

**UNIVERSITE DE NANTES**  
**FACULTE DE MEDECINE**

---

Caractérisation structurale et fonctionnelle du complexe  
formé entre la chaîne Alpha soluble du Récepteur de  
l'Interleukine-15 Humaine et l'Interleukine-15 : Implication  
en immuno-cancérologie

---

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole Doctorale : Biologie-Santé**  
**Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé**  
**Spécialité : Immunologie**

*Présentée et soutenue par*

**Grégory BOUCHAUD**

Le 1 Juillet 2009, devant le jury ci-dessous

***Président du jury :***

**Charles TELLIER**      Professeur des Universités, Nantes

***Rapporteurs :***

**Hervé WATIER**      Professeur des Universités-PH, Tours  
**Thierry ROSE**      Chargé de Recherche, Institut Pasteur, Paris

***Examineurs :***

**Eric TARTOUR**      Professeur des Universités-PH, Paris

***Directeur de thèse :***

**Yannick JACQUES**      Directeur de Recherche, Nantes

***Co-Directeur de thèse :***

**Ariane PLET**      Chargée de Recherche, Nantes

---

**" Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre."  
Marie Curie**

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>TABLE DES MATIERES</b>                                                                    | <b>3</b>  |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>                                                                | <b>6</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>                                                         | <b>10</b> |
| <b>RESUME</b>                                                                                | <b>11</b> |
| <b>RESUME</b>                                                                                | <b>11</b> |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                              | <b>12</b> |
| <b>INTRODUCTION</b>                                                                          | <b>13</b> |
| <b>LES CYTOKINES ET LEURS RECEPTEURS</b>                                                     | <b>14</b> |
| <b>I. Généralités</b>                                                                        | <b>15</b> |
| A. Les cytokines                                                                             | 15        |
| B. Les récepteurs de cytokines                                                               | 18        |
| <b>II. Les cytokines hématopoïétiques</b>                                                    | <b>20</b> |
| A. Caractéristiques des cytokines hématopoïétiques                                           | 20        |
| B. Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques                                             | 20        |
| 1. Structure des chaînes réceptrices                                                         | 20        |
| 2. Les familles de récepteurs hématopoïétiques                                               | 21        |
| C. La transduction du signal des cytokines hématopoïétiques                                  | 28        |
| <b>III. Les récepteurs solubles de cytokines</b>                                             | <b>33</b> |
| A. Mécanismes de génération d'un récepteur soluble                                           | 33        |
| 1. Coupure protéolytique                                                                     | 34        |
| 2. Epissage alternatif                                                                       | 36        |
| 3. Protéines solubles liant les cytokines                                                    | 37        |
| B. Mécanismes de libération d'un récepteur soluble                                           | 39        |
| 1. Vésicules exosome-like                                                                    | 39        |
| 2. Ectodomains liés par une ancre GPI                                                        | 39        |
| 3. Origine virale                                                                            | 39        |
| C. Régulation de la production de récepteur soluble                                          | 40        |
| 1. Activation cellulaire                                                                     | 40        |
| 2. Cytokines                                                                                 | 41        |
| 3. Autres facteurs                                                                           | 42        |
| <b>IV. Fonctions des récepteurs solubles</b>                                                 | <b>43</b> |
| A. Effets antagonistes                                                                       | 43        |
| B. Effets agonistes                                                                          | 44        |
| <b>V. Les complexes Cytokine/Récepteur soluble : cas de l'IL-6/sIL-6R<math>\alpha</math></b> | <b>46</b> |
| <b>LE SYSTEME IL-15</b>                                                                      | <b>49</b> |
| <b>I. L'Interleukine-15</b>                                                                  | <b>49</b> |

