liaison à l'équilibre.

Internalisation des cytokines

Les cellules Kit225 ont été équilibrées, à raison de 1.10^6 cellules/puits dans une plaque 96 puits à fond rond, en présence d'IL-15 ou de RLI radiomarqué pendant 1 h à 4°C, sous un volume de 50 μ L de PBS-BSA 0,5 %. La température a ensuite été changée pour 37°C et, à différents intervalles, deux échantillons ont été prélevés. Les échantillons ont été lavés avec 500 μ L de PBS-BSA 0,5 % froid et centrifugés 1 min à 2500 rpm. Les culots cellulaires ont ensuite été traités pendant 8 min avec 50 μ L de PBS-BSA 0,5 % froid ou 50 μ L de tampon glycine-HCl 0,2 M, pH 2,5 froid. Les cellules ont été transférées dans des tubes pour Scatchard et traitées comme décrit ci-dessus pour l'étude de la liaison à l'équilibre. La liaison totale des cytokines a été déterminée par le culot des cellules traitées avec du PBS-BSA 0,5 %. La liaison à la surface membranaire et la partie internalisée des cytokines ont été déterminées, respectivement, à partir du surnageant et du culot des cellules traitées par un pH acide. Les données obtenues ont été analysées sur les logiciels Excel et GraphPad Prism.

Analyse Western-Blot des voies de signalisation

Des cellules Kit225 en phase exponentielle de croissance ont été lavées et sevrées sans cytokines et/ou sans sérum pour réduire les phosphorylations basales des protéines de signalisation (16 h en milieu RPMI-1640-SVF 6 % sans cytokine, puis 3 h en RPMI-1640-SVF 0,5 % sans cytokine). Après stimulation des cellules avec de l'IL-15 ou du RLI selon diverses conditions à 37°C, les cellules ont été re-suspendues dans du PBS froid (pH 7,4) et les culots cellulaires ont été lysés par un tampon de lyse froid (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, glycerol 1 %, NP-40 1 %, Na₃VO₄ 20 µM, NaF 10 mM, EDTA 1 mM, Pefablock 0,4 mM, aprotinine 1 µg/mL et leupeptine 1 µg/mL). Suite à une incubation sur glace de 20 min, les échantillons ont été centrifugés (13.000 rpm, 15 min, 4°C) et les lysats ont été récupérés. La concentration en protéines totales de chaque lysat a été dosée avec le BC Assay Kit (Uptima) utilisant la BSA comme standard. Des lysats de 50 µg de protéines totales, préalablement chauffés 5 min à 95°C, ont ensuite été déposés sur des gels SDS-PAGE 10 % et Bis-Tris 4-12 % (Invitrogen). Après migration, les protéines ont été transférées sur des membranes PVDF. Ces membranes ont alors été saturées avec du PBS-Tween 20 0,05 %-lait déshydraté 5 % pendant 1 h à température ambiante. Par la suite, les membranes ont été incubées avec différents anticorps spécifiques selon les fiches techniques de chaque fournisseur. Après plusieurs lavages en PBS-Tween 20 0,05 %, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin/anti-souris conjugué à la peroxydase pendant 1 h à température ambiante. La visualisation des protéines spécifiques a alors été réalisée par un système de chimiluminescence (*BM Chemiluminescence Substrate*) selon les instructions du fournisseur. L'évaluation densitométrique des données de Western-Blot a été réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant (GE Healthcare).

Analyse de l'expression des chaînes réceptrices par cytométrie en flux

Les cellules Kit225 ont été lavées et sevrées sans cytokines pendant 24 h. Elles ont ensuite été stimulées à 37°C pendant différents temps entre 0 et 48 h en présence d'IL-15 ou de RLI à 500 pM. Les cellules ont été lavées et incubées, à raison de 0,2.10⁶ cellules/puits dans une plaque 96 puits à fond conique, avec 10 µg/mL d'AF247 anti-IL-15R α ou d'AF224-NA anti-IL-15R β ou de control isotypique sous 100 µL de PBS-BSA 0,1 %. Après trois lavages en PBS-BSA 0,1 %, les cellules ont été incubées pendant 30 min à 4°C dans le noir avec 1,25 µg/mL de F0107 anti-chèvre couplé à la phycoérythrine. Après trois nouveaux lavages, les cellules ont été re-suspendues dans 100 µL de PBS-BSA 0,1 % et analysées sur fluorocytomètre de flux (FACScan, BD Biosciences). Les résultats ont été acquis à l'aide du logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences) et ont été analysés sur le logiciel FlowJo.

RÉFÉRENCES
-
BIBLIOGRAPHIQUES -

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agostini, C., Trentin, L., Facco, M., Sancetta, R., Cerutti, A., Tassinari, C., Cimarosto, L., Adami, F., Cipriani, A., Zambello, R. & Semenzato, G. (1996) **Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis.** *J Immunol*, 157, 910-918.
- Ajjan, R.A., Watson, P.F. & Weetman, A.P. (1997) **Detection of IL-12, IL-13, and IL-15 messenger ribonucleic acid in the thyroid of patients with autoimmune thyroid disease.** *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 666-669.
- Allavena, P., Giardino, G., Bianchi, G. & Mantovani, A. (1997) **IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium.** *J Leukoc Biol*, 61, 729-735.
- Almendo, V., Fuster, G., Ametller, E., Costelli, P., Pilla, F., Busquets, S., Figueras, M., Argiles, J.M. & Lopez-Soriano, F.J. (2009) **Interleukin-15 increases calcineurin expression in 3T3-L1 cells: possible involvement on in vivo adipocyte differentiation.** *Int J Mol Med*, 24, 453-458.
- Alpdogan, O. & van den Brink, M.R. (2005) **IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency.** *Trends Immunol*, 26, 56-64.
- Amicosante, M., Poccia, F., Gioia, C., Montesano, C., Topino, S., Martini, F., Narciso, P., Pucillo, L.P. & D'Offizi, G. (2003) **Levels of interleukin-15 in plasma may predict a favorable outcome of structured treatment interruption in patients with chronic human immunodeficiency virus infection.** *J Infect Dis*, 188, 661-665.
- 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., Morris, S.W. & et al. (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., Jenkins, N.A. & et al. (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.
- Angiolillo, A.L., Kanegane, H., Sgadari, C., Reaman, G.H. & Tosato, G. (1997) **Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo.** *Biochem Biophys Res Commun*, 233, 231-237.
- Aringer, M., Stummvoll, G.H., Steiner, G., Koller, M., Steiner, C.W., Hofler, E., Hiesberger, H., Smolen, J.S. & Graninger, W.B. (2001) **Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus.** *Rheumatology (Oxford)*, 40, 876-881.
- Armitage, R.J., Macduff, B.M., Eisenman, J., Paxton, R. & Grabstein, K.H. (1995) **IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation.** *J Immunol*, 154, 483-490.
- Atedzoe, B.N., Ahmad, A. & Menezes, J. (1997) **Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction.** *J Immunol*, 159, 4966-4972.
- Avice, M.N., Demeure, C.E., Delespesse, G., Rubio, M., Armant, M. & Sarfati, M. (1998) **IL-15 promotes IL-12 production by human monocytes via T cell-dependent contact and may contribute to IL-12-mediated IFN-gamma secretion by CD4+ T cells in the absence of TCR ligation.** *J Immunol*, 161, 3408-3415.
- Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U. & Waldmann, T.A. (1998) **Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2452-2457.
- Azimi, N., Mariner, J., Jacobson, S. & Waldmann, T.A. (2000) **How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis?** *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16, 1717-1722.
- Azimi, N., Nagai, M., Jacobson, S. & Waldmann, T.A. (2001) **IL-15 plays a major role in the persistence of Tax-specific CD8 cells in HAM/TSP patients.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14559-14564.

- Baan, C.C., Knoop, C.J., van Gelder, T., Holweg, C.T., Niesters, H.G., Smeets, T.J., van der Ham, F., Zondervan, P.E., Maat, L.P., Balk, A.H. & Weimar, W. (1999) **Anti-CD25 therapy reveals the redundancy of the intragraft cytokine network after clinical heart transplantation.** *Transplantation*, 67, 870-876.
- Baan, C.C., Niesters, H.G., Metselaar, H.J., Mol, W.M., Loonen, E.H., Zondervan, P.E., Tilanus, H.W., JM, I.J., Schalm, S.W. & Weimar, W. (1998) **Increased intragraft IL-15 mRNA expression after liver transplantation.** *Clin Transplant*, 12, 212-218.
- Baan, C.C., van Gelder, T., Balk, A.H., Knoop, C.J., Holweg, C.T., Maat, L.P. & Weimar, W. (2000) **Functional responses of T cells blocked by anti-CD25 antibody therapy during cardiac rejection.** *Transplantation*, 69, 331-336.
- Badolato, R., Ponzi, A.N., Millesimo, M., Notarangelo, L.D. & Musso, T. (1997) **Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes.** *Blood*, 90, 2804-2809.
- Badoual, C., Bouchaud, G., Agueznay Nel, H., Mortier, E., Hans, S., Gey, A., Fernani, F., Peyrard, S., Puig, P.L., Bruneval, P., Sastre, X., Plet, A., Garrigue-Antar, L., Quintin-Colonna, F., Fridman, W.H., Brasnu, D., Jacques, Y. & Tartour, E. (2008) **The soluble alpha chain of interleukin-15 receptor: a proinflammatory molecule associated with tumor progression in head and neck cancer.** *Cancer Res*, 68, 3907-3914.
- Balasubramanian, S., Chernov-Rogan, T., Davis, A.M., Whitehorn, E., Tate, E., Bell, M.P., Zurawski, G. & Barrett, R.W. (1995) **Ligand binding kinetics of IL-2 and IL-15 to heteromers formed by extracellular domains of the three IL-2 receptor subunits.** *Int Immunol*, 7, 1839-1849.
- Bamford, R.N., Battiata, A.P., Burton, J.D., Sharma, H. & Waldmann, T.A. (1996) **Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2897-2902.
- Bamford, R.N., DeFilippis, A.P., Azimi, N., Kurys, G. & 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*, 160, 4418-4426.
- Bamford, R.N., Grant, A.J., Burton, J.D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E. & Waldmann, T.A. (1994) **The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4940-4944.
- Bani, L., David, D., Moreau, J.L., Cayota, A., Nakarai, T., Ritz, J. & Theze, J. (1997) **Expression of the IL-2 receptor gamma subunit in resting human CD4 T lymphocytes: mRNA is constitutively transcribed and the protein stored as an intracellular component.** *Int Immunol*, 9, 573-580.
- Barra, N.G., Reid, S., Mackenzie, R., Werstuck, G., Trigatti, B.L., Richards, C., Holloway, A.C. & Ashkar, A.A. (2009) **Interleukin-15 Contributes to the Regulation of Murine Adipose Tissue and Human Adipocytes.** *Obesity (Silver Spring)*.
- Barzegar, C., Meazza, R., Pereno, R., Pottin-Clemenceau, C., Scudeletti, M., Brouty-Boye, D., Doucet, C., Taoufik, Y., Ritz, J., Musselli, C., Mishal, Z., Jasmin, C., Indiveri, F., Ferrini, S. & Azzarone, B. (1998) **IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops.** *Oncogene*, 16, 2503-2512.
- Baslund, B., Tvede, N., Danneskiold-Samsoe, B., Larsson, P., Panayi, G., Petersen, J., Petersen, L.J., Beurskens, F.J., Schuurman, J., van de Winkel, J.G., Parren, P.W., Gracie, J.A., Jongbloed, S., Liew, F.Y. & McInnes, I.B. (2005) **Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study.** *Arthritis Rheum*, 52, 2686-2692.
- Bazan, J.F. (1990) **Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6934-6938.

- Bergamaschi, C., Jalah, R., Kulkarni, V., Rosati, M., Zhang, G.M., Alicea, C., Zolotukhin, A.S., Felber, B.K. & 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*, 183, 3064-3072.
- Bernard, J., Harb, C., Mortier, E., Quemener, A., Meloen, R.H., Vermot-Desroches, C., Wijdeness, J., van Dijken, P., Grotzinger, J., Slootstra, J.W., Plet, A. & Jacques, Y. (2004) **Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15.** *J Biol Chem*, 279, 24313-24322.
- Bessard, A., Sole, V., Bouchaud, G., Quemener, A. & 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.
- Bhadra, R., Guan, H. & Khan, I.A. (2010) **Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8 T cell response against Toxoplasma gondii.** *PLoS One*, 5, e10842.
- Bitard, J., Daburon, S., Duplomb, L., Blanchard, F., Vuisio, P., Jacques, Y., Godard, A., Heath, J.K., Moreau, J.F. & Taupin, J.L. (2003) **Mutations in the immunoglobulin-like domain of gp190, the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, increase or decrease its affinity for LIF.** *J Biol Chem*, 278, 16253-16261.
- Bluman, E.M., Bartynski, K.J., Avalos, B.R. & Caligiuri, M.A. (1996) **Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines.** *J Clin Invest*, 97, 2722-2727.
- Borger, P., Kauffman, H.F., Postma, D.S., Esselink, M.T. & Vellenga, E. (1999) **Interleukin-15 differentially enhances the expression of interferon-gamma and interleukin-4 in activated human (CD4+) T lymphocytes.** *Immunology*, 96, 207-214.
- Bosco, M.C., Espinoza-Delgado, I., Schwabe, M., Russell, S.M., Leonard, W.J., Longo, D.L. & Varesio, L. (1994) **The gamma subunit of the interleukin-2 receptor is expressed in human monocytes and modulated by interleukin-2, interferon gamma, and transforming growth factor beta 1.** *Blood*, 83, 3462-3467.
- Bouchard, A., Ratthe, C. & Girard, D. (2004) **Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8.** *J Leukoc Biol*, 75, 893-900.
- Bouchaud, G., Garrigue-Antar, L., Sole, V., Quemener, A., Boublik, Y., Mortier, E., Perdreau, H., Jacques, Y. & Plet, A. (2008) **The exon-3-encoded domain of IL-15alpha contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15Ralpha.** *J Mol Biol*, 382, 1-12.
- Bouchaud, G., Mortier, E., Flamant, M., Barbieux, I., Plet, A., Galmiche, J.P., Jacques, Y. & Bourreille, A. (2010) **Interleukin-15 and its soluble receptor mediate the response to infliximab in patients with Crohn's disease.** *Gastroenterology*, 138, 2378-2387.
- Briard, D., Brouty-Boye, D., Azzarone, B. & Jasmin, C. (2002) **Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15.** *J Immunol*, 168, 4326-4332.
- Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Ludwig, A., Rose-John, S., Saftig, P., Borden, E.C. & Bulfone-Paus, S. (2004a) **Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17).** *J Biol Chem*, 279, 40368-40375.
- Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Pohl, T., Borden, E.C., Silverman, R. & Bulfone-Paus, S. (2004b) **Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15.** *J Biol Chem*, 279, 42192-42201.
- Bulanova, E., Budagian, V., Orinska, Z., Krause, H., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. (2003) **Mast cells express novel functional IL-15 receptor alpha isoforms.** *J Immunol*, 170, 5045-5055.

- Bulanova, E., Budagian, V., Pohl, T., Krause, H., Durkop, H., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. (2001) **The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells.** *J Immunol*, 167, 6292-6302.
- Bulfone-Paus, S., Bulanova, E., Pohl, T., Budagian, V., Durkop, H., Ruckert, R., Kunzendorf, U., Paus, R. & Krause, H. (1999) **Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain.** *FASEB J*, 13, 1575-1585.
- Bulfone-Paus, S., Durkop, H., Paus, R., Krause, H., Pohl, T. & Onu, A. (1997a) **Differential regulation of human T lymphoblast functions by IL-2 and IL-15.** *Cytokine*, 9, 507-513.
- Bulfone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Ruckert, R., Krause, H. & Kunzendorf, U. (1997b) **Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo.** *Nat Med*, 3, 1124-1128.
- Burkett, P.R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Boone, D.L. & Ma, A. (2004) **Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha 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. & 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.
- Busquets, S., Figueras, M.T., Meijsing, S., Carbo, N., Quinn, L.S., Almendro, V., Argiles, J.M. & Lopez-Soriano, F.J. (2005) **Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: a direct effect.** *Int J Mol Med*, 16, 471-476.
- Cao, S., Black, J.D., Troutt, A.B. & Rustum, Y.M. (1998a) **Interleukin 15 offers selective protection from irinotecan-induced intestinal toxicity in a preclinical animal model.** *Cancer Res*, 58, 3270-3274.
- Cao, S., Troutt, A.B. & Rustum, Y.M. (1998b) **Interleukin 15 protects against toxicity and potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil alone and in combination with leucovorin in rats bearing colorectal cancer.** *Cancer Res*, 58, 1695-1699.
- Carbo, N., Lopez-Soriano, J., Costelli, P., Alvarez, B., Busquets, S., Baccino, F.M., Quinn, L.S., Lopez-Soriano, F.J. & Argiles, J.M. (2001) **Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control.** *Biochim Biophys Acta*, 1526, 17-24.
- Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H. & 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.
- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K. & Caligiuri, M.A. (1994) **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.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. & Jove, R. (1999) **Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells.** *Immunity*, 10, 105-115.
- Chae, D.W., Nosaka, Y., Strom, T.B. & Maslinski, W. (1996) **Distribution of IL-15 receptor alpha-chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression.** *J Immunol*, 157, 2813-2819.
- Cheever, M.A. (2008) **Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers.** *Immunol Rev*, 222, 357-368.
- Chehimi, J., Marshall, J.D., Salvucci, O., Frank, I., Chehimi, S., Kawecky, S., Bacheller, D., Rifat, S. & Chouaib, S. (1997) **IL-15 enhances immune functions during HIV infection.** *J Immunol*, 158, 5978-5987.
- Chichili, G.R. & Rodgers, W. (2009) **Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure.** *Cell Mol Life Sci*, 66, 2319-2328.

- Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., Kai, H., Yamagata, Y., Davis, S.J. & Ikemizu, S. (2007) **Crystal structure of the IL-15-IL-15Ralpha complex, a cytokine-receptor unit presented in trans.** *Nat Immunol*, 8, 1001-1007.
- Chisholm, G.E. & Henner, D.J. (1988) **Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene.** *J Virol*, 62, 3193-3200.
- Chu, C.L., Chen, S.S., Wu, T.S., Kuo, S.C. & Liao, N.S. (1999) **Differential effects of IL-2 and IL-15 on the death and survival of activated TCR gamma delta+ intestinal intraepithelial lymphocytes.** *J Immunol*, 162, 1896-1903.
- D'Souza, W.N. & Lefrancois, L. (2003) **IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion.** *J Immunol*, 171, 5727-5735.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M.E. (1997) **Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.** *Cell*, 91, 231-241.
- Davie, E.W., Ichinose, A. & Leytus, S.P. (1986) **Structural features of the proteins participating in blood coagulation and fibrinolysis.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 509-514.
- de Jong, J.L., Farner, N.L., Widmer, M.B., Giri, J.G. & Sondel, P.M. (1996) **Interaction of IL-15 with the shared IL-2 receptor beta and gamma c subunits. The IL-15/beta/gamma c receptor-ligand complex is less stable than the IL-2/beta/gamma c receptor-ligand complex.** *J Immunol*, 156, 1339-1348.
- de Vos, A.M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A.A. (1992) **Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex.** *Science*, 255(5042), 306-312.
- Dean, G.A., Barger, A. & Lavoy, A. (2005) **Cloning and expression of feline interleukin 15.** *Cytokine*, 29, 77-83.
- Deane, K.D., O'Donnell, C.I., Hueber, W., Majka, D.S., Lazar, A.A., Derber, L.A., Gilliland, W.R., Edison, J.D., Norris, J.M., Robinson, W.H. & Holers, V.M. (2010) **The number of elevated cytokines/chemokines in pre-clinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner.** *Arthritis Rheum*.
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A. & Schlessinger, J. (1996) **A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation.** *Nature*, 383, 547-550.
- Djeu, J.Y., Liu, J.H., Wei, S., Rui, H., Pearson, C.A., Leonard, W.J. & Blanchard, D.K. (1993) **Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2.** *J Immunol*, 150, 960-970.
- Doherty, T.M., Seder, R.A. & Sher, A. (1996) **Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages.** *J Immunol*, 156, 735-741.
- Doucet, C., Meazza, R., Pottin-Clemenceau, C., Scudeletti, M., Brouty-Boye, D., Ferrini, S., Alileche, A., Taoufik, Y., Jasmin, C., Azzarone, B. & Indiveri, F. (1997) **Role of interleukin (IL)-2 and IL-15 in the tumour progression of a melanoma cell line MELP, derived from an IL-2 progressor patient.** *Melanoma Res*, 7 Suppl 2, S7-17.
- Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raher, S., Bernard, J., Boisteau, O., Leroy, S., Minvielle, S., Godard, A. & 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. & Tagaya, Y. (2002) **IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells.** *Immunity*, 17, 537-547.
- Duitman, E.H., Orinska, Z., Bulanova, E., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. (2008) **How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha.** *Mol Cell Biol*, 28, 4851-4861.

- Dukovich, M., Wano, Y., Le thi Bich, T., Katz, P., Cullen, B.R., Kehrl, J.H. & Greene, W.C. (1987) **A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors.** *Nature*, 327, 518-522.
- Ebert, E.C. (1998) **Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes.** *Gastroenterology*, 115, 1439-1445.
- Edelbaum, D., Mohamadzadeh, M., Bergstresser, P.R., Sugamura, K. & Takashima, A. (1995) **Interleukin (IL)-15 promotes the growth of murine epidermal gamma delta T cells by a mechanism involving the beta- and gamma c-chains of the IL-2 receptor.** *J Invest Dermatol*, 105, 837-843.
- Eisenman, J., Ahdieh, M., Beers, C., Brasel, K., Kennedy, M.K., Le, T., Bonnert, T.P., Paxton, R.J. & Park, L.S. (2002) **Interleukin-15 interactions with interleukin-15 receptor complexes: characterization and species specificity.** *Cytokine*, 20, 121-129.
- Ellgaard, L. & Helenius, A. (2003) **Quality control in the endoplasmic reticulum.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-191.
- Elloso, M.M., Wallace, M., Manning, D.D. & Weidanz, W.P. (1998) **The effects of interleukin-15 on human gammadelta T cell responses to Plasmodium falciparum in vitro.** *Immunol Lett*, 64, 125-132.
- Espinoza-Delgado, I., Ortaldo, J.R., Winkler-Pickett, R., Sugamura, K., Varesio, L. & Longo, D.L. (1990) **Expression and role of p75 interleukin 2 receptor on human monocytes.** *J Exp Med*, 171, 1821-1826.
- Fehniger, T.A. & 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. & Caligiuri, M.A. (1998) **Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection.** *J Immunol*, 161, 6433-6438.
- Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F. & Caligiuri, M.A. (1999) **Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response.** *J Immunol*, 162, 4511-4520.
- Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J. & Caligiuri, M.A. (2001) **Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells.** *J Exp Med*, 193, 219-231.
- Feng, Q., Liu, Y., Qu, X., Deng, H., Ding, M., Lau, T.L., Yu, A.C. & Chen, J. (2006) **Baculovirus surface display of SARS coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models.** *DNA Cell Biol*, 25, 668-673.
- Fernandez, J.M., Hoeffler, J.P. & (eds.) (1999) **Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression.**, Academic Press, San Diego.
- 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. & Moll, T. (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*, 173, 5818-5826.
- Ferrari-Lacraz, S., Zheng, X.X., Kim, Y.S., Li, Y., Maslinski, W., Li, X.C. & Strom, T.B. (2001) **An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection.** *J Immunol*, 167, 3478-3485.
- Ferrari-Lacraz, S., Zheng, X.X., Kim, Y.S., Maslinski, W. & Strom, T.B. (2002) **Addition of an IL-15 mutant/FCgamma2A antagonist protein protects islet allografts from rejection overriding costimulation blockade.** *Transplant Proc*, 34, 745-747.

- Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G.R., Jones, C.E. & Trifilieff, A. (2003) **IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger.** *J Immunol*, 170, 2106-2112.
- Ferrone, C.R., Perales, M.A., Goldberg, S.M., Somberg, C.J., Hirschhorn-Cymerman, D., Gregor, P.D., Turk, M.J., Ramirez-Montagut, T., Gold, J.S., Houghton, A.N. & Wolchok, J.D. (2006) **Adjuvanticity of plasmid DNA encoding cytokines fused to immunoglobulin Fc domains.** *Clin Cancer Res*, 12, 5511-5519.
- Flamand, L., Stefanescu, I. & Menezes, J. (1996) **Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15.** *J Clin Invest*, 97, 1373-1381.
- Friedmann, M.C., Migone, T.S., Russell, S.M. & Leonard, W.J. (1996) **Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2077-2082.
- Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., Groner, B., Ihle, J.N., Minami, Y., Miyazaki, T. & et al. (1995) **Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for the proliferative signal transmission.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5482-5486.
- Gadina, M., Sudarshan, C. & O'Shea, J.J. (1999) **IL-2, but not IL-4 and other cytokines, induces phosphorylation of a 98-kDa protein associated with SHP-2, phosphatidylinositol 3'-kinase, and Grb2.** *J Immunol*, 162, 2081-2086.
- Gadina, M., Sudarshan, C., Visconti, R., Zhou, Y.J., Gu, H., Neel, B.G. & O'Shea, J.J. (2000) **The docking molecule gab2 is induced by lymphocyte activation and is involved in signaling by interleukin-2 and interleukin-15 but not other common gamma chain-using cytokines.** *J Biol Chem*, 275, 26959-26966.
- Gaggero, A., Azzarone, B., Andrei, C., Mishal, Z., Meazza, R., Zappia, E., Rubartelli, A. & Ferrini, S. (1999) **Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms.** *Eur J Immunol*, 29, 1265-1274.
- Gilboa, E. (1999) **How tumors escape immune destruction and what we can do about it.** *Cancer Immunol Immunother*, 48, 382-385.
- Gillies, S.D., Lan, Y., Williams, S., Carr, F., Forman, S., Raubitschek, A. & Lo, K.M. (2005) **An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma.** *Blood*, 105, 3972-3978.
- Girard, D., Boiani, N. & Beaulieu, A.D. (1998) **Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component.** *Clin Immunol Immunopathol*, 88, 232-240.
- Girard, D., Paquet, M.E., Paquin, R. & Beaulieu, A.D. (1996) **Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15.** *Blood*, 88, 3176-3184.
- Giri, J.G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L.S., Cosman, D. & 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. & 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.
- Giron-Michel, J., Caignard, A., Fogli, M., Brouty-Boye, D., Briard, D., van Dijk, M., Meazza, R., Ferrini, S., Lebousse-Kerdiles, C., Clay, D., Bompais, H., Chouaib, S., Peault, B. & Azzarone, B. (2003) **Differential STAT3, STAT5, and NF-kappaB activation in human hematopoietic progenitors by endogenous interleukin-15: implications in the expression of functional molecules.** *Blood*, 102, 109-117.

- Giron-Michel, J., Menard, F., Negrini, S., Devocelle, A., Azzarone, B. & Besson, C. (2009) **EBV-associated mononucleosis does not induce long-term global deficit in T-cell responsiveness to IL-15.** *Blood*, 113, 4541-4547.
- Goldsmith, M.A., Lai, S.Y., Xu, W., Amaral, M.C., Kuczek, E.S., Parent, L.J., Mills, G.B., Tarr, K.L., Longmore, G.D. & Greene, W.C. (1995) **Growth signal transduction by the human interleukin-2 receptor requires cytoplasmic tyrosines of the beta chain and non-tyrosine residues of the gamma c chain.** *J Biol Chem*, 270, 21729-21737.
- Gosselin, J., Tomofu, A., Gallo, R.C. & Flamand, L. (1999) **Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response.** *Blood*, 94, 4210-4219.
- Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M. & et al. (1994) **Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor.** *Science*, 264, 965-968.
- Gri, G., Chiodoni, C., Gallo, E., Stoppacciaro, A., Liew, F.Y. & Colombo, M.P. (2002) **Antitumor effect of interleukin (IL)-12 in the absence of endogenous IFN-gamma: a role for intrinsic tumor immunogenicity and IL-15.** *Cancer Res*, 62, 4390-4397.
- Gu, H., Maeda, H., Moon, J.J., Lord, J.D., Yoakim, M., Nelson, B.H. & Neel, B.G. (2000) **New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.** *Mol Cell Biol*, 20, 7109-7120.
- Haffner, N. (2004) **Exploration fonctionnelle de l'interleukine-15.** *Université de Nantes. Mémoire de fin d'étude, non publié.*
- Hanick, N.A., Rickert, M., Varani, L., Bankovich, A.J., Cochran, J.R., Kim, D.M., Surh, C.D. & Garcia, K.C. (2007) **Elucidation of the interleukin-15 binding site on its alpha receptor by NMR.** *Biochemistry*, 46, 9453-9461.
- Hanisch, U.K., Lyons, S.A., Prinz, M., Nolte, C., Weber, J.R., Kettenmann, H. & Kirchhoff, F. (1997) **Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity.** *J Biol Chem*, 272, 28853-28860.
- Hank, J.A., Gan, J., Ryu, H., Ostendorf, A., Stauder, M.C., Sternberg, A., Albertini, M., Lo, K.M., Gillies, S.D., Eickhoff, J. & Sondel, P.M. (2009) **Immunogenicity of the hu14.18-IL2 immunocytokine molecule in adults with melanoma and children with neuroblastoma.** *Clin Cancer Res*, 15, 5923-5930.
- Harada, S., Yamamura, M., Okamoto, H., Morita, Y., Kawashima, M., Aita, T. & Makino, H. (1999) **Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*, 42, 1508-1516.
- Harcourt, L.J., Holmes, A.G., Gregorevic, P., Schertzer, J.D., Stupka, N., Plant, D.R. & Lynch, G.S. (2005) **Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice.** *Am J Pathol*, 166, 1131-1141.
- Hatakeyama, M., Mori, H., Doi, T. & Taniguchi, T. (1989) **A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor beta chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization.** *Cell*, 59, 837-845.
- Hauber, H.P., Bergeron, C. & Hamid, Q. (2004) **IL-9 in allergic inflammation.** *Int Arch Allergy Immunol*, 134, 79-87.
- Hirose, K., Suzuki, H., Nishimura, H., Mitani, A., Washizu, J., Matsuguchi, T. & 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.
- Holgate, S.T. & Polosa, R. (2008) **Treatment strategies for allergy and asthma.** *Nat Rev Immunol*, 8, 218-230.
- Honda, M., Kitamura, K., Takeshita, T., Sugamura, K. & Tokunaga, T. (1990) **Identification of a soluble IL-2 receptor beta-chain from human lymphoid cell line cells.** *J Immunol*, 145, 4131-4135.

- Hoontrakoon, R., Chu, H.W., Gardai, S.J., Wenzel, S.E., McDonald, P., Fadok, V.A., Henson, P.M. & Bratton, D.L. (2002) **Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor-kappaB activation.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26, 404-412.
- Houtkamp, M.A., van Der Wal, A.C., de Boer, O.J., van Der Loos, C.M., de Boer, P.A., Moorman, A.F. & Becker, A.E. (2001) **Interleukin-15 expression in atherosclerotic plaques: an alternative pathway for T-cell activation in atherosclerosis?** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1208-1213.
- Hu, X.D., Chen, S.T., Li, J.Y., Yu, D.H., Yi, Z. & Cai, H. (2010) **An IL-15 adjuvant enhances the efficacy of a combined DNA vaccine against Brucella by increasing the CD8+ cytotoxic T cell response.** *Vaccine*, 28, 2408-2415.
- Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H. & Di Santo, J.P. (2009) **IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo.** *J Exp Med*, 206, 25-34.
- Inagaki-Ohara, K., Nishimura, H., Mitani, A. & Yoshikai, Y. (1997) **Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice.** *Eur J Immunol*, 27, 2885-2891.
- Jablonska, E., Piotrowski, L., Kiluk, M., Jablonski, J., Grabowska, Z. & Markiewicz, W. (2001) **Effect of IL-15 on the secretion of IL-1beta, IL-1Ra and sIL-1RII by PMN from cancer patients.** *Cytokine*, 16, 173-177.
- Jalah, R., Rosati, M., Kulkarni, V., Patel, V., Bergamaschi, C., Valentin, A., Zhang, G.M., Sidhu, M.K., Eldridge, J.H., Weiner, D.B., Pavlakis, G.N. & Felber, B.K. (2007) **Efficient systemic expression of bioactive IL-15 in mice upon delivery of optimized DNA expression plasmids.** *DNA Cell Biol*, 26, 827-840.
- Johnston, J.A., Bacon, C.M., Finbloom, D.S., Rees, R.C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J.R., Gupta, S., Chen, Y.Q., Giri, J.D. & et al. (1995) **Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8705-8709.
- Jonuleit, H., Wiedemann, K., Muller, G., Degwert, J., Hoppe, U., Knop, J. & Enk, A.H. (1997) **Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells.** *J Immunol*, 158, 2610-2615.
- Jullien, D., Sieling, P.A., Uyemura, K., Mar, N.D., Rea, T.H. & Modlin, R.L. (1997) **IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection.** *J Immunol*, 158, 800-806.
- Kabouridis, P.S., Magee, A.I. & Ley, S.C. (1997) **S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes.** *EMBO J*, 16, 4983-4998.
- Kaibe, M., Ohishi, M., Ito, N., Yuan, M., Takagi, T., Terai, M., Tatara, Y., Komai, N., Rakugi, H. & Ogihara, T. (2005) **Serum interleukin-15 concentration in patients with essential hypertension.** *Am J Hypertens*, 18, 1019-1025.
- Kakumu, S., Okumura, A., Ishikawa, T., Yano, M., Enomoto, A., Nishimura, H., Yoshioka, K. & Yoshika, Y. (1997) **Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease.** *Clin Exp Immunol*, 109, 458-463.
- Kanegane, H. & Tosato, G. (1996) **Activation of naive and memory T cells by interleukin-15.** *Blood*, 88, 230-235.
- Katsanis, E., Xu, Z., Panoskaltsis-Mortari, A., Weisdorf, D.J., Widmer, M.B. & Blazar, B.R. (1996) **IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice.** *Transplantation*, 62, 872-875.
- Kawai, K., Suzuki, H., Tomiyama, K., Minagawa, M., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. (1998) **Requirement of the IL-2 receptor beta chain for the development of Vgamma3 dendritic epidermal T cells.** *J Invest Dermatol*, 110, 961-965.
- Kawashima, T., Bao, Y.C., Nomura, Y., Moon, Y., Tonozuka, Y., Minoshima, Y., Hatori, T., Tsuchiya, A., Kiyono, M., Nosaka, T., Nakajima, H., Williams, D.A. & Kitamura, T. (2006) **Rac1 and a**

- GTPase-activating protein, MgcRacGAP, are required for nuclear translocation of STAT transcription factors.** *J Cell Biol*, 175, 937-946.
- Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., Brasel, K., Morrissey, P.J., Stocking, K., Schuh, J.C., Joyce, S. & Peschon, J.J. (2000) **Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice.** *J Exp Med*, 191, 771-780.
- Khan, I.A., Moretto, M., Wei, X.Q., Williams, M., Schwartzman, J.D. & Liew, F.Y. (2002) **Treatment with soluble interleukin-15 exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8+ T cell response.** *J Exp Med*, 195, 1463-1470.
- Khawam, K., Giron-Michel, J., Gu, Y., Perier, A., Giuliani, M., Caignard, A., Devocelle, A., Ferrini, S., Fabbi, M., Charpentier, B., Ludwig, A., Chouaib, S., Azzarone, B. & Eid, P. (2009) **Human renal cancer cells express a novel membrane-bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin-15 receptor alpha chain, epithelial-to-mesenchymal transition.** *Cancer Res*, 69, 1561-1569.
- Kirman, I. & Nielsen, O.H. (1996) **Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis.** *Am J Gastroenterol*, 91, 1789-1794.
- Klimiuk, P.A., Yang, H., Goronzy, J.J. & Weyand, C.M. (1999) **Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent.** *Clin Immunol*, 90, 65-78.
- Kobayashi, H., Carrasquillo, J.A., Paik, C.H., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. (2000) **Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumor targeting between interleukins 2 and 15.** *Cancer Res*, 60, 3577-3583.
- Kolibab, K., Yang, A., Derrick, S.C., Waldmann, T.A., Perera, L.P. & Morris, S.L. (2010) **Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant.** *Clin Vaccine Immunol*, 17, 793-801.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M.T., Martin, T.J. & Suda, T. (1999) **IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis.** *J Clin Invest*, 103, 1345-1352.
- Kottlil, S., Chun, T.W., Moir, S., Liu, S., McLaughlin, M., Hallahan, C.W., Maldarelli, F., Corey, L. & Fauci, A.S. (2003) **Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function.** *J Infect Dis*, 187, 1038-1045.
- Kozak, M. (1987) **At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells.** *J Mol Biol*, 196, 947-950.
- Kozak, M. (1992) **Regulation of translation in eukaryotic systems.** *Annu Rev Cell Biol*, 8, 197-225.
- Krause, H., Jandrig, B., Wernicke, C., Bulfone-Paus, S., Pohl, T. & Diamantstein, T. (1996) **Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15).** *Cytokine*, 8, 667-674.
- Kuczynski, S., Winiarska, H., Abramczyk, M., Szczawinska, K., Wierusz-Wysocka, B. & Dworacka, M. (2005) **IL-15 is elevated in serum patients with type 1 diabetes mellitus.** *Diabetes Res Clin Pract*, 69, 231-236.
- Kumaki, N., Anderson, D.M., Cosman, D. & Kumaki, S. (1996a) **Expression of interleukin-15 and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells.** *Curr Eye Res*, 15, 876-882.
- Kumaki, S., Armitage, R., Ahdieh, M., Park, L. & Cosman, D. (1996b) **Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells.** *Eur J Immunol*, 26, 1235-1239.
- Kumaki, S., Ochs, H.D., Timour, M., Schooley, K., Ahdieh, M., Hill, H., Sugamura, K., Anderson, D., Zhu, Q., Cosman, D. & et al. (1995) **Characterization of B-cell lines established from two X-linked severe combined immunodeficiency patients: interleukin-15 binds to the B cells but is not internalized efficiently.** *Blood*, 86, 1428-1436.

- Kuniyoshi, J.S., Kuniyoshi, C.J., Lim, A.M., Wang, F.Y., Bade, E.R., Lau, R., Thomas, E.K. & Weber, J.S. (1999) **Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells.** *Cell Immunol*, 193, 48-58.
- Kurowska, M., Rudnicka, W., Maslinska, D. & Maslinski, W. (2002) **Expression of IL-15 and IL-15 receptor isoforms in select structures of human fetal brain.** *Ann N Y Acad Sci*, 966, 441-445.
- Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Kuster, A., Dahmen, H., Tacke, I., Heinrich, P.C. & Muller-Newen, G. (2000) **Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130.** *J Immunol*, 164, 273-282.
- Kurys, G., Tagaya, Y., Bamford, R., Hanover, J.A. & Waldmann, T.A. (2000) **The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15.** *J Biol Chem*, 275, 30653-30659.
- LaPorte, S.L., Juo, Z.S., Vaclavikova, J., Colf, L.A., Qi, X., Heller, N.M., Keegan, A.D. & Garcia, K.C. (2008) **Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system.** *Cell*, 132, 259-272.
- Lauw, F.N., Simpson, A.J., Prins, J.M., Smith, M.D., Kurimoto, M., van Deventer, S.J., Speelman, P., Chaowagul, W., White, N.J. & van der Poll, T. (1999) **Elevated plasma concentrations of interferon (IFN)-gamma and the IFN-gamma-inducing cytokines interleukin (IL)-18, IL-12, and IL-15 in severe melioidosis.** *J Infect Dis*, 180, 1878-1885.
- Layton, J.E., Hall, N.E., Connell, F., Venhorst, J. & Treutlein, H.R. (2001) **Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor.** *J Biol Chem.*, 276(39);, 36779-36787.
- Leclercq, G., Debacker, V., de Smedt, M. & Plum, J. (1996) **Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells.** *J Exp Med*, 184, 325-336.
- Lee, Y.B., Satoh, J., Walker, D.G. & Kim, S.U. (1996) **Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture.** *Neuroreport*, 7, 1062-1066.
- Lenardo, M.J. (1991) **Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis.** *Nature*, 353, 858-861.
- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J. (1998) **Jaks and STATs: biological implications.** *Annu Rev Immunol*, 16, 293-322.
- Lim, C.P. & Cao, X. (2006) **Structure, function, and regulation of STAT proteins.** *Mol Biosyst*, 2, 536-550.
- Lin, J.X. & Leonard, W.J. (1997) **Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus.** *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 313-332.
- Lin, S.J., Roberts, R.L., Ank, B.J., Nguyen, Q.H., Thomas, E.K. & Stiehm, E.R. (1998) **Effect of interleukin (IL)-12 and IL-15 on activated natural killer (ANK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in HIV infection.** *J Clin Immunol*, 18, 335-345.
- Liu, J.H., Wei, S., Ussery, D., Epling-Burnette, P.K., Leonard, W.J. & Djeu, J.Y. (1994) **Expression of interleukin-2 receptor gamma chain on human neutrophils.** *Blood*, 84, 3870-3875.
- Liu, Z., Geboes, K., Colpaert, S., D'Haens, G.R., Rutgeerts, P. & Ceuppens, J.L. (2000) **IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production.** *J Immunol*, 164, 3608-3615.
- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S. & Ma, A. (1998) **IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation.** *Immunity*, 9, 669-676.
- Maeda, M., Arima, N., Daitoku, Y., Kashihara, M., Okamoto, H., Uchiyama, T., Shirono, K., Matsuoka, M., Hattori, T., Takatsuki, K. & et al. (1987) **Evidence for the interleukin-2 dependent expansion of leukemic cells in adult T cell leukemia.** *Blood*, 70, 1407-1411.

- Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannere, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J.J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E.A., Brousse, N., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N. & Meresse, B. (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.
- Mariner, J.M., Lantz, V., Waldmann, T.A. & Azimi, N. (2001) **Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site.** *J Immunol*, 166, 2602-2609.
- Mariner, J.M., Mamane, Y., Hiscott, J., Waldmann, T.A. & Azimi, N. (2002) **IFN regulatory factor 4 participates in the human T cell lymphotropic virus type I-mediated activation of the IL-15 receptor alpha promoter.** *J Immunol*, 168, 5667-5674.
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J.M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. (2000) **IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11445-11450.
- Marmor, M.D. & Julius, M. (2001) **Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling.** *Blood*, 98, 1489-1497.
- Marzetti, E., Carter, C.S., Wohlgemuth, S.E., Lees, H.A., Giovannini, S., Anderson, B., Quinn, L.S. & Leeuwenburgh, C. (2009) **Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction.** *Mech Ageing Dev*, 130, 272-280.
- Mastroianni, C.M., d'Ettorre, G., Forcina, G. & Vullo, V. (2004) **Teaching tired T cells to fight HIV: time to test IL-15 for immunotherapy?** *Trends Immunol*, 25, 121-125.
- Masuda, A., Matsuguchi, T., Yamaki, K., Hayakawa, T., Kubo, M., LaRoche, W.J. & Yoshikai, Y. (2000) **Interleukin-15 induces rapid tyrosine phosphorylation of STAT6 and the expression of interleukin-4 in mouse mast cells.** *J Biol Chem*, 275, 29331-29337.
- Masuda, A., Matsuguchi, T., Yamaki, K., Hayakawa, T. & Yoshikai, Y. (2001) **Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression.** *J Biol Chem*, 276, 26107-26113.
- Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F. & 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*, 167, 1179-1187.
- McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S. & 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. & Liew, F.Y. (1996) **The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis.** *Nat Med*, 2, 175-182.
- McInnes, I.B., Leung, B.P., Sturrock, R.D., Field, M. & Liew, F.Y. (1997) **Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis.** *Nat Med*, 3, 189-195.
- McKay, D.B. (1992) **Response.** *Science*, 257, 412-413.
- Meazza, R., Gaggero, A., Neglia, F., Basso, S., Sforzini, S., Pereno, R., Azzarone, B. & Ferrini, S. (1997) **Expression of two interleukin-15 mRNA isoforms in human tumors does not correlate with secretion: role of different signal peptides.** *Eur J Immunol*, 27, 1049-1054.
- Meazza, R., Verdiani, S., Biassoni, R., Coppolecchia, M., Gaggero, A., Orengo, A.M., Colombo, M.P., Azzarone, B. & 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.
- Meissner, U., Blum, H., Schnare, M., Rollinghoff, M. & Gessner, A. (2001) **A soluble form of the murine common gamma chain is present at high concentrations in vivo and suppresses cytokine signaling.** *Blood*, 97, 183-191.

- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. & Sommer, T. (2005) **ERAD: the long road to destruction.** *Nat Cell Biol*, 7, 766-772.
- Mingari, M.C., Ponte, M., Bertone, S., Schiavetti, F., Vitale, C., Bellomo, R., Moretta, A. & Moretta, L. (1998) **HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1172-1177.
- Miyazaki, T., Maruyama, M., Yamada, G., Hatakeyama, M. & Taniguchi, T. (1991) **The integrity of the conserved 'WS motif' common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction.** *EMBO J*, 10, 3191-3197.
- Miyazaki, T., Takaoka, A., Nogueira, L., Dikic, I., Fujii, H., Tsujino, S., Mitani, Y., Maeda, M., Schlessinger, J. & Taniguchi, T. (1998) **Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-coupled Jak signaling pathway.** *Genes Dev*, 12, 770-775.
- Mody, C.H., Spurrell, J.C. & Wood, C.J. (1998) **Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes.** *J Infect Dis*, 178, 803-814.
- Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A.K. & Banchereau, J. (2001) **Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells.** *J Exp Med*, 194, 1013-1020.
- Mohamadzadeh, M., Takashima, A., Dougherty, I., Knop, J., Bergstresser, P.R. & Cruz, P.D., Jr. (1995) **Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin.** *J Immunol*, 155, 4492-4496.
- Monsma, S.A., Oomens, A.G. & Blissard, G.W. (1996) **The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection.** *J Virol*, 70, 4607-4616.
- Mortier, E., Advincula, R., Kim, L., Chmura, S., Barrera, J., Reizis, B., Malynn, B.A. & Ma, A. (2009) **Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets.** *Immunity*, 31, 811-822.
- 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, 1681-1688.
- Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grotzinger, J., Plet, A. & 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. & 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.
- Mottonen, M., Isomaki, P., Luukkainen, R., Toivanen, P., Punnonen, J. & Lassila, O. (2000) **Interleukin-15 up-regulates the expression of CD154 on synovial fluid T cells.** *Immunology*, 100, 238-244.
- Mrozek, E., Anderson, P. & 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., Bojczuk, P.M., Halstead, E.S., Kim, A.H., Witek, J., Altman, J.D. & Katsikis, P.D. (2003) **IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells.** *Blood*, 101, 1024-1029.
- Murray, A.M., Simm, B. & Beagley, K.W. (1998) **Cytokine gene expression in murine fetal intestine: potential for extrathymic T cell development.** *Cytokine*, 10, 337-345.
- Musso, T., Calosso, L., Zucca, M., Millesimo, M., Ravarino, D., Giovarelli, M., Malavasi, F., Ponzi, A.N., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. (1999) **Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15.** *Blood*, 93, 3531-3539.