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>A. Caractéristiques de l'IL-15 humaine</b>                | <b>49</b> |
| 1. Le gène et les messagers de l'IL-15                       | 49        |
| 2. La protéine IL-15                                         | 52        |
| a) Forme soluble                                             | 52        |
| b) Forme membranaire                                         | 54        |
| <b>B. Expression de l'IL-15</b>                              | <b>54</b> |
| 1. Site d'expression                                         | 54        |
| 2. Régulation de l'expression de l'IL-15                     | 55        |
| a) Au niveau transcriptionnel                                | 55        |
| b) Au niveau traductionnel                                   | 56        |
| c) Au niveau post-traductionnel                              | 57        |
| <b>II. Les Récepteurs humains de l'IL-15</b>                 | <b>59</b> |
| <b>A. La chaîne <math>\gamma_c</math> réceptrice (CD132)</b> | <b>59</b> |
| <b>B. La chaîne IL-2/15R<math>\beta</math> (CD122)</b>       | <b>61</b> |
| <b>C. La chaîne privée du récepteur de l'IL-15</b>           | <b>62</b> |
| 1. Identification et clonage de la chaîne IL-15R $\alpha$    | 62        |
| 2. Caractéristiques génétiques de l'IL-15R $\alpha$          | 63        |
| 3. Caractéristiques protéiques de l'IL-15R $\alpha$          | 64        |
| a) Forme membranaire                                         | 64        |
| b) Forme soluble                                             | 66        |
| 4. Sites d'expression de l'IL-15R $\alpha$                   | 68        |
| 5. Régulation de l'expression de l'IL-15R $\alpha$           | 68        |
| 6. La chaîne réceptrice IL-15RX des mastocytes               | 69        |
| <b>III. La transduction du signal IL-15</b>                  | <b>69</b> |
| <b>A. Les kinases JAK1 et JAK3</b>                           | <b>70</b> |
| <b>B. Les facteurs STAT3 et STAT5</b>                        | <b>70</b> |
| <b>C. Les MAPKs ERK1, JNK et p38 MAPK</b>                    | <b>70</b> |
| <b>D. La PI3-K</b>                                           | <b>71</b> |
| <b>IV. Signalisation par la chaîne <math>\alpha</math></b>   | <b>71</b> |
| <b>V. Les Fonctions Biologiques de l'IL-15</b>               | <b>74</b> |
| <b>A. IL-15 et système immunitaire</b>                       | <b>74</b> |
| 1. Les cellules immunitaires                                 | 74        |
| a) Les lymphocytes T                                         | 76        |
| b) Les cellules NK                                           | 76        |
| <b>B. L'IL-15 en dehors du système immunitaire</b>           | <b>79</b> |
| <b>VI. Le complexe IL-15/sIL-15R<math>\alpha</math></b>      | <b>81</b> |
| <b>VII. Le système IL-15 en pathologie</b>                   | <b>85</b> |
| <b>A. Les Infections virales</b>                             | <b>85</b> |
| 1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine : VIH              | 85        |
| 2. Autres virus                                              | 86        |
| <b>B. Les infections microbiennes</b>                        | <b>86</b> |
| <b>C. Les maladies inflammatoires</b>                        | <b>87</b> |
| 1. La polyarthrite rhumatoïde                                | 87        |
| 2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin      | 87        |
| 3. Les autres pathologies inflammatoires                     | 88        |
| <b>D. Les maladies immunes et auto-immunes</b>               | <b>88</b> |
| 1. Le rejet de greffes                                       | 88        |
| 2. Le lupus érythémateux                                     | 89        |
| 3. Autres maladies auto-immunes                              | 89        |