- Nakamura, R., Maeda, N., Shibata, K., Yamada, H., Kase, T. & Yoshikai, Y. (2010) **Interleukin-15 is critical in the pathogenesis of influenza a virus-induced acute lung injury.** *J Virol*, 84, 5574-5582.
- Naora, H. & Gougeon, M.L. (1999) **Enhanced survival and potent expansion of the natural killer cell population of HIV-infected individuals by exogenous interleukin-15.** *Immunol Lett*, 68, 359-367.
- Neely, G.G., Epelman, S., Ma, L.L., Colarusso, P., Howlett, C.J., Amankwah, E.K., McIntyre, A.C., Robbins, S.M. & Mody, C.H. (2004) **Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling.** *J Immunol*, 172, 4225-4234.
- Neely, G.G., Robbins, S.M., Amankwah, E.K., Epelman, S., Wong, H., Spurrell, J.C., Jandu, K.K., Zhu, W., Fogg, D.K., Brown, C.B. & Mody, C.H. (2001) **Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis.** *J Immunol*, 167, 5011-5017.
- Nguyen, S.T., Hasegawa, S., Tsuda, H., Tomioka, H., Ushijima, M., Noda, M., Omura, K. & Miki, Y. (2007) **Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma.** *Cancer Sci*, 98, 740-746.
- Nieto, M., del Pozo, M.A. & Sanchez-Madrid, F. (1996) **Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes.** *Eur J Immunol*, 26, 1302-1307.
- Nishimura, H., Fujimoto, A., Tamura, N., Yajima, T., Wajjwalku, W. & Yoshikai, Y. (2005) **A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing.** *FASEB J*, 19, 19-28.
- Nishimura, H., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Grabstein, K.H., Paxton, R., Sugamura, K., Bluestone, J.A. & Yoshikai, Y. (1996) **IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection.** *J Immunol*, 156, 663-669.
- Nishimura, H., Yajima, T., Naiki, Y., Tsunobuchi, H., Umemura, M., Itano, K., Matsuguchi, T., Suzuki, M., Ohashi, P.S. & Yoshikai, Y. (2000) **Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo.** *J Exp Med*, 191, 157-170.
- Nishiyama, R., Sakaguchi, T., Kinugasa, T., Gu, X., MacDermott, R.P., Podolsky, D.K. & Reinecker, H.C. (2001) **Interleukin-2 receptor beta subunit-dependent and -independent regulation of intestinal epithelial tight junctions.** *J Biol Chem*, 276, 35571-35580.
- Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W. & Leonard, W.J. (1993) **Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans.** *Cell*, 73, 147-157.
- O'Hare, K., Benoist, C. & Breathnach, R. (1981) **Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 1527-1531.
- Obermeier, F., Hausmann, M., Kellermeier, S., Kiessling, S., Strauch, U.G., Duitman, E., Bulfone-Paus, S., Herfarth, H., Bock, J., Dunger, N., Stoeck, M., Scholmerich, J., Falk, W. & Rogler, G. (2006) **IL-15 protects intestinal epithelial cells.** *Eur J Immunol*, 36, 2691-2699.
- Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T.A., Taniguchi, T. & 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. & Kohashi, O. (1999) **A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2.** *J Immunol*, 162, 2754-2760.
- Ohkawa, T., Seki, S., Dobashi, H., Koike, Y., Habu, Y., Ami, K., Hiraide, H. & Sekine, I. (2001) **Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells.** *Immunology*, 103, 281-290.

- Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M.N., Kinoshita, N., Jang, M.H., Mashimo, T., Miyazaki, J. & Kiyono, H. (2002) **IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta+ NK1.1+ T cells for the development of small intestinal inflammation.** *J Immunol*, 169, 460-468.
- Ohteki, T., Ho, S., Suzuki, H., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. (1997) **Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development.** *J Immunol*, 159, 5931-5935.
- Ohteki, T., Suzue, K., Maki, C., Ota, T. & Koyasu, S. (2001) **Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response.** *Nat Immunol*, 2, 1138-1143.
- Ohteki, T., Yoshida, H., Matsuyama, T., Duncan, G.S., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. (1998) **The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells.** *J Exp Med*, 187, 967-972.
- Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B. (2003) **PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation.** *Nat Rev Immunol*, 3, 317-330.
- Olsen, S.K., Ota, N., Kishishita, S., Kukimoto-Niino, M., Murayama, K., Uchiyama, H., Toyama, M., Terada, T., Shirouzu, M., Kanagawa, O. & Yokoyama, S. (2007) **Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation.** *J Biol Chem*, 282, 37191-37204.
- Onu, A., Pohl, T., Krause, H. & Bulfone-Paus, S. (1997) **Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms.** *J Immunol*, 158, 255-262.
- Orengo, A.M., Di Carlo, E., Comes, A., Fabbi, M., Piazza, T., Cilli, M., Musiani, P. & Ferrini, S. (2003) **Tumor cells engineered with IL-12 and IL-15 genes induce protective antibody responses in nude mice.** *J Immunol*, 171, 569-575.
- Pashenkov, M., Mustafa, M., Kivisakk, P. & Link, H. (1999) **Levels of interleukin-15-expressing blood mononuclear cells are elevated in multiple sclerosis.** *Scand J Immunol*, 50, 302-308.
- Pavlakis, M., Strehlau, J., Lipman, M., Shapiro, M., Maslinski, W. & Strom, T.B. (1996) **Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection.** *Transplantation*, 62, 543-545.
- PCT/EP2005/002367, B.
- Pelletier, M., Ratthe, C. & Girard, D. (2002) **Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2.** *FEBS Lett*, 532, 164-170.
- Pereno, R., Giron-Michel, J., Gaggero, A., Cazes, E., Meazza, R., Monetti, M., Monaco, E., Mishal, Z., Jasmin, C., Indiveri, F., Ferrini, S. & Azzarone, B. (2000) **IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha.** *Oncogene*, 19, 5153-5162.
- Perera, L.P., Goldman, C.K. & Waldmann, T.A. (1999) **IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes.** *J Immunol*, 162, 2606-2612.
- Perkins, S.J., Haris, P.I., Sim, R.B. & Chapman, D. (1988) **A study of the structure of human complement component factor H by Fourier transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods.** *Biochemistry*, 27, 4004-4012.
- Pillet, A.H., Bugault, F., Theze, J., Chakrabarti, L.A. & Rose, T. (2009) **A programmed switch from IL-15- to IL-2-dependent activation in human NK cells.** *J Immunol*, 182, 6267-6277.
- Pirtskhalaishvili, G., Shurin, G.V., Esche, C., Cai, Q., Salup, R.R., Bykovskaia, S.N., Lotze, M.T. & Shurin, M.R. (2000) **Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins.** *Br J Cancer*, 83, 506-513.

- Quemener, A., Bernard, J., Mortier, E., Plet, A., Jacques, Y. & Tran, V. (2006) **Docking of human interleukin-15 to its specific receptor alpha chain: correlation between molecular modeling and mutagenesis experimental data.** *Proteins*, 65, 623-636.
- Quinn, L.S., Anderson, B.G., Drivdahl, R.H., Alvarez, B. & Argiles, J.M. (2002) **Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders.** *Exp Cell Res*, 280, 55-63.
- Quinn, L.S., Anderson, B.G., Strait-Bodey, L. & Wolden-Hanson, T. (2010) **Serum and muscle interleukin-15 levels decrease in aging mice: correlation with declines in soluble interleukin-15 receptor alpha expression.** *Exp Gerontol*, 45, 106-112.
- Quinn, L.S., Haugk, K.L. & Damon, S.E. (1997) **Interleukin-15 stimulates C2 skeletal myoblast differentiation.** *Biochem Biophys Res Commun*, 239, 6-10.
- Quinn, L.S., Haugk, K.L. & Grabstein, K.H. (1995) **Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle.** *Endocrinology*, 136, 3669-3672.
- Quinn, L.S., Strait-Bodey, L., Anderson, B.G., Argiles, J.M. & Havel, P.J. (2005) **Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway.** *Cell Biol Int*, 29, 449-457.
- Ravichandran, K.S. & Burakoff, S.J. (1994) **The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation.** *J Biol Chem*, 269, 1599-1602.
- Reif, K., Burgering, B.M. & Cantrell, D.A. (1997) **Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase.** *J Biol Chem*, 272, 14426-14433.
- Reinecker, H.C., MacDermott, R.P., Mirau, S., Dignass, A. & Podolsky, D.K. (1996) **Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15.** *Gastroenterology*, 111, 1706-1713.
- Ribas, A., Kirkwood, J.M., Atkins, M.B., Whiteside, T.L., Gooding, W., Kovar, A., Gillies, S.D., Kashala, O. & Morse, M.A. (2009) **Phase I/II open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma.** *J Transl Med*, 7, 68.
- Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M.J., Goriatcheva, N. & Garcia, K.C. (2005) **The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor.** *Science*, 308, 1477-1480.
- Rochman, Y., Spolski, R. & Leonard, W.J. (2009) **New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines.** *Nat Rev Immunol*, 9, 480-490.
- Rodgers, W., Crise, B. & Rose, J.K. (1994) **Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction.** *Mol Cell Biol*, 14, 5384-5391.
- Romashkova, J.A. & Makarov, S.S. (1999) **NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling.** *Nature*, 401, 86-90.
- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G. & Jones, S.A. (2006) **Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer.** *J Leukoc Biol*, 80, 227-236.
- Rose, T., Lambotte, O., Pallier, C., Delfraissy, J.F. & Colle, J.H. (2009) **Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients.** *J Immunol*, 182, 7389-7397.
- Rose, T., Pillet, A.H., Lavergne, V., Tamarit, B., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Namane, A. & Theze, J. (2010) **Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response.** *J Biol Chem*, 285, 14898-14908.
- Rubinstein, M.P., Kovar, M., Purton, J.F., Cho, J.H., Boyman, O., Surh, C.D. & 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. & 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*, 160, 5654-5660.
- Ruckert, R., Asadullah, K., Seifert, M., Budagian, V.M., Arnold, R., Trombotto, C., Paus, R. & Bulfone-Paus, S. (2000) **Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis?** *J Immunol*, 165, 2240-2250.
- Ruckert, R., Brandt, K., Braun, A., Hoymann, H.G., Herz, U., Budagian, V., Durkop, H., Renz, H. & Bulfone-Paus, S. (2005) **Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo.** *J Immunol*, 174, 5507-5515.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. (2008) **Regulatory T cells and immune tolerance.** *Cell*, 133, 775-787.
- Sakai, T., Kusugami, K., Nishimura, H., Ando, T., Yamaguchi, T., Ohsuga, M., Ina, K., Enomoto, A., Kimura, Y. & Yoshikai, Y. (1998) **Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology*, 114, 1237-1243.
- Sancho, D., Yanez-Mo, M., Tejedor, R. & Sanchez-Madrid, F. (1999) **Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15.** *Blood*, 93, 886-896.
- Sato, N., Patel, H.J., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. (2007) **The IL-15/IL-15Ralpha 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.
- Sauve, K., Nachman, M., Spence, C., Bailon, P., Campbell, E., Tsien, W.H., Kondas, J.A., Hakimi, J. & Ju, G. (1991) **Localization in human interleukin 2 of the binding site to the alpha chain (p55) of the interleukin 2 receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4636-4640.
- Scheller, J., Ohnesorge, N. & Rose-John, S. (2006) **Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer.** *Scand J Immunol*, 63, 321-329.
- Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C. & Lefrancois, L. (2000) **Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo.** *Nat Immunol*, 1, 426-432.
- Schluns, K.S., Stoklasek, T. & Lefrancois, L. (2005) **The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both?** *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 1567-1571.
- Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B.K. & Pavlakis, G.N. (1997) **Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation.** *J Virol*, 71, 4892-4903.
- Seigel, L.J., Harper, M.E., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Nash, W.G. & O'Brien, S.J. (1984) **Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1.** *Science*, 223, 175-178.
- Seike, M., Yanaihara, N., Bowman, E.D., Zanetti, K.A., Budhu, A., Kumamoto, K., Mechanic, L.E., Matsumoto, S., Yokota, J., Shibata, T., Sugimura, H., Gemma, A., Kudoh, S., Wang, X.W. & Harris, C.C. (2007) **Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier.** *J Natl Cancer Inst*, 99, 1257-1269.
- Shinozaki, M., Hirahashi, J., Lebedeva, T., Liew, F.Y., Salant, D.J., Maron, R. & 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.
- Sieburth, D., Jabs, E.W., Warrington, J.A., Li, X., Lasota, J., LaForgia, S., Kelleher, K., Huebner, K., Wasmuth, J.J. & Wolf, S.F. (1992) **Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5.** *Genomics*, 14, 59-62.
- Silva, M.A., Menezes, J., Deslandres, C. & Seidman, E.G. (2005) **Anti-inflammatory role of interleukin-15 in Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis*, 11, 219-230.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000) **Lipid rafts and signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 31-39.

- Smith, X.G., Bolton, E.M., Ruchatz, H., Wei, X., Liew, F.Y. & Bradley, J.A. (2000) **Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival.** *J Immunol*, 165, 3444-3450.
- Spolski, R. & Leonard, W.J. (2008) **Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity.** *Annu Rev Immunol.*, 26, 57-79.
- Stoklasek, T.A., Schluns, K.S. & Lefrancois, L. (2006) **Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo.** *J Immunol*, 177, 6072-6080.
- Stonier, S.W. & Schluns, K.S. (2010) **Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses.** *Immunol Lett*, 127, 85-92.
- Strengell, M., Matikainen, S., Siren, J., Lehtonen, A., Foster, D., Julkunen, I. & Sareneva, T. (2003) **IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells.** *J Immunol*, 170, 5464-5469.
- Subtil, A., Rocca, A. & Dautry-Varsat, A. (1998) **Molecular characterization of the signal responsible for the targeting of the interleukin 2 receptor beta chain toward intracellular degradation.** *J Biol Chem*, 273, 29424-29429.
- Sugiura, T., Harigai, M., Kawaguchi, Y., Takagi, K., Fukasawa, C., Ohsako-Higami, S., Ohta, S., Tanaka, M., Hara, M. & Kamatani, N. (2002) **Increased IL-15 production of muscle cells in polymyositis and dermatomyositis.** *Int Immunol*, 14, 917-924.
- Tagaya, Y., Burton, J.D., Miyamoto, Y. & Waldmann, T.A. (1996) **Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells.** *EMBO J*, 15, 4928-4939.
- Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T.A., Losi, J.M., Azimi, N., Hanover, J.A., Bamford, R.N. & Waldmann, T.A. (1997) **Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 14444-14449.
- Takano, M., Nishimura, H., Kimura, Y., Mokuno, Y., Washizu, J., Itoharu, S., Nimura, Y. & Yoshikai, Y. (1998) **Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in Escherichia coli infection in mice.** *Infect Immun*, 66, 3270-3278.
- Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T. & Akira, S. (1998) **Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice.** *J Immunol*, 161, 4652-4660.
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M. & Sugamura, K. (1992) **Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor.** *Science*, 257, 379-382.
- Tejedor, F. & Ballesta, J.P. (1982) **Iodination of biological samples without loss of functional activity.** *Anal Biochem*, 127, 143-149.
- Tejman-Yarden, N., Zlotnik, M., Lewis, E., Etzion, O., Chaimovitz, C. & Douvdevani, A. (2005) **Renal cells express a functional interleukin-15 receptor.** *Nephrol Dial Transplant*, 20, 516-523.
- Theze, J., Alzari, P.M. & Bertoglio, J. (1996) **Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions.** *Immunol Today*, 17, 481-486.
- Timmermann, A., Kuster, A., Kurth, I., Heinrich, P.C. & Muller-Newen, G. (2002) **A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor.** *Eur J Biochem*, 269, 2716-2726.
- Tokiwa, G., Dikic, I., Lev, S. & Schlessinger, J. (1996) **Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway.** *Science*, 273, 792-794.
- Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R.A. (2003) **The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses.** *Immunity*, 19, 641-644.

- Tsудо, M., Kozak, R.W., Goldman, C.K. & Waldmann, T.A. (1986) **Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 9694-9698.
- Ullrich, E., Bonmort, M., Mignot, G., Jacobs, B., Bosisio, D., Sozzani, S., Jalil, A., Louache, F., Bulanova, E., Geissman, F., Ryffel, B., Chapat, N., Bulfone-Paus, S. & Zitvogel, L. (2008) **Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions.** *J Immunol*, 180, 7887-7897.
- Umemura, M., Nishimura, H., Hirose, K., Matsuguchi, T. & Yoshikai, Y. (2001) **Overexpression of IL-15 in vivo enhances protection against Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection via augmentation of NK and T cytotoxic 1 responses.** *J Immunol*, 167, 946-956.
- Vamosi, G., Bodnar, A., Vereb, G., Jenei, A., Goldman, C.K., Langowski, J., Toth, K., Matyus, L., Szollosi, J., Waldmann, T.A. & Damjanovich, S. (2004) **IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11082-11087.
- Vazquez, N., Walsh, T.J., Friedman, D., Chanock, S.J. & 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., Dagnaes-Hansen, F., Skov, L., Rygaard, J., Voorhorst-Ogink, M.M., Gerritsen, A.F., van Dijk, M.A., Parren, P.W., Baadsgaard, O. & van de Winkel, J.G. (2003) **Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model.** *J Clin Invest*, 112, 1571-1580.
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E. & Murray, R. (1995) **Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine.** *J Exp Med*, 181, 1519-1526.
- Waldmann, T.A. (2004) **Targeting the interleukin-15/interleukin-15 receptor system in inflammatory autoimmune diseases.** *Arthritis Res Ther*, 6, 174-177.
- Wang, X., Lupardus, P., Laporte, S.L. & Garcia, K.C. (2009) **Structural biology of shared cytokine receptors.** *Annu Rev Immunol*, 27, 29-60.
- Wang, X., Rickert, M. & Garcia, K.C. (2005) **Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors.** *Science*, 310, 1159-1163.
- Ward, A., Anderson, M., Craggs, R.I., Maltby, J., Grahames, C., Davies, R.A., Finch, D., Pattison, D., Oakes, H. & Mallinder, P.R. (2009) **E. coli expression and purification of human and cynomolgus IL-15.** *Protein Expr Purif*, 68, 42-48.
- Washizu, J., Nishimura, H., Nakamura, N., Nimura, Y. & Yoshikai, Y. (1998) **The NF-kappaB binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene.** *Immunogenetics*, 48, 1-7.
- Wei, X., Orchardson, M., Gracie, J.A., Leung, B.P., Gao, B., Guan, H., Niedbala, W., Paterson, G.K., McInnes, I.B. & 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*, 167, 277-282.
- Weiler, M., Kachko, L., Chaimovitz, C., Van Kooten, C. & Douvdevani, A. (2001) **CD40 ligation enhances IL-15 production by tubular epithelial cells.** *J Am Soc Nephrol*, 12, 80-87.
- Wilkinson, P.C. & Liew, F.Y. (1995) **Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15.** *J Exp Med*, 181, 1255-1259.
- Williams, N.S., Moore, T.A., Schatzle, J.D., Puzanov, I.J., Sivakumar, P.V., Zlotnik, A., Bennett, M. & Kumar, V. (1997) **Generation of lytic natural killer 1.1+, Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates.** *J Exp Med*, 186, 1609-1614.
- Wittnebel, S., Da Rocha, S., Giron-Michel, J., Jalil, A., Opolon, P., Escudier, B., Validire, P., Khawam, K., Chouaib, S., Azzarone, B. & Caignard, A. (2007) **Membrane-bound interleukin (IL)-15 on**

- renal tumor cells rescues natural killer cells from IL-2 starvation-induced apoptosis. *Cancer Res*, 67, 5594-5599.
- Wu, C., Warriar, R.R., Wang, X., Presky, D.H. & Gately, M.K. (1997) Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol*, 27, 147-154.
- Wu, X., Pan, W., Stone, K.P., Zhang, Y., Hsuchou, H. & Kastin, A.J. (2010) Expression and signaling of novel IL15Ralpha splicing variants in cerebral endothelial cells of the blood-brain barrier. *J Neurochem*.
- Wu, Z., Xue, H.H., Bernard, J., Zeng, R., Issakov, D., Bollenbacher-Reilley, J., Belyakov, I.M., Oh, S., Berzofsky, J.A. & Leonard, W.J. (2008) The IL-15 receptor {alpha} chain cytoplasmic domain is critical for normal IL-15Ralpha function but is not required for trans-presentation. *Blood*, 112, 4411-4419.
- Wuttge, D.M., Eriksson, P., Sirsjo, A., Hansson, G.K. & Stemme, S. (2001) Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 159, 417-423.
- Wymann, M.P., Pirola, L., Katanaev, V.L. & Bulgarelli-Leva, G. (1999) Phosphoinositide 3-kinase signalling: no lipids. *Biochem Soc Trans*, 27, 629-634.
- Xiong, C., Hixson, P.M., Mendoza, L.H. & Smith, C.W. (2005) Cloning and expression of rabbit interleukin-15. *Vet Immunol Immunopathol*, 107, 131-141.
- Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Yamamura, K., Watase, T., Busch, D.H., Pamer, E.G., Kuwano, H. & Yoshikai, Y. (2001) Memory phenotype CD8(+) T cells in IL-15 transgenic mice are involved in early protection against a primary infection with *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol*, 31, 757-766.
- Yamada, Y., Sugawara, K., Hata, T., Tsuruta, K., Moriuchi, R., Maeda, T., Atogami, S., Murata, K., Fujimoto, K., Kohno, T., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., Hirakata, Y. & Kamihira, S. (1998) Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL) cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells. *Blood*, 91, 4265-4272.
- Yang, L., Thornton, S. & Grom, A.A. (2002) Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum*, 46, 3010-3014.
- Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1993) Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J*, 12, 1705-1712.
- Yin, H.L. & Janmey, P.A. (2003) Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol*, 65, 761-789.
- Yodoi, J., Tagaya, Y., Okada, M., Taniguchi, Y., Hirata, M., Naramura, M. & Maeda, M. (1987) Interleukin-2 receptor-inducing factor(s) in adult T cell leukemia. *Acta Haematol*, 78 Suppl 1, 56-63.
- Yu, H., Fehniger, T.A., Fuchshuber, P., Thiel, K.S., Vivier, E., Carson, W.E. & Caligiuri, M.A. (1998) Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood*, 92, 3647-3657.
- Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. & Yoshikai, Y. (2006) MyD88-dependent signaling for IL-15 production plays an important role in maintenance of CD8 alpha alpha TCR alpha beta and TCR gamma delta intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol*, 176, 6180-6185.
- Yu, Y.L., Wei, C.W., Chen, Y.L., Chen, M.H. & Yiang, G.T. (2010) Immunotherapy of breast cancer by single delivery with rAAV2-mediated interleukin-15 expression. *Int J Oncol*, 36, 365-370.
- Zamorano, J., Wang, H.Y., Wang, R., Shi, Y., Longmore, G.D. & Keegan, A.D. (1998) Regulation of cell growth by IL-2: role of STAT5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression. *J Immunol*, 160, 3502-3512.

- Zhang, W., Tribble, R.P. & Samelson, L.E. (1998a) **LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation.** *Immunity*, 9, 239-246.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F. & Sprent, J. (1998b) **Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15.** *Immunity*, 8, 591-599.
- Ziolkowska, M., Koc, A., Luszczkiewicz, G., Ksiezopolska-Pietrzak, K., Klimczak, E., Chwalinska-Sadowska, H. & Maslinski, W. (2000) **High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism.** *J Immunol*, 164, 2832-2838.
- Zissel, G., Baumer, I., Schlaak, M. & Muller-Quernheim, J. (2000) **In vitro release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases.** *Eur Cytokine Netw*, 11, 105-112.
- Zuker, M. (2003) **Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.** *Nucleic Acids Res*, 31, 3406-3415.
- Zurawski, S.M., Vega, F., Jr., Doyle, E.L., Huyghe, B., Flaherty, K., McKay, D.B. & Zurawski, G. (1993) **Definition and spatial location of mouse interleukin-2 residues that interact with its heterotrimeric receptor.** *Embo J*, 12, 5113-5119.

- ANNEXES -

ANNEXE 1

ARTICLE 1

Perdreau, H., Mortier, E., Bouchaud, G., Solé, V., Boublik, Y., Plet, A., & Jacques, Y.

Different dynamics of IL-15R activation following IL-15 *cis*- or *trans*-presentation.

Soumis à European Cytokine Network le 28 mai 2010 et accepté pour publication le 30 juillet 2010.

Different dynamics of IL-15R activation following IL-15 *cis*- or *trans*-presentation

Harmonie Perdreau^{1,2}, Erwan Mortier^{1,2,*}, Grégory Bouchaud^{1,2}, Véronique Solé^{1,2},
Yvan Boublik³, Ariane Plet^{1,2,\$}, and Yannick Jacques^{1,2,\$}

¹ INSERM, UMR 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs en Immuno-Cancérologie, Nantes, France

² Université de Nantes, IFR 26, Nantes, France

³ CNRS, UMR 5237, Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire, Montpellier, France

^{\$} Both authors contributed equally to this work.

Keywords: IL-15 receptor, *trans*-presentation, binding, internalization, cell signaling

***Corresponding author:** Dr. Erwan Mortier, INSERM, UMR 892, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs en Immuno-Cancérologie, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 Quai Moncoussu, BP 70721, F-44007 Nantes cedex 1, France. Phone: +33 22808 0305. Fax: +33 22808 0204. E-mail address: erwan.mortier@nantes.inserm.fr.

ABSTRACT

Interleukin (IL)-15 is a cytokine critical for the homeostasis and the function of NK cells, NK-T cells, and memory CD8⁺ T cells. IL-15 signals are delivered through the IL-15R β and the common γ (γ_c) receptor chains. The third receptor chain, IL-15R α , confers the specificity and the high affinity for the cytokine. While IL-15 can activate with high affinity the trimeric receptor expressed by a target cell (*cis*-presentation), IL-15R α is also known to *trans*-present IL-15 with high affinity to target cells expressing the IL-15R β/γ_c complex. In order to compare IL-15 *cis*- and *trans*-presentation processes, and using a T cell line expressing both IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ and IL-15R β/γ_c , we analyzed cell surface receptor chains down-modulation, cytokine internalization and signaling responses induced either with IL-15 (*cis*-presentation) or with RLI, a fusion protein between IL-15 and an extended IL-15R α sushi domain, that mimics *trans*-presentation. Whereas IL-15 bound with high affinity to IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$, RLI bound with a similar high affinity to IL-15R β/γ_c . The kinetics of cell surface IL-15R down-modulation were slower following RLI treatment than after IL-15 treatment, as was the kinetics of RLI internalization which was slower than that of IL-15. IL-15 and RLI dose-dependently induced the activation of similar signaling pathways. However, the kinetics and duration of these activations were markedly different, RLI induced signaling being slower but more prolonged compared to that induced by IL-15, although the final proliferative responses at 48 h were similar. These findings collectively indicate that IL-15 *cis*- and *trans*-presentation mechanisms lead to different dynamics of receptor activation and signal transduction, with *cis*-presentation inducing fast and transient responses, and *trans*-presentation inducing slower and more persistent ones. They provide clues for a better understanding of how IL-15 action is controlled and how it plays a key role in the coordination between innate and adaptative immunity.

INTRODUCTION

Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine that has been originally described as a soluble factor mimicking IL-2 functions *in vitro* [1]. Despite functional redundancy initially demonstrated *in vitro*, subsequent experiments indicated that IL-2 and IL-15 exert complementary actions *in vivo*. Although both cytokines play pivotal roles in innate and adaptive immunity, the major role of IL-2 now appears to limit T cell responses and promote the development of regulatory T cells, whereas IL-15 appears to be critical for the development of NK and NK-T cells, the initiation of T cells division, and the survival of memory T cells [2, 3, 4].

Both cytokines belong to the four- α -helix-bundle family, and their membrane receptors share two subunits: the IL-15R β (CD122) and the common γ (γ_c or CD132) chains (PCT/EP2005/002367). The IL-15R β/γ_c receptor, such as those expressed by most resting T and NK cells, is a common intermediate-affinity receptor that can be activated by nanomolar concentrations of IL-2 or IL-15. The high-affinity IL-2 and IL-15 receptors chains (IL-2R α or CD25, and IL-15R α) confer the cytokine specificity and enhance affinity for cytokine binding. The trimeric high-affinity receptors can be activated with picomolar concentrations of either cytokine (PCT/EP2005/002367), whereas the single chains IL-2R α and IL-15R α bind respectively IL-2 with a low affinity ($K_d = 10$ nM), and IL-15 with a high affinity ($K_d = 0.100$ nM) (PCT/EP2005/002367).

The IL-15R β and γ_c chains bind intracellular signaling complexes, and signalize through three major pathways: Jak/STAT, MAPK, and PI3K/Akt [8, 9, 10]. The private α receptors are not considered to play a major role in cell signaling. However, IL-15R α cytoplasmic domain has been described to interact with TRAF2 and Syk kinase signaling molecules [11, 12], although the role of these associations is not well established for IL-15 function *in vivo*.

IL-15 signals can also be delivered through an original mechanism called *trans*-presentation, in which IL-15R α , expressed at the surface of IL-15 producer cells (dendritic cells, macrophages and

epithelial cells), presents IL-15 in *trans* to responder cells (NK or memory CD8⁺ T cells) bearing the IL-15R β/γ_c receptor [13, 14, 15]. This specificity is due to the capacity of the α chain to bind IL-15 with a high affinity in the absence of the IL-15R β and γ_c chains. As a co-stimulatory event occurring at the immunological synapse, IL-15 *trans*-presentation now appears to be a dominant mechanism for IL-15 action *in vivo* [14] and seems to play a major role in tumor immunosurveillance [16].

A soluble form of the human IL-15R α (sIL-15R α) is naturally released from IL-15R α expressing cells by a shedding process involving matrix metalloproteinases. This sIL-15R α is able to bind IL-15 with a high affinity, and efficiently blocks the proliferation driven through the high-affinity IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ signaling receptor *in vitro* [17]. Notably, sIL-15R α preserves the capacity to *trans*-present IL-15, and high concentrations of soluble complex IL-15/IL-15R α can support NK cell activation *in vitro* and *in vivo* [18, 19].

We previously engineered a fusion protein, RLI, comprising the IL-15R α binding domain linked to IL-15 (PCT/EP2005/002367). This molecule is able to bind the IL-15R β/γ_c receptor with a high affinity [20, 21]. RLI highly stimulated the mobilization of NK cells in a mouse model, deficient for the traffic of these cells [22]. The high agonistic activity of RLI was demonstrated *in vivo* on the development and the differentiation of NK cells in a HIS mouse model (PCT/EP2005/002367). In B16-F10 melanoma model, RLI inhibited lung and liver metastasis development, and also reduced metastatic progression in a model of HCT-116 human colorectal cancer in the nude mouse. The antitumoral effect of RLI was abolished by *in vivo* depletion of NK cells [24].

In the present study, we used RLI as a tool for studying *trans*-presentation. In order to compare IL-15 *cis*- and *trans*-presentation modes, we analyzed the cytokine receptor expression, cytokine binding, and signaling responses in a T cell line expressing both IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ and IL-15R β/γ_c .

MATERIALS AND METHODS

Cytokines and Reagents

Recombinant human IL-15 (rIL-15) was purchased from Peprotech, Inc. (Rocky Hill, NJ), and recombinant human IL-2 (rIL-2) was purchased from Chiron (Emeryville, CA). RLI fusion protein was produced in baculovirus-Sf9 cells using Bac-to-Bac expression system (Invitrogen), and was purified on an anti-FLAG-agarose affinity column (Sigma-Aldrich) essentially as described previously [21]. Monoclonal mouse anti-human IL-15 (MAB247), polyclonal goat anti-human IL-15R α (AF247), polyclonal goat anti-human IL-2R β (AF224-NA), and PE-conjugated donkey anti-goat IgG (F0107) were obtained from R&D Systems (Abington, UK). Control isotype IgG goat was purchased from Santa-Cruz Biotechnology. Monoclonal mouse anti-FLAG M2 conjugated to peroxidase was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Polyclonal rabbit and mouse antibodies anti-phospho-STAT5 (#9351), anti-phospho-STAT3 (#9131), anti-phospho-Akt (#9271), anti-Akt (#9272), anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (#9106), and anti-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (#9102) were obtained from Cell Signaling Technology. Monoclonal mouse antibodies anti-STAT5 (610191), and anti-STAT3 (610190) were purchased from BD Transduction Laboratories, and monoclonal mouse anti-actin antibody (MAB1501R) was acquired from Millipore.

Cells and Media

The Kit225 T lymphoma human cell line [25] was cultured in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 6% heat-inactivated FCS (Gibco), 2 mM glutamine, and 325 pM human rIL-2. This cell line was maintained at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Proliferation Assays

The proliferative inducing activity of rIL-15 and RLI was assessed by [³H]-thymidine incorporation on Kit225 cells as described previously [26]. To measure residual proliferative response of Kit225 cells after rIL-15 or RLI treatment, Kit225 cells were maintained for 3 days with 500 pM rIL-15 or RLI. Cells were washed,

starved for 24 h in cytokine-deprived medium, and plated at 10⁴ cells in 100 μ l of cytokine-deprived medium. After 48 h, the residual radioactivity was measured by [³H]-thymidine incorporation.

Western-Blot Analysis

Exponentially growing Kit225 cells were washed and serum-starved to reduce basal phosphorylation (16 h in cytokine-deprived medium and 3 h in serum-free medium supplemented with 0.5% BSA). After stimulation with rIL-15 or RLI under various conditions at 37°C, cells were suspended in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and cell pellets were lysed by addition of ice-cold lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % glycerol, 1 % NP-40, 20 μ M Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 0.4 mM Pefablock with aprotinin and leupeptin at 1 μ g/mL). After incubation on ice for 20 min, samples were centrifuged (13,000 rpm, 15 min, 4°C), and protein concentration was determined by BC Assay Kit (Uptima) using BSA as standard. 50 μ g of total proteins cell lysates were analyzed on 10 % SDS-PAGE and 4-12 % Bis-Tris Gels (Invitrogen), and the resolved proteins were transferred to Immobilon-P PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked with 5 % milk, 0.05 % Tween-20 in PBS for 1 h at room temperature. Subsequently, membranes were immunoblotted with specific antibodies according to their technical data sheet. After incubation with secondary HRP-conjugated anti-mouse/anti-rabbit antibody (Roche, Mannheim, Germany) for 1 h at room temperature, visualization of specific proteins was conducted by a chemiluminescence system using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche), according to the manufacturer's instructions. Densitometric evaluation of the Western-Blot data was realized with ImageQuant Software.

Binding Assays and Internalization

rIL-15 and RLI were radiolabeled with [¹²⁵I]-labeled iodine by a chloramine-T method to a specific radioactivity of approximately 2000 cpm/fmol for IL-15 and 4000 cpm/fmol for RLI. Kit225 cells were used for binding assays, and

these experiments were performed essentially as described previously [27]. Briefly, cells were incubated for 1 h at 4°C with increasing concentrations of labeled rIL-15 or RLI. Non specific binding was determined in the presence of a 100 times excess of unlabeled rIL-15 or RLI and subtracted from total binding. Regression analysis of the binding data was accomplished using one-site and two-site equilibrium binding equations (GraphPad PRISM Software), and data were plotted in the coordinate system.

For internalization analysis, Kit225 cells were treated mostly as described previously (PCT/EP2005/002367). In short, cells were equilibrated at 4°C for 1 h with 1 nM labeled rIL-15 or RLI. Temperature was then switched to 37°C, and, at different time intervals, two samples were washed and treated for 8 min either with ice-cold glycine-HCl buffer (0.2 M, pH 2.5) or with ice-cold PBS. Total ligand binding was determined from the

pellet of the cells treated with PBS, whereas the membrane-bound and internalized fractions were determined, respectively, from the supernatant and pellet of cells treated with acid pH.

Flow Cytometry Analysis

Kit225 cells were maintained in culture medium for 3 days, washed, and starved for 24 h in cytokine-deprived medium. Cells were incubated with 500 pM rIL-15 or RLI for 0 to 48 h at 37°C. They were next plated at 0.2×10^6 cells in 100 μ l, washed twice with PBS / 0.1 % BSA and incubated for 1 h at 4°C with 10 μ g/ml anti-IL-15R α , anti-IL-15R β or control isotype IgG antibody. Cells were then washed three times with PBS / 0.1 % BSA and incubated for 30 min in the dark at 4°C with 1.25 μ g/ml PE-anti-goat IgG. They were washed three times with PBS / 0.1 % BSA and analyzed on a FACScan fluorocytometer (BD Biosciences) and FlowJo Software.

RESULTS

IL-15 and RLI present different cell surface receptor binding characteristics

In order to compare IL-15 *cis*- and *trans*-presentation modes, we chose a human T lymphoma cell line, Kit225, expressing both hIL-15R α / β / γ_c and hIL-15R β / γ_c . Low doses of IL-15 were used to stimulate the IL-15R α / β / γ_c high affinity receptor (*cis*-presentation), whereas the RLI fusion protein previously described (PCT/EP2005/002367) was used to mimic *trans*-presentation. As expected, [¹²⁵I]-IL-15 displayed high and low affinity binding sites corresponding respectively to its binding to the trimeric IL-15R α / β / γ_c receptors ($K_d = 0.037$ nM; $B_{max} = 295$ sites/cell), and dimeric IL-15R β / γ_c receptors ($K_d = 19.6$ nM; $B_{max} = 2784$ sites/cell) (*figure 1A*). By contrast, [¹²⁵I]-RLI bound to a single class of high affinity binding sites ($K_d = 0.186$ nM; $B_{max} = 3067$ sites/cell) as expected for the dimeric IL-15R β / γ_c receptors (*figure 1B*).

IL-15 and RLI induce different kinetics of cell surface IL-15R down-modulation and display different kinetics of internalization

Cell surface expression of IL-15R α and IL-15R β chains was monitored by flow cytometry following IL-15 or RLI treatment. As shown in *figure 2A*, IL-15 treatment induced a rapid reduction of IL-15R α cell surface expression, detectable as early as 15 min, to reach an almost complete disappearance of expression at longer incubation periods (24 h). By contrast, upon RLI treatment, IL-15R α cell surface expression was almost unchanged during the first hours, and then slightly decreased up to 24 h. IL-15 treatment did not significantly affect the IL-15R β pool during the 24 h incubation period, whereas RLI induced a late decrease (*figure 2B*). These results show that IL-15 and RLI both induce the disappearance from the cell membrane of IL-15 receptor chains but with different kinetics, as the effect of IL-15 on IL-15R α is much faster than that of RLI on IL-15R β .

Cytokine internalization was then monitored after equilibration of Kit225 cells with radioiodinated cytokines and temperature switching from 4°C to 37°C (*figure 3*). [¹²⁵I]-IL-15 and [¹²⁵I]-RLI were both found to be efficiently internalized (between 40 % and 50 % maximal internalization)

but [125 I]-IL-15 internalization was very quick ($\text{Int}_{50} = 1.1$ min) (*figure 3A*) compared to that of [125 I]-RLI ($\text{Int}_{50} = 23.1$ min) (*figure 3B*). This difference between [125 I]-IL-15 and [125 I]-RLI in kinetics of internalization was comparable to that observed for the down-regulation of cell surface IL-15R (*figure 2A*). The maximal number of [125 I]-IL-15 molecules internalized per cell was 5 times lower than the maximal number of [125 I]-RLI molecules internalized per cell (*figure 3C*), reflecting the fact that high affinity IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ account for a small proportion of the total IL-15R. This likely explains why IL-15 induction of IL-15R β internalization through IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ could not be detected (*figure 2B*).

IL-15 and RLI activate similar signaling pathways but with different dose and time-dependent patterns

In order to compare the signal transductions induced by IL-15 and RLI, activation of the Jak/STAT, PI3K/Akt and MAPKs pathways was monitored by studying the phosphorylation of STAT5, STAT3, Akt, and p44/42 MAPK (Erk 1/2). First, Kit225 cells were stimulated for 15 min with increasing concentrations of IL-15 and RLI ranging from 0 to 1500 pM (*figure 4*). Both cytokines were shown to stimulate the three signaling pathways in a dose-dependent manner, and, for each cytokine, the activation profiles were identical for all proteins of the signaling cascades. However, the efficiency of both molecules was somewhat different. IL-15 maximum signaling intensities were obtained at 50 pM, whereas at least 350 pM RLI were necessary to reach similar intensities. IL-15 therefore seemed 5 to 7 times more potent than RLI after a 15 min-incubation time.

We next compared the kinetic of cell signaling induced by a maximal concentration of IL-15 (50 pM) or RLI (350 pM) at different time points between 0 and 48 h (*figures 5A and 5B*). Here again, IL-15 and RLI induced the same activation profiles for all the signaling proteins and the quantification of densitometric scanning are shown only for STAT5. Signaling induced by IL-15 was strong, fast (detectable as soon as 5 min, maximal by 15 min), and transient (strongly down-regulated after 1 h, and almost undetectable after 3-6 h). Signaling induced by RLI was as strong and fast as for IL-15, but was far more persistent, being

maintained at high level until 16 h before decreasing and still being detectable at 48 h.

We previously showed that IL-15 and RLI were able to induce identical proliferative responses of the Kit225 cell line over 48 h (PCT/EP2005/002367), with EC_{50} values in agreement with the activation of high-affinity receptors ($\text{EC}_{50} \sim 10^{-11}$ M). We therefore compared the signaling responses at identical (50 pM) concentrations of both molecules (*figures 5C and 5D*) over 48 h. The response to RLI was slower than in the case of IL-15 and was again more persistent. Calculation of the areas-under-curves (AUC) indicated that the integrated signals of STAT5 induction from 0 to 48 h were similar (11.4 and 16.2 units \times hour after IL-15 and RLI treatments respectively) whether IL-15 or RLI was used as stimulus, consistent with the similar 48 h proliferative responses induced by 50 pM IL-15 or RLI. When calculating the AUC at different IL-15 or RLI concentrations, they were found to be proportional to the proliferative responses (data not shown), suggesting that these responses are based on an integrative transmission mode rather than on the maximal intensity of signaling.

RLI induced a prolonged effect on cell proliferation after cytokine withdrawal

RLI, in contrast to IL-15, was still able to sustain cell signaling after 5 h of stimulation (*figure 5*). In order to further document this persistency, we compared the residual proliferative responses of Kit225 cells after 3 days in the presence of 500 pM IL-15 or RLI followed by a 24 h starvation. We first verified that the specific activities of the cytokines were not affected during the 3 days incubation period. As shown in *figure 6*, the residual proliferative response was significantly higher in the case of RLI, indicating a higher capacity of RLI vs. IL-15 to induce long term activation.

The sensitivity to RLI is more persistent than that to IL-15 upon re-stimulation

Having shown that IL-15 and RLI induced different kinetics of receptor chain down-modulation, cytokine down-regulation and signal transduction, we examined how this could impact the biological response upon cytokine re-stimulation. Kit225 cells, pre-treated or not with IL-

15 for 24 h, were subsequently stimulated for 1 h with 50 pM IL-15 or RLI, and analyzed for their level of STAT5-phosphorylation (*figure 7*). In the absence of IL-15 pre-treatment, and in agreement with *figure 5C*, pSTAT5 signals induced by IL-15 and RLI had similar and strong intensities. By contrast, cells having experienced a 24 h IL-15 pre-

treatment had a markedly reduced secondary response to IL-15, while the secondary response to RLI was far less affected. This result is in agreement with a more pronounced down-regulation of IL-15R α by IL-15 (*figure 2*) that mainly affects IL-15 high-affinity receptors and leaves most of the RLI receptors unaffected.

DISCUSSION

A number of reports have documented the existence of two modes of IL-15 action (*cis*- and *trans*-presentation), and discussed their relative importance in the context of immune activation. In this study, we compared on the same cell line the effect of IL-15 *cis*-presentation on the high affinity IL-15R α / β / γ_c to that of RLI, a fusion protein between hIL-15 and hIL-15R α that mimics the mechanism of IL-15 *trans*-presentation on the IL-15R β / γ_c complex. We provide evidences that these two modes of IL-15 action are associated with different dynamics of receptor activation and signal transduction.

Kit225 cells expressed two classes of IL-15 binding sites: a majority (90 %) of intermediate affinity ($K_d \sim 20$ nM) receptors corresponding to IL-15R β / γ_c and a small proportion of high affinity ($K_d = 0.037$ nM) receptors corresponding to IL-15R α / β / γ_c . On the other hand, the RLI fusion protein bound to a number of single class high affinity ($K_d = 0.186$ nM) receptors corresponding to the large pool of dimeric IL-15 receptors.

Analysis of IL-15 receptor chains internalization upon IL-15 *cis*- or *trans*-presentation revealed different behaviors. In the context of *cis*-presentation, IL-15 stimulation through IL-15R α / β / γ_c induced a quick extinction of cell surface IL-15R α , a result consistent with previous reports [28, 29] and reflecting a quick IL-15R α / β / γ_c internalization. A concomitant disappearance of cell surface IL-15R β chains could not be detected in our experimental conditions as IL-15R α / β / γ_c only account for 10 % of IL-15R β containing receptors. In the context of *trans*-presentation, RLI binding led also to the internalization of IL-15R β / γ_c , as revealed by the down-regulation of cell surface IL-15R β , but with a kinetic that was far slower than that depicting the down-regulation of IL-15R α by IL-15 (*cis*-presentation). Although RLI induced a

slight decrease of cell surface IL-15R α , the fusion protein does not bind the IL-15R α chain (G. B., data not shown). This finding is in agreement with the notion that IL-15R α seems pre-associated or in close proximity with IL-15R β before cytokine binding. Such molecular proximity of IL-15R α with the β and γ_c chains in lipid rafts on the surface of Kit225 cells has been suggested by flow cytometry and confocal microscopic FRET measurements [30].