|                             |                                                                                                                                    |     |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| E.                          | Hypertension et athérosclérose                                                                                                     | 89  |
| F.                          | Maladies musculaires                                                                                                               | 90  |
| G.                          | Les cancers                                                                                                                        | 90  |
| VIII.                       | <i>Le système IL-15 en thérapie</i>                                                                                                | 94  |
| RESULTATS                   |                                                                                                                                    | 97  |
| avant propos                |                                                                                                                                    | 98  |
| I.                          | <i>Rôle du domaine codé par l'exon 3 de l'IL-15R<math>\alpha</math> dans la fonction antagoniste du sIL-15R<math>\alpha</math></i> | 100 |
| A.                          | Résumé                                                                                                                             | 100 |
| B.                          | Introduction                                                                                                                       | 101 |
| C.                          | Résultats                                                                                                                          | 102 |
| D.                          | Article I                                                                                                                          | 106 |
| II.                         | <i>Le système IL-15 dans la maladie de Crohn</i>                                                                                   | 119 |
| A.                          | Résumé                                                                                                                             | 119 |
| B.                          | Introduction                                                                                                                       | 120 |
| C.                          | Résultats                                                                                                                          | 121 |
| D.                          | Article II                                                                                                                         | 124 |
| III.                        | <i>Le sIL-15R<math>\alpha</math> dans les cancers de la tête et du cou</i>                                                         | 141 |
| A.                          | Résumé.                                                                                                                            | 141 |
| B.                          | Introduction                                                                                                                       | 142 |
| C.                          | Résultats                                                                                                                          | 143 |
| D.                          | Article III                                                                                                                        | 145 |
| IV.                         | <i>Le sIL-15R<math>\alpha</math> dans le cancer de la prostate</i>                                                                 | 154 |
| A.                          | Introduction                                                                                                                       | 154 |
| B.                          | Mise en évidence du sIL-15R $\alpha$                                                                                               | 155 |
| C.                          | Mise en évidence du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$                                                                                | 156 |
| DISCUSSION                  |                                                                                                                                    | 158 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES  |                                                                                                                                    | 166 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES |                                                                                                                                    | 169 |
| ANNEXES                     |                                                                                                                                    | 199 |
| ANNEXE I                    |                                                                                                                                    | 200 |
| ANNEXE II                   |                                                                                                                                    | 218 |

# LISTE DES ABREVIATIONS

$\beta_c$  : La chaîne  $\beta$  commune  
 $\gamma_c$  : La chaîne  $\gamma$  commune  
 $\Delta$  : Délétion  
**aa** : Acide aminé  
**Ac** : Anticorps  
**Act** : Activines  
**ADAM** : "A Desintegrin And Metalloprotease"  
**ADCC** : "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity"  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**AICD** : "Activation-Induced Cell Death"  
**Akt** : "cellular homolog of the v-akt oncogene" ou PKB, isolée à partir de la lignée murine AKR issue de Thymome  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ATL** : "Adulte T cell Leukemia"  
**Bad** : "Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter"  
**BCG** : Bacille de Calmette-Guérin  
**Bcl-xL** : "B cell leukaemia x Large form protein"  
**BP** : "Binding Protein"  
**BSA** : "Bovine Serum Albumin"  
**Caspases** : "Cysteine proteases with aspartate specificity"  
**CBM** : "Cytokine Binding Module"  
**CD** : "Cluster of Differentiation"  
**CLC** : "Cardiotrophin-Like Cytokine"  
**CLF-1** : "Cardiotrophin-Like Factor-1"  
**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CNTF** : "Ciliary Neurotrophic Factor"  
**CPA** : Cellules Présentatrices d'Antigènes  
**cpm** : coup par minute  
**CRH** : "Cytokine Receptor Homology domain"  
**Crm** : Cytokine response modifying  
**CSF** : "Colony Stimulating Factor"  
**CT-1** : "Cardiotrophin-1"  
**CTL** : "Cytolytic T Lymphocytes"  
**DcR** : "Decoy Receptor"  
**DETC** : "Dendritic Epidermal T Cell"  
**DMEM** : "Dulbeco's Modified Eagle's Medium"  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**DR** : "Death Receptor"  
**EBI-3** : "Epstein-Barr virus-induced gene 3"  
**EBV** : "Epstein-Barr Virus"  
**EC<sub>50</sub>** : "Effective Concentration 50%"  
**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique  
**EGF** : "Epidermal Growth Factor"  
**ELISA** : "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"  
**EPO** : Erythropoïétine  
**ERK** : "Extracellular signal-Regulated Kinase"