Differences in kinetics of cytokine internalization were also observed and correlated well with those found for receptor internalization. RLI was indeed found to be internalized through IL-15R β / γ_c at a far lower rate than IL-15 through IL-15R α / β / γ_c (half-time of maximal internalization for RLI >20 times higher than for IL-15). The higher residual proliferative response found in the case of RLI, after cytokine withdrawal from the supernatant, was also consistent with a slower internalization rate for RLI. Together, these data showed that the kinetics of internalization of cytokine-receptor complexes were much slower in the context of *trans*-presentation than in the context of *cis*-presentation, suggesting differences in the molecular events involved. This could be linked to a specific role of IL-15R α in contributing to a quick internalization of the IL-15R α / β / γ_c complex in the context of *cis*-presentation. This could also be explained by the differential interactions of receptor complexes with other membrane molecules, such as MHC I and II found in the molecular vicinity of IL-15R by FRET analysis [30], or with the adjacent cytoskeleton, as it was recently shown to have a major importance for the IL-7/IL-7R complex [31].

A number of studies have contributed to decipher the signaling cascades associated with the activation of IL-15 receptors. The intracellular domains of the IL-15R β and γ_c chains are

considered to be the major actors responsible for the initiation of signal transduction. They lead to the activation of multiple downstream pathways that include the Jak/STAT, Ras/MAPK/Erk, and PI3K/Akt pathways [32, 33, 34]. This study showed that these three main pathways were activated both by IL-15 and RLI, and a more general analysis using a Phospho-Kinase array kit (R&D Systems) did not reveal qualitative differences between IL-15 and RLI induced protein phosphorylation (data not shown). These results therefore indicate that the same signaling pathways are activated in response to both *cis*- and *trans*-presented IL-15, in agreement with the known common dependence of their biological responses on the IL-15R β/γ_c complex.

However, dose-dependent and kinetic analysis of signal transduction revealed major differences between IL-15 and RLI activation modes. The efficiency of IL-15 to stimulate the three signaling pathways after a 15 min-incubation period was found to be 5 to 7 times superior compared to RLI. For instance, the maximal effect on STAT5 phosphorylation was observed with 50 pM and 350 pM of IL-15 and RLI respectively. This difference correlates with the one found between the affinity constants of IL-15 for IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ ($K_d = 0.037$ nM) and that of RLI for IL-15R β/γ_c ($K_d = 0.186$ nM). At these optimal concentrations (50 pM IL-15 and 350 pM RLI), the kinetics of induction of phosphorylation were fast and very similar. Overall, these results suggest that the induction phase of the signaling response is dependent on the affinity of the IL-15R to both cytokine. At later time points, the duration of signal transduction was markedly different between IL-15 and RLI. IL-15 induced signaling disappeared quickly, whereas it persisted and decreased slowly in the case of RLI. These observations are in agreement with those of Sato *et al.* [35], showing, *ex vivo*, that ribosomal S6 phosphorylation in CD8⁺ T cells persisted longer after IL-15 *trans*-presentation by IL-15R α^+ expressing DC cells than after stimulation by soluble IL-15 (120 h vs. 24 h respectively). They also correlate with the kinetic differences that we observed for both ligands internalization (20 times faster for IL-15 than for RLI) and for down-regulation of cell surface receptor chains after cytokine stimulation (fast for IL-15 and slow for RLI), suggesting that the duration of signaling is related to the time of residence of the cytokine-

receptor complex at the plasma membrane. These kinetic differences between IL-15 and RLI internalization and signaling were further analyzed for their impact on downstream biological effects. At IL-15 and RLI concentrations, previously shown to induce similar proliferative dose-responses at 48 h, similar integrated signaling intensities over 48 hours were also found. More generally, the integrated intensities, as measured by the area-under-curves (AUC), were found proportional to the concentration of cytokine used. This indicates that the cellular proliferative response is based on an integrative transmission mode (proportional to the AUC of signaling) rather than being based on the kinetics of signaling. However, these observations have to be confirmed in a more physiological context of *trans*-presentation involving an IL-15 *trans*-presenting cell and a responding cell.

Since free IL-15 cannot be detected in biological fluids under physiological conditions, it was suggested that IL-15 mainly acts as a membrane associated protein bound to its high affinity IL-15R α chain, IL-15R α behaving as a necessary chaperone for the trafficking, production and secretion of IL-15 (PCT/EP2005/002367). However, free circulating IL-15 can be detected in the serum of patients with inflammatory, auto-immune diseases, or pathogen infections [37, 38, 39], suggesting that it may also function by *cis*-activation of the heterotrimeric IL-15R. A number of reports have documented this mode of action [30, 40, 41]. A structural model has been proposed [41] in which the highly flexible nature of the linker and/or proline-threonine rich region of IL-15R α allows the presentation of IL-15 in both *cis*- and *trans*-modes. Thereby, IL-15 could be *cis*-presented, particularly in inflammatory situations. The early and rapid up-regulation of the expression of the IL-15R α chain should allow a fast expansion of antigen-responsive T and NK cells and a strong immune response [42]. Afterwards, fast IL-15 down-regulation of its IL-15R α chain, as shown in this study, would avoid harmful consequences due to excessive activation, including overproduction of inflammatory cytokines, extensive cell lysis, and incoherent adaptative cell responses. Pillet *et al.* [43] showed *in vitro* that human NK cells sensitivity to free IL-15 is increased in early activation stages whereas their response is

redirected at later stages toward IL-2 and *trans*-presented IL-15. The authors described a sequential expression of IL-15R α and IL-2R α , which may play a key role in coordinating the innate and adaptive branches of the immune system. The slower down-regulation of the IL-15R β/γ_c complex, as pointed out in our study, would then allow the cell to stay competent for IL-15 *trans*-presentation, a process that has been shown to be important for the long-term maintenance of antigen-memory cells.

We have recently shown that a soluble form of IL-15R α (sIL-15R α) is elevated in the serum of head and neck cancer patients [44], and increased in the serum of patients with Crohn's disease that respond to infliximab treatment [39]. The sIL-15R α protein, generated by proteolytic cleavage or through the expression of an alternative spliced variant of IL-15R α [17, 45, 46], can act as a chaperone of IL-15 enhancing its biological activity. The soluble IL-15R α could therefore *trans*-present IL-15 to responding cells without the need for a cell-cell contact. In addition, sIL-15R α has also been shown to increase the half life of IL-15, and could therefore make easier the diffusion of the cytokine and its action on remote cells and tissues expressing the IL-15R β/γ_c receptor [19]. Similarly,

IL-6 is known to bind a naturally occurring soluble form of IL-6R chain to form a complex that can stimulate cells expressing the signal transducing gp130 protein in the absence of IL-6R [47]. This mechanism, termed IL-6 "*trans*-signaling", is involved in the maintenance of the disease state of many chronic inflammation diseases [48]. In view of our results, it would be interesting to explore whether IL-6 *cis*- and *trans*-signaling also involve different dynamics of receptor activation.

In summary, our present results demonstrate that IL-15 *cis*- and *trans*-presentation modes lead to different kinetics of receptor expression, cytokine internalization, and sequential cell signaling. This controlled distribution of IL-15 spatially and temporally may constitute a program limiting the unwanted consequences of a powerful cytokine. *Cis*- and *trans*-presenting modes could equally play a key role in the coordination between innate and adaptive immunity. This work provides clues for a greater understanding of the IL-15 system, and/or the design and optimization of immunotherapeutic treatments based on the use of cytokines as adjuvants.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported, in part, by INSERM, CNRS, Région Pays de Loire (grant CIMATH), and the Association pour la Recherche sur le Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page

charges. This article must therefore hereby be marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We particularly thank Agnès Quémener for helpful discussions and reading of this manuscript.

REFERENCES

1. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; 264, 965.
2. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K, Caligiuri MA. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; 180: 1395.
3. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8:591.
4. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191, 771.
5. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, *et al.* Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J* 1994; 13, 2822.

6. Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, *et al.* Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem* 1995; 270:29862.
7. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:657.
8. Leonard WJ. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol* 2001; 73: 271.
9. Hunt AE, Lali FV, Lord JD, Nelson BH, Miyazaki T, Tracey KJ, Foxwell BM. Role of interleukin (IL)-2 receptor b-chain subdomains and Shc in p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p54 MAP kinase (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) activation. IL-2-driven proliferation is independent of p38 and p54 MAP kinase activation. *J Biol Chem* 1999; 274:7591.
10. Gu H, Maeda H, Moon JJ, Lord JD, Yoakim M, Nelson BH, Neel BG. New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol* 2000; 20:7109.
11. Bulfone-Paus S, Bulanova E, Pohl T, Budagian V, Durkop H, Ruckert R, Kunzendorf U, Paus R, Krause H. Death deflected: IL-15 inhibits TNF- α -mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ra chain. *FASEB J* 1999; 13: 1575.
12. Bulanova E, Budagian V, Pohl T, *et al.* The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J Immunol* 2001; 167:6292.
13. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity* 2002; 17, 537.
14. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004; 200(7):825-34.
15. Mortier E, Advincula R, Kim L, Chmura S, Barrera J, Reizis B, Malynn BA, Ma A. Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8⁺ T cell subsets. *Immunity* 2009; 31(5):811-22.
16. Kobayashi H, Dubois S, Sato N, Sabzevari H, Sakai Y, Waldmann TA, Tagaya Y. (2005). Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*, 105, 721–727.
17. Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y. 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* 2004; 173,1681.
18. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, Cho JH, Boyman O, Surh CD, Sprent J. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(24):9166.
19. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrançois L. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol* 2006; 177(9):6072.
20. Mortier E, Quémener A, Vusio P, Lorenzen I, Boublik Y, Grotzinger J *et al.* 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 \times IL-15R alpha fusion proteins. *J Biol Chem* 2006; 281, 1612.
21. Bouchaud G, Garrigue-Antar L, Solé V, Quémener A, Boublik Y, Mortier E, Perdreau H, Jacques Y, Plet A. 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* 2008; 382(1):1.
22. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, Jacques Y, Baratin M, Tomasello E, Vivier E. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol* 2007; 8(12):1337.
23. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, Corcuff E, Mortier E, Jacques Y, Spits H, Di Santo JP. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation *in vivo*. *J Exp Med* 2009; 206(1):25.
24. Bessard A, Solé V, Bouchaud G, Quémener A, Jacques Y. 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* 2009; 8(9):2736.
25. Hori T, Uchiyama T, Tsudo M, Umadome H, Ohno H, Fukuhara S, Kita K, Uchino H. Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with

- human T cell leukemia/lymphoma virus. *Blood* 1987; 70:1069.
26. Bernard J, Harb C, Mortier E, Quémener A, Meloen RH, Vermot-Desroches C, Wijdeness J, Van Dijken P, Grotzinger J, Slootstra JW, *et al.* Identification of an interleukin-15 alpha receptor binding site on human interleukin-15. *J Biol Chem* 2004; 279:24313.
27. Lehours P, Raheer S, Dubois S, Guo J, Godard A, Jacques Y. Subunit structure of the high and low affinity human interleukin-15 receptors. *Eur. Cytokine Network* 2000; 11, 207.
28. Cornish GH, Sinclair LV, Cantrell DA. Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood* 2006; 108(2):600.
29. Kumaki S, Armitage R, Ahdieh M, Park L, Cosman D. Interleukin-15 up-regulates interleukin-2 receptor alpha chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells. *Eur J Immunol* 1996; 26(6):1235.
30. Vámosi G, Bodnár A, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Langowski J, Tóth K, Mátyus L, Szöllösi J, Waldmann TA, Damjanovich S. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(30):11082.
31. Rose T, Pillet AH, Lavergne V, Tamarit B, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, Theze J. Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response. *J Biol Chem* 2010; 285(20):14898.
32. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Ihle JN, *et al.* Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* 1994; 266(5187):1045.
33. Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, Yamauchi A, Bloom ET, Mietz J, John S, *et al.* The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 1995; 2(4):331.
34. Zambricki E, Shigeoka A, Kishimoto H, Sprent J, Burakoff S, Carpenter C, Milford E, McKay D. Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15. *Am J Transplant* 2005 ; 5(11) :2623.
35. Sato N, Patel HJ, Waldmann TA, Tagaya Y. The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(2) :588.
36. Mortier E, Woo T, Avincula R, Gozalo S, Ma A. IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 2008; 205(5) :1213.
37. Waldmann TA. Targeting the interleukin-15/interleukin-15 receptor system in inflammatory autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(4):174. Review.
38. Silva MA, Menezes J, Deslandres C, Seidman EG. Anti-inflammatory role of interleukin-15 in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(3):219.
39. Bouchaud G, Mortier E, Flamant M, Barbieux I, Plet A, Galmiche JP, Jacques Y, Bourreille A. Interleukin-15 and its soluble receptor (sIL-15Ralpha) mediate the response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010 [Epub ahead of print]
40. Schluns KS, Stoklasek T, Lefrancois L. The roles of interleukin-15 receptor alpha: transpresentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37, 1567.
41. Olsen SK, Ota N, Kishishita S, Kukimoto-Niino M, Murayama K, Uchiyama H, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Kanagawa O, Yokoyama S. Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into *trans* and *cis* presentation. *J Biol Chem* 2007; 282(51):37191.
42. Stonier SW, Schluns KS. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* 2010; 127(2):85.
43. Pillet AH, Bugault F, Thèze J, Chakrabarti LA, Rose T. A programmed switch from IL-15- to IL-2-dependent activation in human NK cells. *J Immunol* 2009; 82(10):6267.
44. Badoual C, Bouchaud G, Agueznay Nel H, Mortier E, Hans S, Gey A, Fernani F, Peyrard S, Laurent-Puig P, Bruneval P, Sastre X, Plet A, Garrigue-Antar L, Quintin-Colonna F, Fridman WH, Brasnu D, Jacques Y, Tartour E. The soluble alpha chain of interleukin-15 receptor: a proinflammatory molecule associated with tumor progression in head and neck cancer. *Cancer Res* 2008; 68(10):3907.
45. Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, Ludwig A, Rose-John S, Saftig P, *et al.* Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that

involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 2004; 279, 40368.

46. Bulanova E, Budagian V, Duitman E, Orinska Z, Krause H, Rückert R, Reiling N, Bulfone-Paus S. Soluble Interleukin IL-15 α is generated by alternative splicing or proteolytic cleavage and forms functional complexes with IL-15. *J Biol Chem* 2007; 282(18):13167.

47. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 *trans*-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand. J Immunol* 2006; 63(5):321. Review.

48. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006; 80(2):227. Review

LEGENDS

Figure 1

Binding properties of [¹²⁵I]-IL-15 and [¹²⁵I]-RLI on Kit225 cells receptors. Kit225 cells were incubated for 1 h at 4°C with increasing concentrations of labeled (A) [¹²⁵I]-IL-15 or (B) [¹²⁵I]-RLI. Specific binding was calculated by subtracting non specific binding from total binding. Scatchard plots are shown in *insets*. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2

Cell surface down-modulation of IL-15R α and IL-15R β after IL-15 or RLI treatment. Kit225 cells were treated with 500 pM IL-15 or RLI for 0 to 24 h at 37°C. They then were washed and incubated with anti-IL-15R α and anti-IL-15R β antibodies. The expression levels of the receptors were analyzed by flow cytometry: (A) IL-15R α expression after IL-15 or RLI stimulation, (B) IL-15R β expression after IL-15 or RLI stimulation. Data are representative of at least three experiments.

Figure 3

Characteristics of [¹²⁵I]-IL-15 and [¹²⁵I]-RLI internalizations. Kit225 cells were equilibrated for 1 h at 4°C with 1 nM labeled (A) IL-15 or (B) RLI. Temperature was then switched to 37°C and internalization was determined at different incubation times. (C) Results from (A) and (B) are shown in terms of number of internalized molecules per cell for [¹²⁵I]-IL-15 (\blacktriangle) and [¹²⁵I]-RLI (\diamond). Results are representative of three separate experiments.

Figure 4

Dose-dependent induction of signal transduction by IL-15 and RLI. Kit225 cells were stimulated with IL-15 (I) or RLI at the indicated concentrations for 15 min at 37°C. Afterwards, cells were lysed, and STAT5, STAT3, Akt, and Erk 1/2 phosphorylations were analyzed by immunoblotting, β -actin was used as internal control. N: Not stimulated. Data are representative of three independent experiments.

Figure 5

Kinetics of induction of signal transduction by IL-15 and RLI. Kit225 cells were stimulated with IL-15 (I) or RLI for 0 to 48 h at 37°C. Cells were treated as in *figure 4* and intensities were measured by densitometric scanning of the spots with ImageQuant Software. N: Not stimulated. (A) Cells were stimulated with 50 pM IL-15 or 350 pM RLI, and (B) densitometric evaluation of STAT5 phosphorylation, upon stimulation with IL-15 (\blacktriangle) or RLI (\diamond) or in absence of stimulation (\times), was drawn (arbitrary units). (C) Cells were stimulated with 50 pM IL-15 or 50 pM RLI, and (D) STAT5 phosphorylation intensities were similarly drawn. All data are representative of three separate experiments.

Figure 6

Residual proliferative responses of Kit225 cells after IL-15 or RLI stimulation. Kit225 cells were cultured for 72 h in the presence of 500 pM IL-15 (\blacktriangle) or RLI (\diamond) at 37°C to achieve complete stimulation. Then, cells were washed and starved for a further 24 h. Their residual proliferative response was measured 48 h later by [³H]-thymidine incorporation. N: Not stimulated (\times). Plots are representative of at least three separate experiments. ***, $p < 0.001$.

Figure 7

Induction of signal transduction upon cytokine re-stimulation. Kit225 cells were starved or pre-stimulated with 300 pM IL-15 for 24 h. Then, they were washed and stimulated with 50 pM IL-15 (I) or RLI for 1 h at 37°C. Cells were lysed and STAT5 phosphorylation was analyzed by immunoblotting, β -actin was used as internal control. N: Not stimulated. Data are representative of three independent experiments.

FIGURES

Figure 1

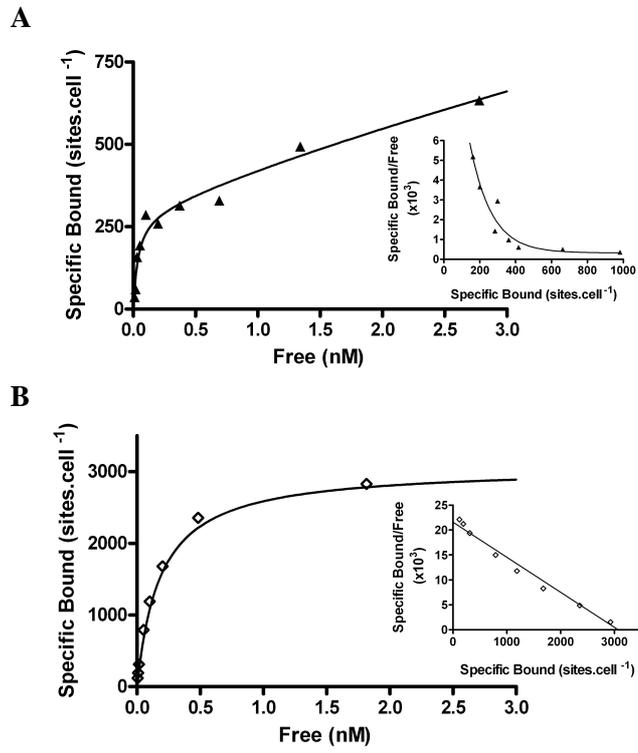


Figure 2

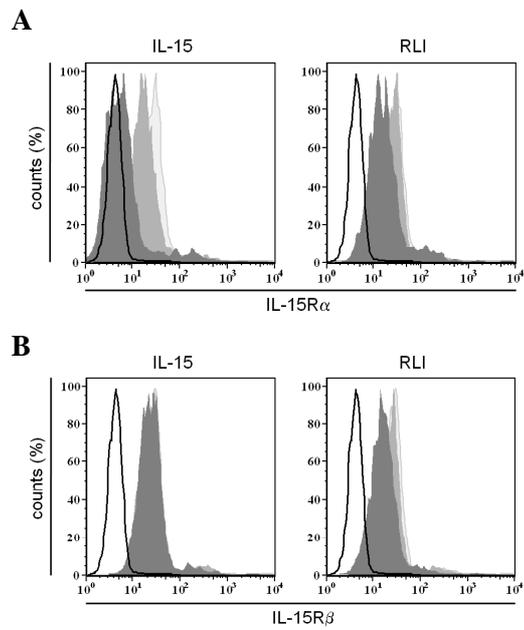


Figure 3

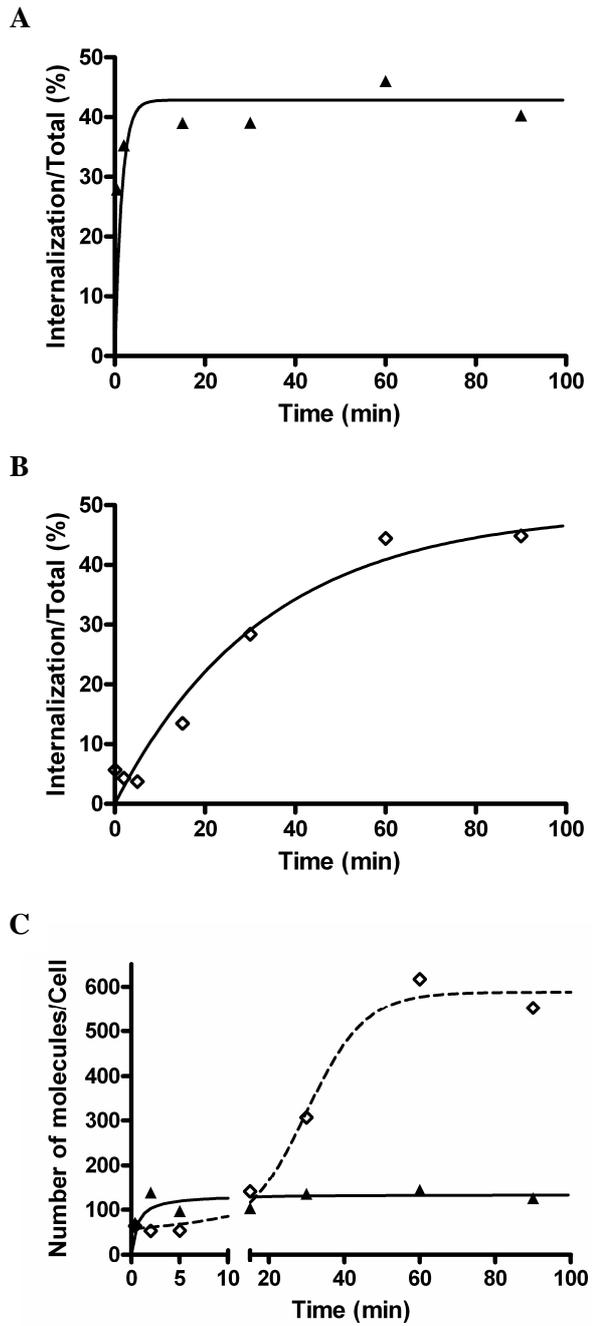


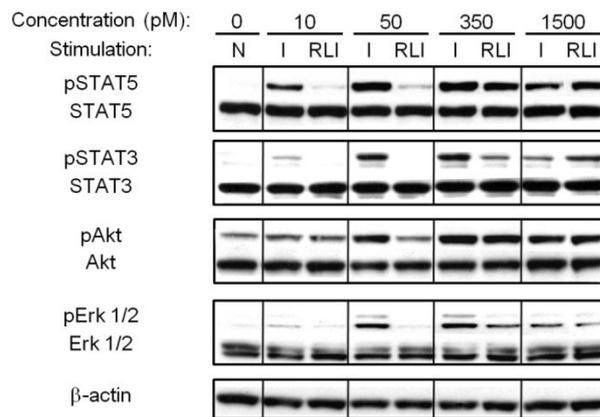
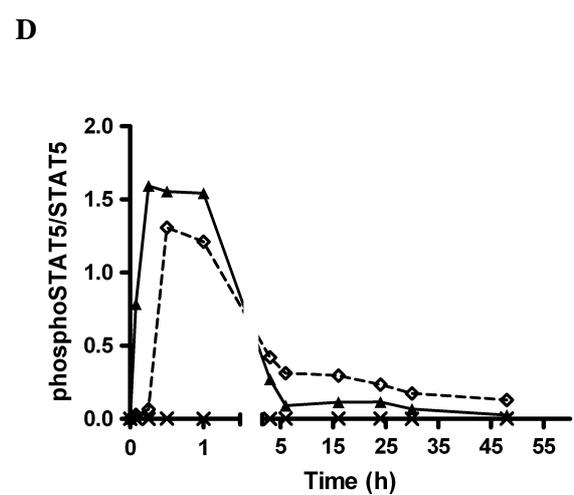
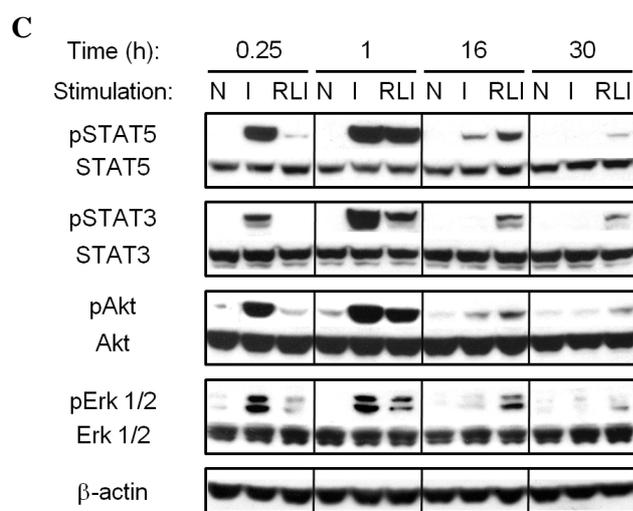
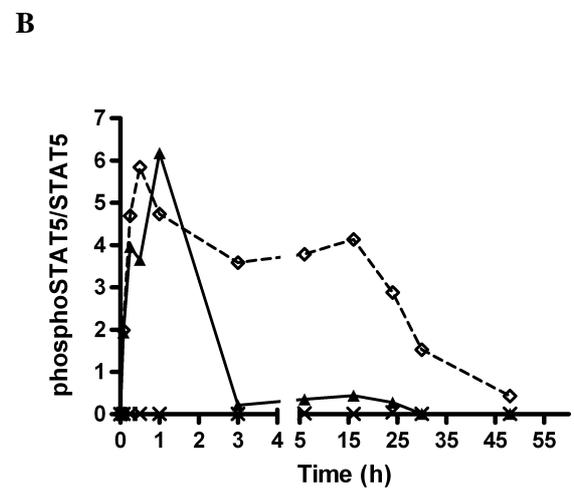
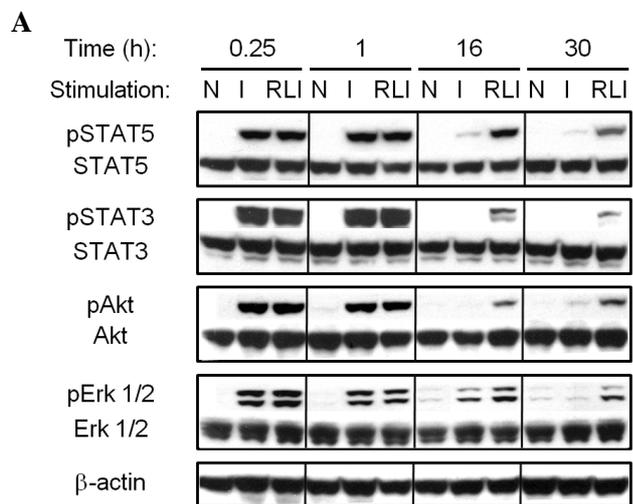
Figure 4**Figure 5**

Figure 6

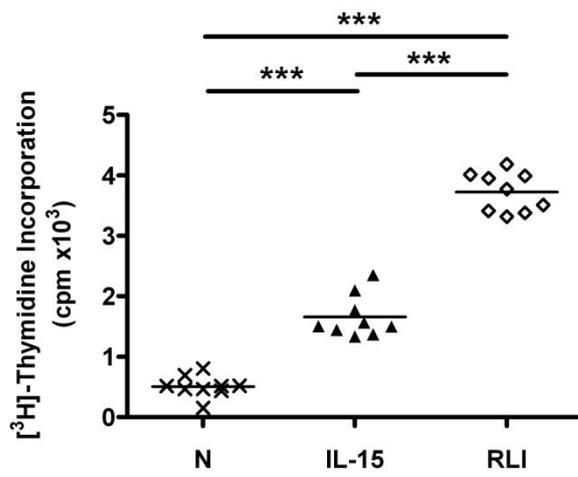
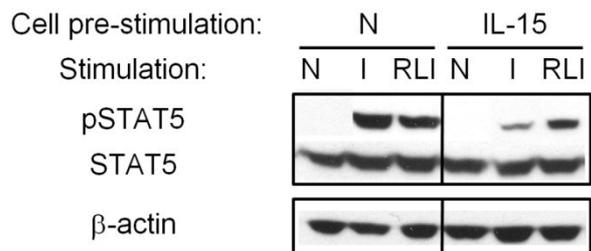


Figure 7



ANNEXE 2

ARTICLE 2

Bouchaud, G., Garrigue-Antar, L., Solé, V., Quéméner, A., Boublik, Y., Mortier, E., Perdreau, H., Jacques, Y., & Plet, A.

The Exon-3-Encoded Domain of IL-15R α Contributes to IL-15 High-Affinity Binding and Is Crucial for the IL-15 Antagonistic Effect of Soluble IL-15R α .

Journal of Molecular Biology, September 2008, 382(1):1-12.

JMBAvailable online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect


The Exon-3-Encoded Domain of IL-15R α Contributes to IL-15 High-Affinity Binding and Is Crucial for the IL-15 Antagonistic Effect of Soluble IL-15R α

Grégory Bouchaud^{1,2*}, Laure Garrigue-Antar^{1,2}, Véronique Solé^{1,2},
Agnès Quéméner^{1,2}, Yvan Boublik³, Erwan Mortier^{1,2},
Harmonie Perdreau^{1,2}, Yannick Jacques^{1,2} and Ariane Plet^{1,2}

¹INSERM, U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Groupe Cytokines et Récepteurs, Nantes, France

²Université de Nantes, IFR26, Nantes, France

³CNRS, FRE 2593, Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Montpellier, France

Received 14 May 2008;
received in revised form
7 July 2008;
accepted 8 July 2008
Available online
16 July 2008

We previously showed that a natural soluble form of interleukin-15 (IL-15) R α corresponding to the full-length ectodomain of IL-15R α behaved as a potent antagonist of IL-15 action through IL-15R α / β / γ , whereas a recombinant soluble IL-15R α sushi domain did not, but instead acted as an agonist of IL-15 action through IL-15R β / γ . In order to determine precisely the molecular basis governing these antagonistic *versus* agonistic actions, we compared the binding properties and biological effects of recombinant soluble IL-15R α (sIL-15R α) species containing the sushi domain and different remaining parts of the ectodomain. We first demonstrate that the exon-3-encoded domain and, more particularly, its N-terminal 13-amino-acid (aa) peptide are important, in addition to the adjacent exon-2-encoded sushi domain, for the stabilization of the high-affinity IL-15-IL-15R α complex by slowing down its dissociation rate and by contributing to about 10–20% of the free energy of interaction. We next show that all sushi-containing sIL-15R α are agonists on IL-15R β / γ , coordinately increasing IL-15 binding and IL-15-induced proliferation. Their agonistic potencies are proportional to their respective affinities for IL-15. We then show that the antagonistic effect of sIL-15R α in the context of IL-15R α / β / γ is due to the 13-aa peptide that creates a sterical constraint impeding the binding of the sIL-15R α -IL-15 complex to the membrane-anchored IL-15R α / β / γ . In the frame of the soluble IL-15R α sushi domain-IL-15 fusion protein that contains the 13-aa peptide, this constraint is alleviated as a result of a conformational effect due to the covalent linking of the 13-aa peptide to the N-terminus of IL-15. The soluble IL-15R α sushi domain-IL-15 fusion protein is therefore able to bind and activate both the IL-15R β / γ and the IL-15R α / β / γ receptors.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Edited by J. Karn

Keywords: interleukin-15; sushi domain; antagonist; receptor; fusion protein

Introduction

Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine that has been originally described as a soluble factor mimicking the activities of IL-2 *in vitro*.¹ Both cytokines belong to the four- α -helix-bundle family, and their membrane receptors share two subunits (IL-2/15R β and IL-2/15R γ chains) responsible for signal transduction.² The IL-15R β / γ receptor, such as those expressed by most resting T and NK cells, is a common intermediate-affinity receptor that can be activated by nanomolar concentrations of IL-2 or IL-15. The high-affinity IL-2 and IL-15 receptors such as

*Corresponding author. INSERM, U892, Groupe Cytokines et Récepteurs, Institut de biologie, 9 Quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01, France.
E-mail address: bouchaud-g@univ-nantes.fr.

Abbreviations used: IL-15, interleukin-15; sIL-15R α , soluble IL-15R α ; aa, amino acid; sIL-15R α -sushi, soluble IL-15R α sushi domain; SPR, surface plasmon resonance; rIL-15, human recombinant IL-15; RLI, IL-15-sIL-15R α -sushi fusion protein; FCS, fetal calf serum.

those expressed on activated T cells each contain, in addition, a private chain (IL-2R α or IL-15R α) that confers cytokine specificity and enhanced affinity for cytokine binding. They can be activated with picomolar concentrations of either cytokine.³

Despite functional redundancy that was initially demonstrated *in vitro*, subsequent experiments indicated that IL-2 and IL-15 exert complementary actions *in vivo*. Although both cytokines play pivotal roles in innate and adaptive immunity, the major role of IL-2 now appears to limit continuous expansion of activated T cells, whereas IL-15 appears to be critical for the development of NK cells, the initiation of T-cell division, and the survival of memory T cells.⁴⁻⁶ A novel mechanism of IL-15 action is that of transpresentation, in which IL-15 and IL-15R α are coordinately expressed by antigen-presenting cells (monocytes and dendritic cells), and IL-15 bound to IL-15R α is presented *trans* to neighboring NK or CD8⁺ T cells expressing only the IL-15R β/γ receptor.⁷ As a costimulatory event occurring at the immunological synapse, IL-15 transpresentation now appears to be a dominant mechanism for IL-15 action *in vivo*^{8,9} and appears to play a major role in tumor immunosurveillance.¹⁰

The IL-15R α and IL-2R α subunits form a subfamily of cytokine receptors in that they comprise, at their N-terminus, extracellular parts—so-called “sushi” structural domains (one in IL-15R α and two in IL-2R α)—that are also found in complement or adhesion molecules.¹¹ In both cases, these sushi domains have been shown to bear most of the structural elements responsible for cytokine binding. Whereas IL-2R α alone is a low-affinity receptor for IL-2 ($K_d=10$ nM), IL-15R α binds IL-15 with high affinity ($K_d=100$ pM). The shedding of a soluble IL-2R α by proteolysis is a natural mechanism that participates in the down-regulation of lymphocyte activation. IL-2R α is cleaved by Der p1, a major mite allergen, thereby inhibiting Th1 cells and favoring an allergic environment,¹² and is also cleaved by tumor-derived metalloproteinases, resulting in suppression of the proliferation of cancer-encountered T cells.¹³ The soluble IL-2R α thus generated is a competitive inhibitor of IL-2 action *in vitro*. However, it remains a low-affinity IL-2 binder and is not likely to efficiently participate in down-regulation of IL-2 activity *in vivo*. The soluble form of the human IL-15R α can be similarly released from IL-15R α ⁺ cells by a shedding process involving matrix metalloproteinases.¹⁴ In contrast to soluble IL-2R α , soluble IL-15R α (sIL-15R α) receptor was able to bind IL-15 with high affinity and efficiently blocked proliferation driven through the high-affinity IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ signaling receptor. A similar shedding of the mouse IL-15R α has been reported.¹⁵ In subsequent studies, we showed that a recombinant sIL-15R α containing only its N-terminal sushi domain—although binding human IL-15 with high affinity and efficiently inhibiting IL-15 binding to isolated cell surface IL-15R α —was unable to block the proliferation of IL-15 mediated by the cell surface IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$.¹⁶ Unexpectedly, this IL-15R α -sushi isoform was also found

to enhance the binding of IL-15 to the intermediate-affinity IL-15R β/γ and the corresponding biological activity of IL-15 through this receptor. In this study, we further analyzed the molecular features that govern the agonistic and antagonistic activities of the sIL-15R α receptors.

Results

The exon-3-encoded domain of sIL-15R α markedly contributes to its high-affinity binding to IL-15 and its corresponding efficiency in competing with IL-15 binding to the membrane-anchored IL-15R α chain

In a previous study, we showed that removal of the sushi domain encoded by exon 2 of IL-15R α resulted in complete abrogation of IL-15 binding to membrane-anchored IL-15R α , demonstrating that the sushi domain was indispensable for cytokine binding.¹⁷ Subsequent studies showed that a naturally produced, full-length sIL-15R α was more efficient than the sushi domain of sIL-15R α in inhibiting the binding of IL-15 to membrane-anchored IL-15R α , suggesting that the sushi domain did not account for the full high-affinity binding and that other parts of IL-15R α ectodomain contributed to IL-15 binding.¹⁶ In order to address this hypothesis, different recombinant forms of sIL-15R α were produced in baculovirus and purified: sIL-15R α (Fig. 1) containing the entire extracellular domain, soluble IL-15R α sushi domain (sIL-15R α -sushi) corresponding to the N-terminal sushi domain, sIL-15R α -sushi⁺ corresponding to the N-terminal sushi domain plus the first 13-amino-acid (aa) peptide encoded by the third exon, and sIL-15R $\alpha\Delta 3$

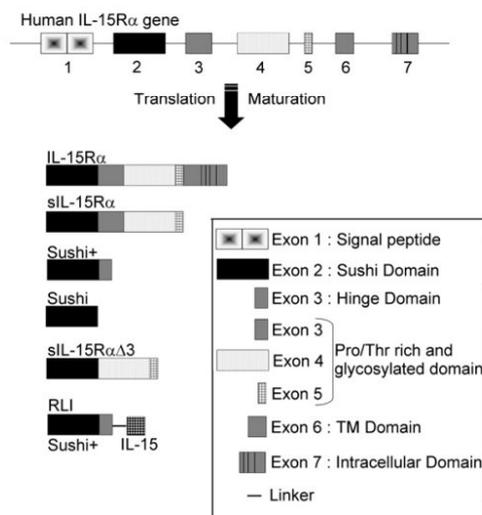


Fig. 1. Schematic diagram of the human IL-15R α gene and the IL-15R α variants used.

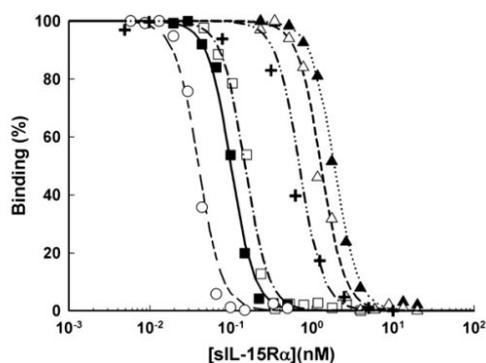


Fig. 2. Competition of the sIL-15R α variants with IL-15 binding to cell surface IL-15R α . TF-1 cells were equilibrated with a fixed concentration of radioiodinated human IL-15 (100 pM) and increasing concentrations of IL-15 (○), sIL-15R α (■), sIL-15R α -sushi (▲), sIL-15R α -sushi⁺ (□), sIL-15R α Δ 3 (△), and sIL-15R α P67A (+) mutant. Specific binding was calculated by subtracting nonspecific binding from total binding.

corresponding to the natural entire extracellular domain truncated off the region encoded by the third exon. The different forms of sIL-15R α were first compared for their ability to compete with radioiodinated IL-15 binding (used at a fixed concentration of 100 pM) to IL-15R α expressed by the human cell line TF-1, which also expresses the γ common chain, but not the IL-15R β chain. The four proteins completely inhibited IL-15 binding to TF-1 cells (Fig. 2). However, on a molar basis, the sushi domain was 19-fold less effective than the full-length sIL-15R α (IC₅₀ of 1900 pM and 100 pM, respectively) (Table 1A). Addition of 13-aa peptide at the C-terminus of the sushi domain (sushi⁺) markedly increased its inhibitory potency to reach an IC₅₀ value (150 pM) close to that of sIL-15R α . Conversely, absence of the exon-3-encoded domain (sIL-15R α Δ 3) resulted in a 13-fold reduction in inhibitory efficacy (IC₅₀ = 1300 pM).

These results were confirmed by kinetic analysis of the binding of IL-15 to the different sIL-15R α forms immobilized on a surface [surface plasmon reso-

nance (SPR) technology] (Fig. 3, Table 1A). As expected, sIL-15R α bound IL-15 with high affinity ($k_{on} = 1.37 \times 10^{-7} \text{ pM}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 1.56 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 114 \text{ pM}$). The IL-15R α sushi domain also bound IL-15, but with an about 80-fold-lower affinity mainly reflected by a more rapid off rate ($k_{on} = 1.3 \times 10^{-7} \text{ pM}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 9230 \text{ pM}$). Readdition of the first 13-aa peptide (sushi⁺) resulted in binding parameters (Fig. 3) similar to those of sIL-15R α ($k_{on} = 5.85 \times 10^{-7} \text{ pM}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 5.99 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 100 \text{ pM}$), and the absence in sIL-15R α of the exon-3-encoded domain (sIL-15R α Δ 3) resulted in a loss of binding affinity mainly due to an increase in the off rate ($k_{on} = 1.47 \times 10^{-7} \text{ pM}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{off} = 1.25 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $K_d = 850 \text{ pM}$) (Fig. 3 and Table 1A).

Altogether, these results show that, in addition to the sushi domain, the 13-aa peptide adjacent to the C-terminus of the sushi domain markedly contributes to the high-affinity binding of IL-15, mainly by decreasing its dissociation rate.

The exon-3-encoded domain of sIL-15 α regulates its antagonistic effect on IL-15-driven cell proliferation through the high-affinity IL-15R α / β / γ receptor

We previously reported that the full-length sIL-15R α was an inhibitor of IL-15-induced proliferation through the IL-15R α / β / γ receptor,¹⁴ and we subsequently showed that the sushi domain did not demonstrate such inhibitory effects.¹⁶ In order to further evaluate this difference, the four sIL-15R α forms were first compared for their capacity to inhibit the proliferation driven by IL-15 of the human lymphoma cell line Kit225 that expresses endogenous IL-15R α , IL-15R β , and IL-15R γ chains. In order to avoid any participation of low-affinity IL-15R β / γ receptors in the proliferative response, experiments were conducted in the presence of a saturating concentration of A41, a monoclonal antibody directed against the IL-15R β chain and was previously shown to specifically inhibit IL-15 activation of the IL-15R β / γ receptor without affecting the function of the IL-15R α / β / γ receptor.¹⁸ Under these conditions, Kit225 cells proliferate in response to low picomolar concentrations of IL-15 (EC₅₀ in the range of 10 pM) (Fig. 4c), reflecting activation of their IL-15R α / β / γ receptors.

Table 1. Binding properties of human IL-15

	A. To the IL-15R α variants as measured by competitive experiment (IB) or SPR (BIAcore)				B. To IL-15R β / γ in the absence or in the presence of sIL-15R α variants
	IB	BIAcore			Binding
		IC ₅₀ (pM)	K_d (pM)	k_{on} (pM ⁻¹ min ⁻¹)	
IL-15	25	NA	NA	NA	11,000
sIL-15R α	100	114	1.37×10^{-7}	1.56×10^{-5}	1000
sushi ⁺	150	102	5.85×10^{-7}	5.99×10^{-5}	1100
sushi	1900	9230	1.30×10^{-7}	1.20×10^{-3}	5500
sIL-15R α Δ 3	1300	850	1.47×10^{-7}	1.25×10^{-4}	5000

NA: not applicable.

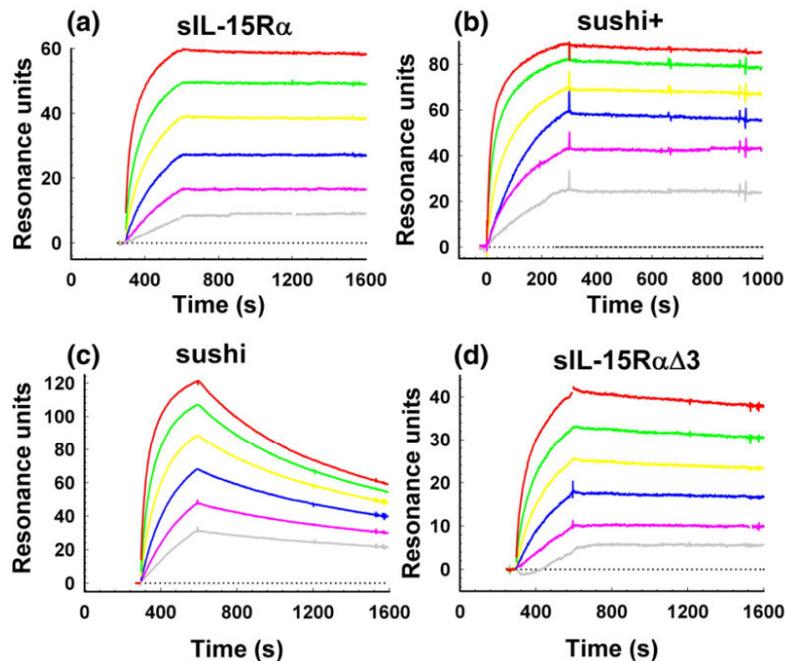


Fig. 3. Binding affinities of the sIL-15R α variants for IL-15. SPR sensorgrams of binding to immobilized sIL-15R α (a), sushi⁺ (b), sushi (c), or sIL-15R α Δ 3 (d) with increasing concentrations of rIL-15 (3.1 nM, 6.2 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, and 100 nM).