**FADD** : "FAS-Associated Death Domain protein"  
**FGF** : "Fibroblast Growth Factor"  
**FITC** : Fluoresceine IsoThioCyanate  
**Flt-3L** : "Fms-like tyrosine kinase 3"  
**FNIII** : "Fibronectine III"  
**FT** : facteur de transcription  
**Gab2** : "Grb associated binder 2" ou p98  
**G-CSF** : "Granulocyte-Colony Stimulating Factor"  
**GF** : "Growth Factor"  
**GFP** : "Green Fluorescent Protein"  
**GH** : "Growth Hormone" ou Somatotropine  
**GM-CSF** : "Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor"  
**gp** : glycoprotéine  
**GP-1** : "Glycoprotein-1"  
**GPI** : glycosyl-phosphatidylinositol  
**Grb-2** : "Growth factor receptor-bound protein 2"  
**GVHD** : "Graft vs. Host Diseases"  
**GVL** : "Graft vs. Leukemia"  
**h** : humain  
**HAART** : "Highly Activer Antiretroviral Therapy"  
**HAM** : "HTLV-1-Associated Myelopathy" ou TSP  
**HHV** : "Human Herpes Virus"  
**HLA** : "Human Leucocyte Antigen"  
**HSV** : "Herpes Simplex Virus"  
**HTLV-1** : "Human T cell Leukemia Virus-1"  
**HUVEC** : "Human Umbilical Vein Endothelial Cells"  
**I $\kappa$ B** : "Inhibitor of NF- $\kappa$ B"  
**IC<sub>50</sub>** : "Inhibitory Concentration 50%"  
**ICAM** : "Intercellular Adhesion Molecule"  
**IEL** : "Intraepithelial Lymphocyte"  
**IFN** : Interféron  
**Ig** : "Immunoglobuline"  
**IKK** : "I-Kappa-B Kinase"  
**IL-** : Interleukine-  
**IL-1ra** : "IL-1 receptor antagonist"  
**IL-1RAcP** : "Interleulin-1 Receptor Accessory Protein"  
**Inh** : Inhibines  
**IRF-E** : "Interferon Regulatory Factor response Element"  
**JAK** : "Janus-Associated Kinase"  
**JNK** : "c-Jun N-terminal Kinase" ou SAPK  
**ka** : constante cinétique d'association  
**kb** : kilobases  
**kd** : constante cinétique de dissociation  
**KIR** : "Killer cell Immunoglobulin-like Receptor"  
**KLR** : "Killer Lectin-like Receptor"  
**KO** : Knock Out  
**KSV-IL-6** : "Kaposi Sarcoma associated human herpes Virus 8 interleukin-6"  
**L** : Ligand  
**LAK** : "Lymphokine-Activated Killer" ou "Lymphokine-Activated Killing"