As shown in Fig. 4a, Kit225 proliferation induced by 10 pM human recombinant IL-15 (rIL-15) was inhibited in a dose-dependent manner by sIL-15R α with an IC₅₀ of 18 pM. In contrast, the sIL-15R α -sushi protein was unable to affect this proliferation, even at concentrations as high as 100 nM. Remarkably, addition to sIL-15R α -sushi of the 13-aa peptide (sushi⁺) completely restored inhibitory capacity. Furthermore, absence in sIL-15R α Δ 3 of the exon-3-encoded sequence strongly reduced (30-fold) inhibitory potency (IC₅₀ of 745 pM) (Table 2A). In Fig. 4c are shown the effects of low and fixed (15 pM) concentrations of the different sIL-15R α forms on the IL-15 dose-response curve of Kit225 cells. Again, sIL-15R α and sIL-15R α -sushi⁺ markedly shifted the dose-response curve towards higher IL-15 concentrations; sIL-15R α -sushi had no effect, while sIL-15R α Δ 3 was less potent than sIL-15R α . Similar results were obtained with the CTLL-2 murine cell line that expresses endogenous murine IL-15R α , IL-15R β , and IL-15R γ chains, and with the 32D β R cell line that expresses endogenous murine IL-15R γ chain and transfected human IL-15R α and IL-15R β chains (data not shown).

The X-ray structure of the complex of IL-15 with a recombinant sIL-15R α that contains the sushi domain and a 20-aa extension has been recently established.¹⁹ This study shows that within the 13-aa sequence that we identify here, residues Pro67 and His71 are involved in the interaction with IL-15. We therefore introduced point mutations at positions

Pro67 and His71 on full-length sIL-15R α and tested the activity of the mutants on IL-15-induced proliferation of Kit225 (Fig. 4b). While sIL-15R α H71A showed an inhibitory activity similar to wild-type sIL-15R α , sIL-15R α P67A had a strongly reduced inhibitory potency (IC₅₀=300 pM), and its effect was similar to that of sIL-15R α Δ 3 (Fig. 4a). The P67A mutation was also introduced in the context of the full-length sIL-15R α . In the IL-15 competition assay in TF-1 cells (Fig. 2), the P67A mutation markedly reduced the inhibitory potency of sIL-15R α . Its effect was similar to the deletion of exon 3, in correlation with the proliferation data.

All sIL-15R α species increase IL-15 induction of cell proliferation through the low-affinity IL-15R β / γ receptor with respective efficiencies that correlate with enhancement of IL-15 binding to IL-15R β / γ

We next compared the effects of the different sIL-15R α forms on IL-15-driven proliferation through the IL-15R β / γ by using the Mo7e cell line that expresses human IL-15R β and IL-15R γ , but not IL-15R α . Mo7e cells proliferated in response to IL-15 with an EC₅₀ of 4 nM (Fig. 5b)—a value in agreement with the activation of intermediate-affinity IL-15R β / γ receptors. Addition of a fixed concentration (10 nM) of any of the four sIL-15R α forms resulted in an increase in IL-15 efficiency by shifting the IL-15 dose-response curve towards lower concentrations.

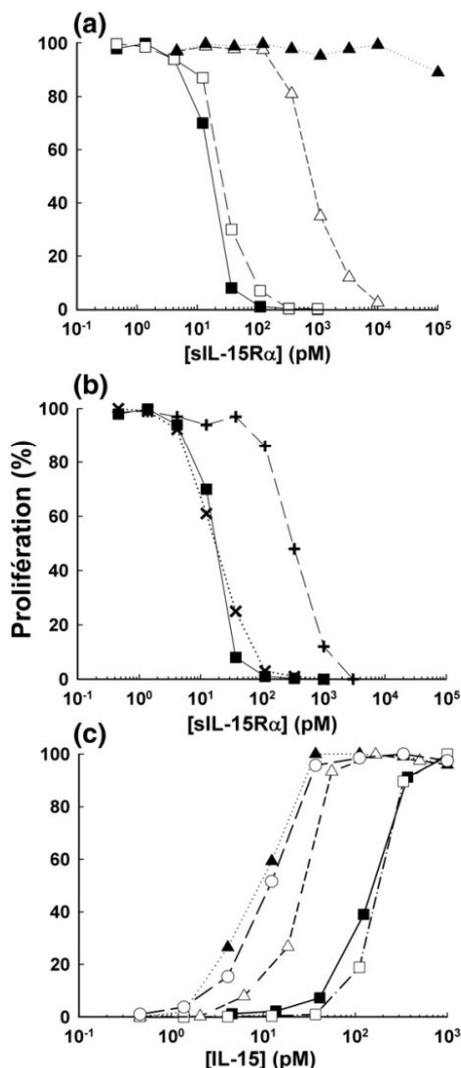


Fig. 4. Effects of sIL-15R α variants on IL-15-induced cell proliferation through the cell surface high-affinity IL-15R α / β / γ . Cell proliferation was evaluated by incorporation of [³H]thymidine. (a) Kit225 cells were incubated with a fixed concentration of IL-15 (10 pM) and increasing concentrations of sIL-15R α (■), sIL-15R α -sushi⁺ (□), sIL-15R α -sushi (▲), or sIL-15R α Δ 3 (△). Data are presented as means and are representative of three independent experiments. (b) Kit225 cells were cultured with 10 pM IL-15 and increasing concentrations of sIL-15R α (■), sIL-15R α H71A (×), or sIL-15R α P67A (+) mutants. (c) Kit225 cells were cultured with increasing concentrations of rIL-15 (○) in the absence or in the presence of a fixed concentration (15 pM) of sIL-15R α (■), sIL-15R α -sushi⁺ (□), sIL-15R α -sushi (▲), or sIL-15R α Δ 3 (△).

Full-length sIL-15R α and sIL-15R α -sushi⁺ were the most potent, with similar effects (about 100-fold shifts), whereas sIL-15R α -sushi and sIL-15R α Δ 3

had lower effects (4- to 12-fold shifts). The IL-15 dose-response curves observed in the presence of sIL-15R α or sIL-15R α -sushi⁺ are very close to the ones depicting IL-15 action on IL-15R α / β / γ cells (Fig. 4c). When comparing the dose-response curves of each sIL-15R α form at a fixed nonsaturating concentration of IL-15 (1 nM) (Fig. 5a), a similar order of potencies was observed, with sIL-15R α and sIL-15R α -sushi⁺ being the most potent (IC₅₀ of 12 pM and 21 pM), and with sIL-15R α -sushi and sIL-15R α Δ 3 displaying lower potencies (IC₅₀ of 170 pM and 70 pM) (Table 2B).

We also analyzed the effects of the sIL-15R α species on the binding of radioiodinated IL-15 binding to Mo7e cells (Fig. 5c and Table 1B). As expected, these cells bound IL-15 with intermediate affinity (K_d = 11 nM), with a maximal number of 1200 binding sites per cell. All four sIL-15R α species increased IL-15 binding by decreasing the dissociation constant (K_d) without significantly affecting the maximal number of binding sites. The order of potency was in agreement with the proliferation data: sIL-15R α and sIL-15R α -sushi⁺ (used at saturating concentrations of 50 nM) increased IL-15 affinity by 10-fold, whereas sIL-15R α -sushi and sIL-15R α Δ 3 increased this affinity by only 2-fold. Together, these experiments indicate that the IL-15-potentiating (agonistic) effects of the different sIL-15R α species on cell proliferation correlate with their enhancing effects on IL-15 binding to IL-15R β / γ .

Unlike the complex of sIL-15R α -sushi⁺ and IL-15, the sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 fusion protein is able to bind with high affinity and to activate the IL-15R α / β / γ receptor

We previously engineered a fusion protein [soluble IL-15R α sushi domain-IL-15 fusion protein (RLI)] between sIL-15R α and IL-15.¹⁶ This protein contains the exon-3-encoded 13-aa peptide adjacent to the C-terminus of sIL-15R α -sushi and thus corresponds to sIL-15R α -sushi⁺ linked to IL-15. We therefore anticipated that this fusion protein would behave like the complex sIL-15R α -sushi⁺-IL-15. In Fig. 6 are compared the properties of an equimolar association of sIL-15R α -sushi⁺ and IL-15 (sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 complex) with those of RLI. On IL-15R β / γ expressed by Mo7e cells (Fig. 6a), RLI and the sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 complex, as expected, displayed similar efficiencies (EC₅₀ of 20 pM and 70 pM, respectively) in enhancing proliferative activity and were far more efficient than IL-15 alone (EC₅₀ = 4000 pM). They were further compared in the context of activation of the IL-15R α / β / γ receptor (Kit225) in the presence of the A41 monoclonal antibody (Fig. 6b). The sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 complex had a 10-fold reduced activity compared to IL-15 alone, in agreement with the inhibitory effect of sIL-15R α -sushi⁺ on IL-15 activity (Fig. 4a). In contrast and unexpectedly, the RLI fusion protein, despite the fact that it contains sIL-15R α -sushi⁺ covalently attached to IL-15, was as efficient as IL-15 in inducing cell proliferation through IL-15R α / β / γ (EC₅₀ = 20 pM).

Table 2. Biological properties of the sIL-15R α variants on cell proliferation

IL-15	Receptor	A. Inhibitory effect IC ₅₀ (pM) ^a	B. Enhancing effect EC ₅₀ (pM) ^b
+	—		
+	sIL-15R α	18	12
+	sushi ⁺	24	21
+	sushi	>100,000	170
+	sIL-15R α Δ 3	745	70

^a The inhibitory effect on the cell (Kit225) bearing the IL-15R α / β / γ receptor was measured at a concentration of 10 pM IL-15.

^b The enhancing effect on the cell (Mo7e) bearing the β / γ receptor was measured at a concentration of 1 nM IL-15.

We further compared the binding of IL-15, RLI, and the sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 complex to the IL-15R α / β / γ receptor on Kit225 (Fig. 6c). IL-15 alone bound with high affinity ($K_d=30$ pM; $B_{max}=$

350 sites/cell). Binding of radioiodinated IL-15 was markedly reduced when it was complexed with equimolar concentrations of sIL-15R α -sushi⁺ ($K_d=1000$ pM; $B_{max}=400$ sites/cell), showing that sIL-15R α -sushi⁺ inhibits IL-15 binding to IL-15R α / β / γ —a result in agreement with its inhibitory effect on IL-15 action. Furthermore, when the sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 complex was iodinated through its sIL-15R α -sushi⁺ moiety, no binding to IL-15R α / β / γ could be observed, indicating that the binding of iodinated IL-15 still observed in the presence of sIL-15R α -sushi⁺ likely reflected binding of IL-15 released from the complex during the experiment. In control, we verified that the iodination of sIL-15R α -sushi⁺ did not impair the binding of the sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 complex to IL-15R β / γ (data not shown). Again and in contrast to the sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 complex, the fusion protein RLI was able to bind cell surface IL-15R α / β / γ with high affinity and with

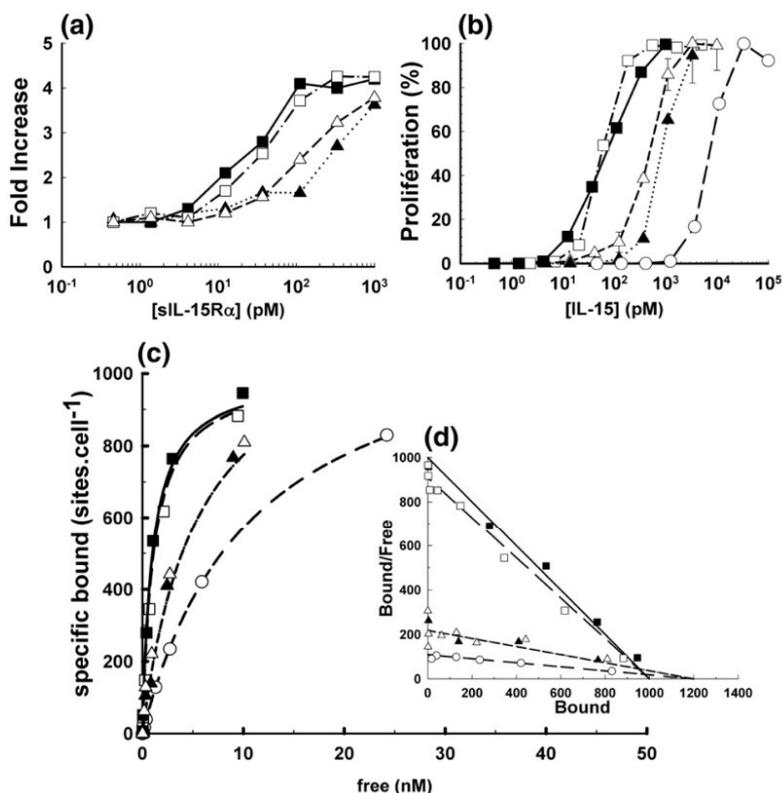


Fig. 5. Effects of sIL-15R α variants on binding and cell proliferation through the cell surface low-affinity IL-15R β / γ . Cell proliferation was evaluated by incorporation of [³H]thymidine. (a) Mo7e cells were cultured with increasing concentrations of sIL-15R α (■), sIL-15R α -sushi⁺ (□), sIL-15R α -sushi (▲), or sIL-15R α Δ 3 (△), and a fixed concentration of rIL-15 (1 nM). (b) Mo7e cells were cultured with increasing concentrations of rIL-15 (○) in the absence or in the presence of a fixed concentration (10 nM) of sIL-15R α (■), sIL-15R α -sushi⁺ (□), sIL-15R α -sushi (▲), or sIL-15R α Δ 3 (△). Data are presented as means of triplicate wells and are representative of three independent experiments. (c) Mo7e cells were equilibrated in the presence of increasing concentrations of radioiodinated human IL-15 without (○) or with a fixed concentration (50 nM) of sIL-15R α (■), sIL-15R α -sushi⁺ (□), sIL-15R α -sushi (▲), or sIL-15R α Δ 3 (△). Specific binding was calculated by subtracting nonspecific binding from total binding. (d) Scatchard plots.

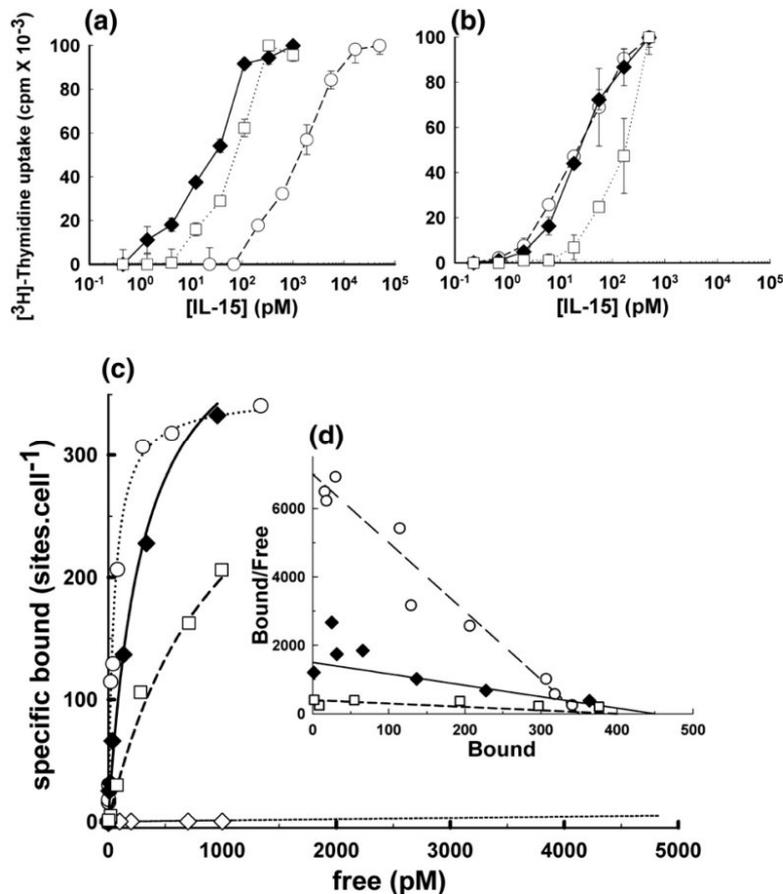


Fig. 6. Effects of RLI fusion protein and equimolar mixture of IL-15 and sIL-15R α -sushi⁺ on binding and cell proliferation through cell surface IL-15R β/γ and IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$. Cell proliferation was evaluated by incorporation of [^3H] thymidine. (a) Mo7e or (b) Kit225 cells were incubated with increasing concentrations of IL-15 (O), RLI (\blacklozenge), or IL-15-sIL-15R α -sushi⁺ equimolar mixture (\square). Data are presented as the mean \pm SD of triplicate wells and are representative of two independent experiments. (c) Kit225 cells were equilibrated with increasing concentrations of radioiodinated human IL-15 (O), RLI (\blacklozenge), equimolar mixture of radioiodinated IL-15 and sIL-15R α -sushi⁺ (\square), or equimolar mixture of IL-15 and radioiodinated sIL-15R α -sushi⁺ (\diamond). Specific binding was calculated by subtracting nonspecific binding from total binding. (d) Scatchard plots.

a similar binding capacity as IL-15 ($K_d=270$ pM; $B_{\max}=450$ sites/cell).

Discussion

Former studies showed the indispensable role of the exon-2-encoded sushi domain of IL-15R α for IL-15 binding.^{16,17} In this study, we show that the exon-3-encoded part of the receptor, more particularly the 13-aa peptide sequence that is located at the C-terminus of the sushi domain, has also a major role in stabilizing the high-affinity complex between IL-15 and its specific receptor chain. Experiments were performed with recombinant forms of IL-15R α that were all produced in the same expression system (baculovirus in insect cells) and purified

with the same procedure, therefore ruling out any differences that could be generated from the origin of the proteins or their purification procedures, as suggested in our previous study.¹⁶ As judged by direct binding to IL-15 (SPR experiments), as well as by competition with IL-15 binding to cell surface IL-15R α , absence of the exon-3-encoded part of sIL-15R α induced approximately a 10-fold decrease in its affinity for IL-15, while elongation of sIL-15R α -sushi by 13 aa induced a 20-fold increase in its binding affinity to reach a value close to the high affinity of full-length sIL-15R α . Several recent reports contributed to solve the structure of IL-15 with sIL-15R α -sushi or extended sIL-15R α -sushi.^{19,20} These studies showed that the high-affinity binding was mainly accounted for by high electrostatic and geometric complementarity between IL-15 and IL-

15R α binding surfaces. The binding interface could be divided into three regions: a middle one that forms the core of the interface and two flanking (top and bottom) regions. The 13-aa peptide present in sIL-15R α -sushi⁺ participates in the bottom interface, mainly by a hydrogen bond between His71 of IL-15R α , and Glu87 of IL-15, and by van der Waals contacts between Pro67 of IL-15R α , and Glu87, Glu89, and Glu90 of IL-15.¹⁹ The kinetic values determined in the present study by SPR indicate that the main effect of the contacts between the 13-aa peptide of sIL-15R α -sushi⁺ and IL-15 is reduction in the dissociation rate (k_{off}) of the complex by 20-fold and, therefore, mainly contribution to the height of the activation barrier between the IL-15R α -IL-15 complex and the free molecules. Thermodynamically, the contribution of the 13-aa peptide was calculated to account for about 10–20% (5.6–11.4 kJ/mol) of the free energy of interaction between IL-15R α and IL-15.

In IL-2R α , the homolog of the exon-3-encoded region of IL-15R α that contains the 13-aa peptide is the segment linking the two sushi domains of IL-2R α . Resolution of the IL-2-IL-2R α complex structure revealed that the folding topology of IL-2R α exhibits swapping of β strands across its two sushi domains, so that the linker segment is unlikely to contribute to IL-2 binding (Fig. 7a). In addition, the region of IL-2R α adjacent to the C-terminal of the second sushi domain does not contribute to IL-2 binding.²¹ Therefore, the contribution of the 13-aa peptide of IL-15R α in the IL-15 binding shown here is unlikely to have an equivalent in the context of the IL-2-IL-2R α interaction. This could be one element explaining the difference of affinity between IL-2R α binding to IL-2 ($K_d = 10$ –30 nM) and IL-15R α binding to IL-15 ($K_d = 30$ –100 pM), with this difference being mainly due to a faster k_{off} in the case of the IL-2-IL-2R α interactions.²² Indeed, the k_{off} of the IL-2-IL-2R α interaction resembles that of the interaction of IL-15 with the IL-15R α -sushi domain, lacking the 13-aa peptide encoded by exon 3, as determined here and previously.¹⁶

The release of sIL-15R α species has been shown to be a natural mechanism that might play a role in the regulation of IL-15 action either by antagonizing the action of IL-15 or, on the contrary, by enhancing the efficiency of IL-15 action.^{14,23} In a previous study, we showed that human sIL-15R α -sushi, in complex with IL-15, enhanced the efficiency of functional activation of the low-affinity IL-15R β/γ receptor.¹⁶ In this study, we show that all four sIL-15R α forms tested share this property (Fig. 8b). Their efficiencies in enhancing IL-15-driven proliferation through IL-15R β/γ were correlated with their ability to enhance IL-15 binding to the membrane IL-15R β/γ and their binding affinity for IL-15. Accordingly, in the IL-15R β/γ context, the 13-aa peptide C-terminal to the IL-15R α -sushi domain plays a role that is proportional to its contribution to the binding affinity of IL-15R α to IL-15. sIL-15R α -sushi⁺ had an agonistic effect comparable to that of full-length sIL-15R α , whereas sIL-15R α -sushi displayed an about 15-fold reduced effect.

A recent study showed that a mouse sIL-15R α form containing the sushi domain plus five residues at its C-terminus was as effective as the corresponding mouse full-length sIL-15R α form in enhancing the biological activity of mouse IL-15 in the context of IL-15R β/γ .²³ This mouse sIL-15R α form contains a proline residue (Pro68) equivalent to Pro67 in human sIL-15R α predicted to engage contacts with IL-15 residues. However, it does not contain the other residue in this region (mouse His72, equivalent to human His71) predicted to contact IL-15. Comparison of these observations with ours therefore suggests that the increase in IL-15 activity and IL-15 binding provided by the hinge region C-terminal to IL-15R α -sushi domain is mainly due to contacts made by Pro67 (or Pro68 in mouse) with IL-15, rather than to those engaged by His71 (or His72 in mouse). Our site-directed mutagenesis experiments support this hypothesis by showing that the Pro67 residue in the 13-aa peptide plays a major role in the antagonistic activity of sIL-15R α , whereas the His71 residue does not.