**LCTE** : Lymphomes Cutanés T Epidermotropes  
**LGL** : "Large Granular Lymphocytes"  
**LGLLD** : "Large Granular Lymphocytes Lymphoproliferative Disorder"  
**LFA** : "Leukocyte Function-associated Antigen"  
**LIF** : "Leukemia Inhibitory Factor"  
**LIGHT** : "homologous to Lymphotoxins, exhibits Inducible expression, competes with HSV Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes"  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**LSP** : "Long Peptide Signal"  
**LT** : Lymphotoxine  
**LTR** : "Long Terminal Repeat"  
**LZ** : "Leucine Zipper"  
**m** : murine  
**MAPK** : "Mitogen-Activated Protein Kinases"  
**MC** : Maladie de Crohn  
**Mcl-1** : "Myeloid cell leukemia sequence 1"  
**MCP** : "Monocyte Chemoattractant Protein"  
**M-CSF** : "Macrophage-Colony Stimulating Factor"  
**MF** : Mycosis Fongoïde  
**MIP** : "Macrophage Inflammatory Protein"  
**MMP** : Matrix Metalloprotease  
**MT-MMP** : "Membrane-Type MMP"  
**NES** : "Nuclear Export Sequence"  
**NF- $\kappa$ B** : "Nuclear Factor kappa B"  
**NGF** : "Nerve Growth Factor"  
**NIK** : "NF-kappa-B-inducing kinase"  
**NK** : "Natural Killer" ou "Natural Killing"  
**NKR** : "Natural Killer Receptor"  
**NK-T** : "Natural Killer T cell" ou NK1+T  
**NLS** : "Nuclear Localisation Sequence"  
**nt** : nucléotide  
**OSM** : Oncostatine M  
**p** : protéine  
**P-Tyr** : Phosphotyrosine  
**p70<sup>S6K</sup>** : "small subunit ribosomal protein S6 Kinase"  
**PBMC** : "Peripheral Blood Mononuclear Cells"  
**PBS** : "Phosphate Buffered Saline"  
**PCR** : "Polymerase Chain Reaction"  
**PDGF** : "Platelet-Derived Growth Factor"  
**PK1** : "3-Phosphatidyl inositol-Dependent protein Kinase 1"  
**PE** : Phycoerythrine  
**PEG** : Polyéthylène Glycol  
**PI3-K** : "Phosphatidyl Inositol 3-Kinase"  
**PKB** : "Protein Kinase B" ou Akt, isolée à partir de la lignée murine AKR issue de Thymome  
**PKC** : "Protein Kinase C"  
**PLC** : Phospholipase C  
**PMA** : "Phorbol-Myristate Acetate"  
**PP2A** : "Protein Phosphatase 2A"  
**PPL** : Préprolactine



**PRL** : Prolactine  
**Pyk2** : "Proline-rich tyrosine kinase 2"  
**R** : récepteur  
**r** : recombinant  
**RANKL** : "Ligand of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B"  
**RANTES** :  
 "Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted"  
**RAS** : radioactivité spécifique  
**RCH** : Rectocolite Hémorragique  
**RIA** : "Radio-Immuno Assay"  
**RIP** : "Receptor Interacting Protein"  
**RLI** : Protéine de fusion sIL-15R $\alpha$ -sushi/IL-15  
**Rm-IL-6** : "Rhesus macaque rhadinovirus Interleukin-6"  
**RMPI** : "Roosevelt Park Memorial Institute Medium"  
**RU** : unité de résonance plasmonique de surface  
**s** : soluble  
**SBE** : "STAT-Binding Element"  
**SCF** : "Stem Cell Factor"  
**SH2** : "Src-Homology 2"  
**SH3** : "Src-Homology 3"  
**Shc** : "SH2-containing collagen-related protein"  
**sIL-15R $\alpha$**  : Forme soluble de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-15R  
**sIL-15R $\alpha$ -sushi** : Forme soluble du domaine sushi de l'IL-15R $\alpha$   
**Sos** : "Son of sevenless"  
**SRC** : "Short Consensus Repeat"  
**SS** : Syndrome de Sézary  
**SSP** : "Short Signal Peptide"  
**STAT** : "Signal Transducer and Activator of Transcription"  
**SVF** : Sérum de Veau Fœtal  
**Syk** : "Spleen tyrosine kinase"  
**TACE** : "TNF $\alpha$  Converting Enzyme"  
**TCA** : acide trichloracétique  
**TCR** : "T Cell Receptor"  
**TGF** : "Transforming Growth Factor"  
**TIL** : "Tumor Infiltrating Lymphocytes"  
**TLA-1** : "endothelial cell-derived TNF-like factor"  
**TNF** : "Tumor Necrosis Factor"  
**TNFRSF** : "TNF Receptor Superfamily"  
**TPO** : Thrombopoïétine  
**TRADD** : "TNF-R1-Associated Death Domain protein"  
**TRAF2** : "TNF-R Associated Factor 2"  
**TRAIL** : "TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand"  
**TSLP** : "Thymic Stromal Lymphopoietin"  
**TSP** : "Tropical Spastic Paraparesis" ou HAM  
**UV** : Ultraviolets  
**VCAM** : "Vascular Cell Adhesion Molecule"  
**VHC** : Virus de l'Hépatite C  
**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
**WT** : "Wild Type"  
**X-SCID** : "X-linked severe combined immunodeficiency"

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

## FIGURES :

|                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Groupes ou Familles de Cytokines.....                                                   | 16  |
| Figure 2 : Familles de Chaînes Réceptrices Membranaires des Cytokines .....                        | 19  |
| Figure 3 : Récepteurs fonctionnels des cytokines hématopoïétiques .....                            | 24  |
| Figure 4 : Récepteurs multimériques fonctionnels des cytokines de la famille IL-6/IL-12 .....      | 25  |
| Figure 5 : Cas particuliers de l'IL-12, l'IL-23, l'IL-27 et l'IL-35 .....                          | 26  |
| Figure 6 : La transduction du signal (voies d'activation) .....                                    | 30  |
| Figure 7 : La transduction du signal (régulations négatives) .....                                 | 32  |
| Figure 8 : Génération des Récepteurs Solubles par Coupure protéolytique .....                      | 35  |
| Figure 9 : Fonctions Immunorégulatrices des Récepteurs Solubles de Cytokines .....                 | 45  |
| Figure 10 : Le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$ .....                                                 | 48  |
| Figure 11 : Gène, Transcription, Traduction et Maturation Protéique de l'IL-15 Humaine .           | 51  |
| Figure 12 : Caractéristiques de l'IL-15 humaine .....                                              | 53  |
| Figure 13 : Récepteurs Fonctionnels de l'IL-15 .....                                               | 62  |
| Figure 14 : Gène, Transcription et Traduction de la Chaîne IL-15R $\alpha$ .....                   | 65  |
| Figure 15 : La chaîne privée de l'IL-15.....                                                       | 67  |
| Figure 16 : Signalisation par les chaînes du récepteur à l'IL-15 .....                             | 73  |
| Figure 17 : Fonctions Physiologiques de l'IL-15 dans le Système Immunitaire.....                   | 78  |
| Figure 18 : Propriétés fonctionnelles de l'IL-15.....                                              | 80  |
| Figure 19 : Le système IL-15/sIL-15R $\alpha$ .....                                                | 84  |
| Figure 20 : IL-15 et pathologies .....                                                             | 93  |
| Figure 21 : Les différents RIAs de détection du sIL-15R $\alpha$ , de l'IL-15 et du complexe ..... | 99  |
| Figure 22 : Action des différentes formes de sIL-15R $\alpha$ et du RLI .....                      | 104 |
| Figure 23 : Interaction moléculaires entre l'IL-15 et le sIL-15R $\alpha$ .....                    | 105 |
| Figure 24 : Dosage du sIL-15R $\alpha$ dans le sérum de cancer de la prostate .....                | 156 |
| Figure 25 : Dosage du complexe dans le sérum de cancer de la prostate.....                         | 157 |

## TABLEAUX :

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I : Exemples de différents Récepteurs Solubles de Cytokines, leurs Modes de Production et leurs Actions .....            | 38 |
| Tableau II : Effet de l'IL-15 sur les différentes cellules du système immunitaire à l'exception des lymphocytes T et des NK..... | 75 |
| Tableau III : Effet de l'IL-15 sur les lymphocytes T et les NK .....                                                             | 77 |

## RESUME

### **Caractérisation structurale et fonctionnelle du complexe formé entre la Chaîne Alpha soluble du Récepteur de l'Interleukine-15 Humaine et l'Interleukine-15: Implication en immuno-cancérologie**