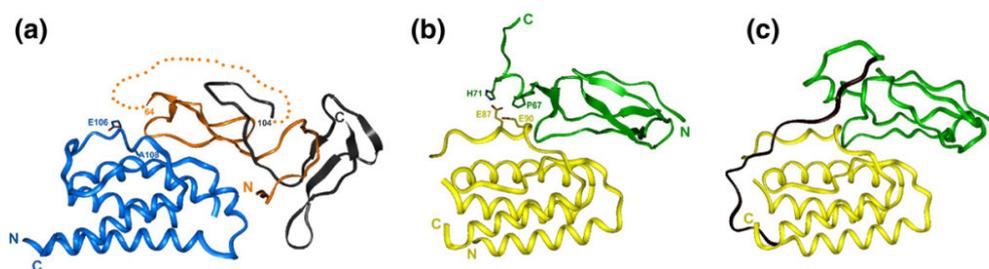


Fig. 7. Structural comparison of IL-2-IL-2R α and IL-15-IL-15R α complexes and RLI. Ribbon diagram of the complex of IL-2 (a) or IL-15 (b) with their respective receptor α chain (Protein Data Bank accession codes 1z92 and 2z3q, respectively), showing the side chains of Pro67 (P67) and His71 (H71) residues of IL-15R α making hydrogen bonds or van der Waals contacts with Glu87 (E87) and Glu90 (E90) of IL-15, as well as the side chains of the corresponding residues in IL-2, Glu106 (E106), and Ala108 (A108). (c) Three-dimensional model structure of the fusion protein RLI. Blue, IL-2; orange and gray, IL-2R α ; yellow, IL-15; green, IL-15R α ; black, RLI linker. 'C' and 'N': positions of the C-terminal and N-terminal ends of each protein.

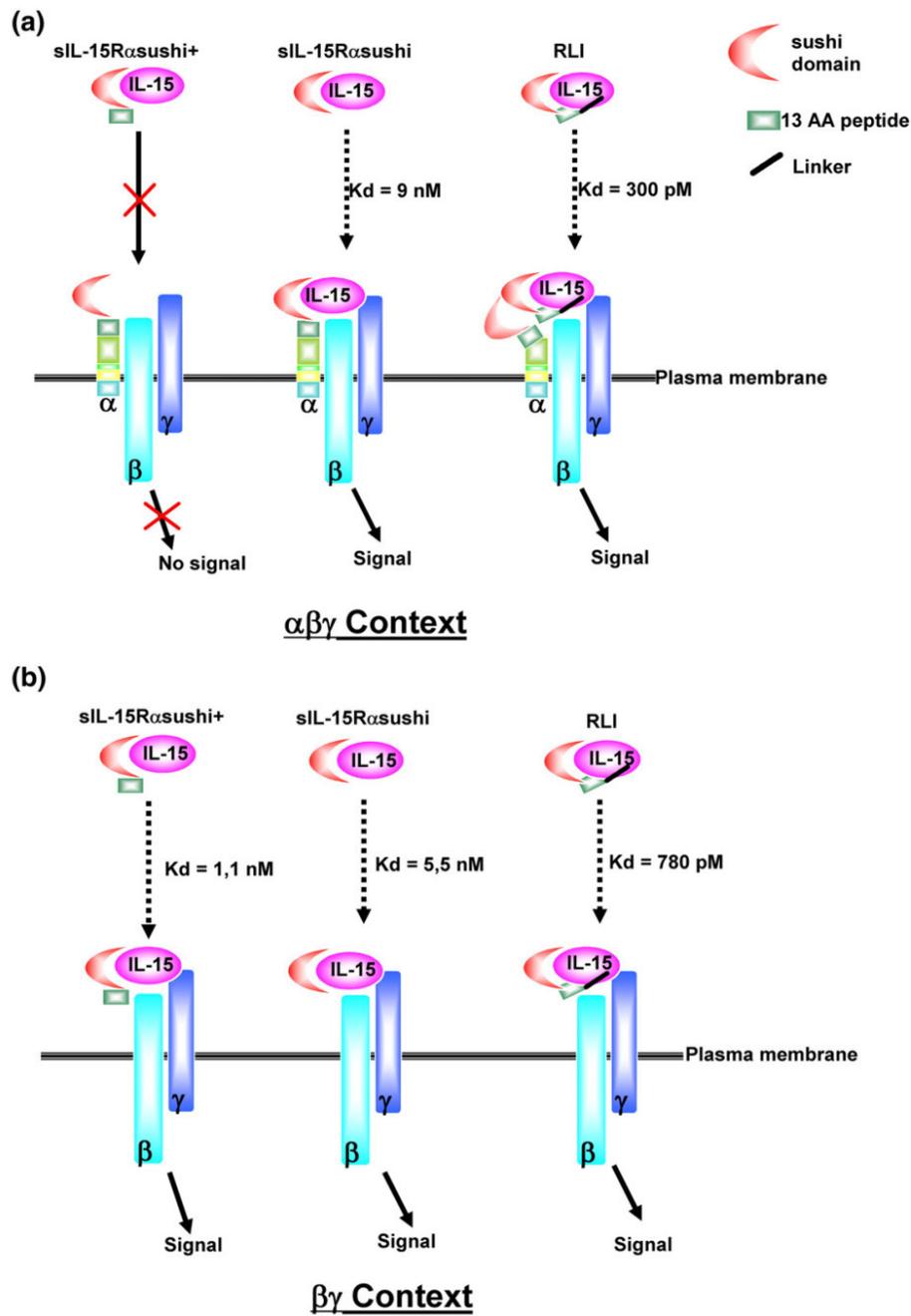


Fig. 8. Proposed models for the differential effects of the sIL-15R α variants. (a) In the context of IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$, IL-15 binding and signaling were inhibited by sIL-15R α -sushi⁺, as well as by sIL-15R α , but not by sIL-15R α -sushi. RLI is able to bind and activate this receptor probably because of an effect of the linker on the position of the 13-aa peptide. (b) In the context of IL-15R β/γ , all sIL-15R α variants-IL-15 complexes activate the IL-15R β/γ receptor more efficiently than IL-15 alone. This agonistic effect is more efficient with sIL-15R α and sIL-15R α -sushi⁺ than with sIL-15R $\alpha\Delta 3$ and sIL-15R α -sushi. RLI fusion protein is as efficient as IL-15-sIL-15R α -sushi⁺.

We and others previously showed that a naturally produced sIL-15R α was a potent antagonist of IL-15-induced cell proliferation mediated by the IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ receptor.^{14,15} In this study, we further show that this antagonistic property is linked to the presence of the 13-aa peptide C-terminal to the IL-15R α -sushi domain and, among these amino acids, that Pro67 appears to play a major role. Indeed, whereas sIL-15R α -sushi⁺ was as effective as full-length sIL-15R α in inhibiting IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ -driven cell proliferation, sIL-15R α -sushi had no inhibitory effect even at concentrations (100 nM) far higher than those required to saturate IL-15 (Fig. 8a). Accordingly, the absence of exon-3-encoded domain resulted in a 50-fold decrease in the inhibitory efficiency of full-length sIL-15R α , a result mirrored by the P67A mutation. These experiments demonstrate that the IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ receptor can adapt a complex of IL-15 with sIL-15R α -sushi, but not a complex of IL-15 with sIL-15R α -sushi⁺. Thus, the 13-aa peptide adjacent to the C-terminus of IL-15R α -sushi appears to create a sterical constraint impeding sIL-15R α -sushi⁺-IL-15 binding to IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ and activation of IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$. The molecular basis for this constraint likely involves the participation of the membrane-anchored IL-15R α chain, given the fact that the IL-15-sIL-15R α -sushi⁺ complex can bind to and activate the IL-15R β/γ receptor.

Also much less active than full-length sIL-15R α in inhibiting IL-15 activation of IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$, and despite the absence of the 13-aa peptide in its structure, sIL-15R $\alpha\Delta 3$ retains some inhibitory potency. This indicates that its highly glycosylated stem region (encoded by exons 4 and 5) C-terminal to the sushi domain might also create sterical constraints impeding binding of the sIL-15R $\alpha\Delta 3$ -IL-15 complex to IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ and activation of cell surface IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$. This constraint is likely nonspecific, as the stem region is not involved in IL-15 binding.

Despite the presence of the 13-aa peptide in its structure, and in contrast to the noncovalent complex between sIL-15R α -sushi⁺ and IL-15, the RLI fusion molecule was found to be a strong binder and activator of the IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ receptor. Therefore, it appears that the molecular constraints brought about by the 13-aa peptide in the noncovalent complex no longer exist in the frame of the fusion molecule. This suggests that the linker used to attach sIL-15R α -sushi⁺ to IL-15 has an effect on the conformation of the 13-aa peptide. The length of this linker was chosen on the basis of our molecular modeling of the IL-15-sIL-15R α -sushi⁺ complex²⁴ because of the nonavailability of the crystal structure at that time. Now, with the recent crystal structure,¹⁹ the molecular modeling of RLI (Fig. 7c) shows that the linker is a little too short to respect the distance between the C-terminus of the sIL-15R α -sushi⁺ and the N-terminus of IL-15. As a result, it could modify the position of the 13-aa peptide of exon 3 and allow binding of the complex to IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$. This could explain the high agonist activity of RLI that was first demonstrated *in vitro*¹⁶

and further shown *in vivo* on the mobilization of NK cells in a mouse model.²⁵

Naturally produced full-length sIL-15R α that behaves as IL-15 antagonist has been described in mice and humans.^{14,15} Soluble sIL-15R α sushi isoforms that behave as agonists are also generated in mouse.²³ Additional soluble isoforms can also potentially be cleaved from membrane IL-15R α isoforms lacking exon-3- and/or exon-4-encoded domains.¹⁴ Our present results suggest that the presence or absence of the 13-aa peptide in these soluble isoforms will determine their ability to act as antagonists of the action of IL-15 on the IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ receptor. Meanwhile, all these soluble isoforms are predicted to be agonists of the action of IL-15 in the context of the IL-15R β/γ . This finding is important for our understanding of how the balance between these different sIL-15R α isoforms will tune the biological action of IL-15 under physiologic or pathologic conditions, and could also lead to the engineering of novel therapeutic means to manipulate this balance.

Experimental Procedures

Cell culture and cytokines

rIL-15 was purchased from Peprotech, Inc. (Rocky Hill, NJ). The TF-1 erythroleukemia human cell line (ATCC CRL-2003) was cultured in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, and 1 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (R&D Systems, Abington, UK). The Mo7e myeloid leukemia human cell line²⁶ was cultured in the same medium with 10 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. The Kit225 T lymphoma human cell line²⁷ was cultured in RPMI 1640 medium containing 6% FCS, 2 mM glutamine, and 10 ng/ml human rIL-2 (Chiron, Emeryville, CA).

sIL-15R α , sIL-15R α -sushi⁺, sIL-15R α -sushi, and sIL-15R $\alpha\Delta 3$

Plasmids corresponding to the natural extracellular forms of IL-15R α (pFB R15s and pFB R15s $\Delta 3$) were generated by PCR using the sense primer 5'-CGGGATCC-CAGTCCAGCGGTGTCCTGTGG (nested restriction site underlined) and the antisense primer 5'-CTAGAGCGGCCGCTTACACAGTGGTGTGCGCTGT. A plasmid corresponding to the shorter forms of IL-15R α (pFB sushi and pFB sushi⁺) was generated by using the already mentioned sense and antisense primers (5'-CTAGAGCGGCCGCTCAGTCTCTAATGCATTGAG and 5'-CTAGAGCGGCCGCTCAGGGTGGCGCTGGCC-TTGGT, respectively). Amino acid switching was performed using the Quick change site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). After amplification, the DNA fragments were ligated between the BamHI and NotI sites of the pFast Bac baculovirus expression vector (InVitrogen). A sequence coding for the Flag epitope and Factor Xa binding site (DYKDDDDKIEGR) was added between the endogenous signal peptide and the coding sequences. The expression cassettes were recombined into the baculovirus DNA using the Bac-to-Bac expression system (InVitrogen).

The recombinant baculoviruses were used to infect SF9 cells, and sIL-15R α isoforms were expressed in the SF900 II medium and harvested 3 days postinfection. The pH of the medium was increased to 8.5 with NaOH, then centrifuged at 10,000g for 15 min and filtered through 0.22 μ m. It was concentrated and changed to 50 mM Tris (pH 7.4) and 150 mM NaCl in an Amicon chamber equipped with a 10,000-molecular weight cut off or a 5000-molecular weight cut off membrane. The soluble receptors were purified on an anti-FLAG-agarose affinity column (Sigma-Aldrich) and eluted with 0.1 M glycine-HCl (pH 3.5). The purified proteins were concentrated and buffer-changed to phosphate-buffered saline using Vivaspin (Sartorius). The purity of the protein was checked on protein 200 plus Labchip (Agilent Technologies), and the concentration was determined by bicinchoninic acid assay (Pierce).

Surface plasmon resonance

The SPR experiments were performed at 25 °C with a BIAcore 3000 biosensor (GEHealthcare, Chalfont St. Giles, Royaume-Uni). sIL-15R α or its variants purified from baculovirus were covalently linked to CM5 sensor chips using the amine coupling method in accordance with the manufacturer's instructions, and the binding of increasing concentrations of IL-15 was monitored as described.¹⁶ The BiaEval 4.1 Software was used to fit data.

Proliferation assays

The proliferative responses of different cells line to IL-15 and the inhibitory or enhancing activity of sIL-15R α on these responses were measured by [³H]thymidine incorporation essentially as described,²⁸ in the presence of anti-IL-15R β A41 antibody (66 nM) for Kit225.

Binding assays

rIL-15, sIL-15R α -sushi⁺, and RLI were radiolabeled with ¹²⁵I-labeled iodine (with specific radioactivity of approximately 2000 cpm/fmol) using a chloramine T method.²⁹ To measure IL-15 binding to IL-15R β / γ on Mo7e, and RLI binding to IL-15R α / β / γ on Kit225, or to IL-15R α on TF-1, cells were maintained in culture medium for 3 days and starved for 4 h in medium without cytokine. They were then seeded in multiwell plates at 10⁶ cells/well in 50 μ l and cultured for 1 h at 4 °C in phosphate-buffered saline, 0.5% bovine serum albumin, and 2% FCS, in the presence of anti-IL-15R β A41 antibody (66 nM) for Kit225 cells, supplemented with or without a fixed concentration of sIL-15R α and increasing concentrations of iodinated rIL-15 or RLI alone. Nonspecific binding was determined in the presence of a 100-fold excess of unlabeled rIL-15 and subtracted from total binding. Regression analysis of the binding data was accomplished using a one-site equilibrium binding equation (Graphit; Erithacus Software, Staines, UK), and data were plotted in the Scatchard coordinate system. To measure inhibition of rIL-15 binding to isolated IL-15R α , TF-1 cells were incubated with a fixed concentration of iodinated rIL-15 and increasing concentrations of different forms of sIL-15R α .

Molecular modeling of RLI

RLI was modeled based on the X-ray crystallographic structure of the human IL-15-IL-15R α complex (Protein

Data Bank code 1z92) and using the Biopolymer module of InsightII to insert the linker peptide (NH₂-GGSGGGGSGGGSGGGSLQ-COOH) between the C-terminus of IL-15R α -sushi⁺ and the N-terminus of IL-15. The fused molecule was then energy-minimized using Discover module, Cff91 force field implemented into InsightII (Accelrys, San Diego, CA), and the 100 steepest-descent steps, followed by conjugate gradient steps. The conformation of the linker peptide was further refined using the refine-loop option of the Modeller module of InsightII.³⁰ RLI-generated models were further minimized, and the lowest-energy model was chosen.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by INSERM, the CNRS, the Association de la Recherche Contre le Cancer (grant A03/1/3311), and Région Pays de Loire (CIMATH network). The costs of publication of this article were defrayed, in part, by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC Section 1734 solely to indicate this fact. G.B and E.M. were supported by fellowships from the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies, and E.M. was supported by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Ligue Nationale Contre le Cancer. V.S. was supported by a fellowship from the Agence National de la Recherche (05-EHPB-011). L.G.-A. was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies and the Région Pays de Loire.

We thank Patricia Vusio for technical assistance with BIAcore.

References

- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V. *et al.* (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, **264**, 965–968.
- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S. *et al.* (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13**, 2822–2830.
- Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A. *et al.* (1995). Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29862–29869.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M. *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.
- Lodolce, J. P., Burkett, P. R., Boone, D. L., Chien, M., & Ma, A. (2001). T cell-independent interleukin 15R α signals are required for bystander proliferation. *J. Exp. Med.* **194**, 1187–1194.
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrarri-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R. & Strom, T. B. (2001). IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells *in vivo*. *Nat. Med.* **7**, 114–118.

7. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A. & Tagaya, Y. (2002). IL-15R α recycles and presents IL-15 in *trans* to neighboring cells. *Immunity*, **17**, 537–547.
8. Burkett, P. R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Ma, A. & Boone, D. L. (2003). IL-15R α expression on CD8⁺ T cells is dispensable for T cell memory. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 4724–4729.
9. Schluns, K. S., Stoklasek, T. & Lefrancois, L. (2005). The roles of interleukin-15 receptor alpha: *trans*-presentation, receptor component, or both? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1567–1571.
10. Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T. A. & Tagaya, Y. (2005). Role of *trans*-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*, **105**, 721–727.
11. Norman, D. G., Barlow, P. N., Baron, M., Day, A. J., Sim, R. B. & Campbell, I. D. (1991). Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J. Mol. Biol.* **219**, 717–725.
12. Schulz, O., Sewell, H. F. & Shakib, F. (1998). Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp. Med.* **187**, 271–275.
13. Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C. & Lin, R. H. (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* **61**, 237–242.
14. 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**, 1681–1688.
15. Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Ludwig, A., Rose-John, S., Saftig, P. *et al.* (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.
16. Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grotzinger, J. *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 / γ . Hyperagonist IL-15 \times IL-15R α fusion proteins. *J. Biol. Chem.* **281**, 1612–1619.
17. Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raheer, S., Bernard, J., Boisteau, O. *et al.* (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.
18. Lehours, P., Raheer, S., Dubois, S., Guo, J., Godard, A. & Jacques, Y. (2000). Subunit structure of the high and low affinity human interleukin-15 receptors. *Eur. Cytokine Network*, **11**, 207–215.
19. Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., Kai, H. *et al.* (2007). Crystal structure of the IL-15-IL-15R α complex, a cytokine-receptor unit presented in *trans*. *Nat. Immunol.* **8**, 1001–1007.
20. Olsen, S. K., Ota, N., Kishishita, S., Kukimoto-Niino, M., Murayama, K., Uchiyama, H. *et al.* (2007). Crystal structure of the interleukin-15-interleukin-15 receptor alpha complex: insights into *trans* and *cis* presentation. *J. Biol. Chem.* **282**, 37191–37204.
21. Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N. & Garcia, K. C. (2005). The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science*, **308**, 1477–1480.
22. Shanafelt, A. B., Lin, Y., Shanafelt, M. C., Forte, C. P., Dubois-Stringfellow, N., Carter, C. *et al.* (2000). A T-cell-selective interleukin 2 mutein exhibits potent antitumor activity and is well tolerated *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1197–1202.
23. Bulanova, E., Budagian, V., Duitman, E., Orinska, Z., Krause, H., Ruckert, R. *et al.* (2007). Soluble Interleukin IL-15R α is generated by alternative splicing or proteolytic cleavage and forms functional complexes with IL-15. *J. Biol. Chem.* **282**, 13167–13179.
24. Quemener, A., Bernard, J., Mortier, E., Plet, A., Jacques, Y. & Tran, V. (2006). Docking of human interleukin-15 to its specific receptor alpha chain: correlation between molecular modeling and mutagenesis experimental data. *Proteins*, **65**, 623–636.
25. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510.
26. Meazza, R., Basso, S., Gaggero, A., Detotero, D., Trentin, L., Pereno, R. *et al.* (1998). Interleukin (IL)-15 induces survival and proliferation of the growth factor-dependent acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2 receptor beta/gamma. *Int. J. Cancer*, **78**, 189–195.
27. Hori, T., Uchiyama, T., Tsudo, M., Umadome, H., Ohno, H., Fukuhara, S. *et al.* (1987). Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus. *Blood*, **70**, 1069–1072.
28. Bernard, J., Harb, C., Mortier, E., Quemener, A., Meloen, R. H., Vermot-Desroches, C. *et al.* (2004). Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *J. Biol. Chem.* **279**, 24313–24322.
29. Tejedor, F. & Ballesta, J. P. (1982). Iodination of biological samples without loss of functional activity. *Anal. Biochem.* **127**, 143–149.
30. Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815.

RÉSUMÉ

Biologie de l'interleukine-15 : de son ADN à ses voies de signalisation

L'interleukine-15 (IL-15) est une puissante cytokine impliquée dans la modulation du système immunitaire, notamment dans l'homéostasie des cellules NK, NK-T et T CD8⁺ mémoires. La signalisation de l'IL-15 est assurée par les chaînes réceptrices IL-15R β et γ_c . La troisième chaîne réceptrice IL-15R α confère la spécificité et la haute affinité pour la cytokine. Dans une première partie, nous avons optimisé génétiquement la production de l'IL-15 dans le système baculovirus-cellules d'insecte. Nous avons produit cette cytokine sous forme active à une concentration dix fois plus élevée. Nous avons également appliqué ces mêmes optimisations à la production de deux antagonistes de l'IL-15. Dans une deuxième partie, nous avons caractérisé la formation du complexe cytokine-chaîne réceptrice α . Nous avons vérifié que le pont disulfure entre les acides aminés C42 et C88 était essentiel à la liaison de l'IL-15R α . Nos travaux ont également suggéré que l'association IL-15/IL-15R α n'était réalisable que dans une seule configuration. Dans une troisième partie, nous avons comparé les mécanismes de *cis*- et *trans*-présentations de l'IL-15. Nous avons montré que ces deux modes d'action génèrent différentes cinétiques d'activation de l'IL-15R et de signalisation cellulaire. L'ensemble de ces résultats permettent une meilleure compréhension du système IL-15/IL-15R, étape essentielle à la création et au développement d'immunothérapies basées sur l'utilisation de cytokines.

Mots-clés : immunologie, cytokine, interleukine-15, IL-15R α , production en système baculovirus-cellules d'insecte, *cis*- et *trans*-présentation, signalisation.

ABSTRACT

Biology of Interleukin-15: from DNA to Signaling Pathways

Interleukin-15 (IL-15) is a powerful cytokine described as a modulator of the immune system and implicated in the homeostasis of NK, NK-T, and memory CD8⁺ T cells. IL-15 signals are transmitted by the IL-15R β and γ_c receptor chains. The third receptor chain, IL-15R α , confers the specificity and the high affinity for the cytokine. In a first part, we optimized genetically the expression of IL-15 in the baculovirus-insect cells system. We produced this cytokine on an active form and at a ten times higher concentration. We also used these optimizations for the production of antagonists of IL-15. In a second part, we characterized the complex cytokine- α receptor chain. We checked that the disulfide bond between C42 and C88 was essential for IL-15R α binding. Furthermore, our results suggested that the complex IL-15/ IL-15R α could associate in only one configuration. In a third part, we compared IL-15 *cis*- and *trans*-presentation processes. We showed that these two mechanisms lead to different dynamics of receptor activation and signal transduction. These findings collectively allow a greater understanding of the IL-15/IL-15R system, a fundamental step in design and development of immunotherapeutic treatments based on the use of cytokines.

Keywords: Immunology, Cytokine, Interleukin-15, IL-15R α , baculovirus-insect cells Expression System, *cis*- and *trans*-presentation, signalization.

Harmonie PERDREAU

INSERM U892 - Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers
Equipe « Cytokines et Récepteurs de l'Inflammation en Immuno-Hémato-Cancérologie »
Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes
8, quai Moncousu - BP 70721 - 44007 NANTES Cedex 1