Les interleukines sont un groupe de cytokines permettant une communication intercellulaire au cœur du système immunitaire. L'Interleukine-15 (IL-15) est une cytokine qui présente des activités semblables à celles de l'IL-2 *in vitro* du fait de l'utilisation commune des chaînes réceptrices IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ , la spécificité d'action étant conférée par une chaîne réceptrice  $\alpha$ . L'IL-15R $\alpha$  existe sous forme soluble après clivage protéolytique de la forme membranaire. Dans cette étude, nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires régulant les activités agonistes et antagonistes des formes solubles de la chaîne IL-15R $\alpha$ . Plus précisément, nous avons mis en évidence que le domaine du sIL-15R $\alpha$  codée par l'exon 3 situé à l'extrémité C-terminale du domaine sushi liant la cytokine, participe à la forte affinité du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  et est indispensable à la fonction antagoniste du récepteur soluble. Nous avons également montré le rôle primordial du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  dans des pathologies cancéreuses d'une part et inflammatoires d'autre part grâce au pouvoir d'échappement tumoral induit par le sIL-15R $\alpha$  dans les cancers de la tête et du cou et son implication dans la réponse thérapeutique à l'infliximab (anti-TNF) dans la maladie de Crohn. Ce travail montre que le sIL-15R $\alpha$  est une composante importante dans la régulation des activités de l'IL-15 et pourrait conduire à différentes applications thérapeutiques.

## ABSTRACT

### **Functional and structural properties of the complex formed by human Interleukine 15 and its soluble private chain : Involvement in immuno-cancérology**

Interleukins are a group of cytokines which allow intercellular communication in immune system. The Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine which elicits similar activities as those of IL-2 *in vitro* because of the common use of IL-2R $\beta$  and  $\gamma_C$  chains. The specificity of action is conferred by a private  $\alpha$  chain (IL-15R $\alpha$ ). The  $\alpha$  chain exists in soluble form after proteolytic cleavage of the membrane anchored IL-15R $\alpha$ . In this study, we characterized the molecular mechanisms regulating the agonistic and antagonistic activities of the soluble forms of IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ). Specifically, we highlighted that the exon 3 encoded domain of the sIL-15R $\alpha$ , located at the C-terminal end of the IL-15 binding domain (sushi), participates to the high affinity of the IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex and is necessary for the antagonistic function of the soluble receptor. We also showed the vital role of this complex in cancer and inflammatory diseases through the capacity to escape to immunity of tumor with sIL-15R $\alpha$  in head and neck cancers and its involvement in the therapeutic response to infliximab in Crohn disease. This work shows that the sIL-15R $\alpha$  is an important component in the regulation of IL-15 and could lead to different therapeutic applications.

# ***INTRODUCTION***

## LES CYTOKINES ET LEURS RECEPTEURS

L'organisation d'un être vivant est régie par une harmonie complexe et hautement régulée entre les différentes cellules qui le constituent. Le système immunitaire d'un organisme permet de discriminer le « soi » du « non-soi ». Il met en jeu un ensemble de moyens (organes, tissus, cellules et molécules) permettant de répondre rapidement, de façon souvent spécifique et efficace contre les nombreux pathogènes auxquels nous sommes confrontés à court et à long terme. Il s'agit d'un système incluant des cellules produites dans la moelle osseuse et circulant dans notre sang ou résidant dans nos tissus. Les cellules « natural killer » permettent une réponse innée, très rapide et une immunosurveillance puis les lymphocytes déterminent la spécificité de la réponse. Les cellules qui interagissent avec les lymphocytes ont un rôle important dans la présentation des antigènes et dans la médiation des fonctions immunologiques. Ces cellules incluent les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans ainsi que les monocytes/macrophages et enfin les neutrophiles, mastocytes, basophiles et éosinophiles. De plus, une série de cellules épithéliales et stromales apportent l'environnement anatomique dans lequel l'immunité se développe. Ces cellules jouent un rôle direct dans l'induction puis dans les phases effectrices de la réponse immunitaire. La réponse adaptative qui suit l'induction présente deux volets : la réponse humorale basée sur la production de molécules effectrices appelées immunoglobulines ou anticorps qui sont produites par les plasmocytes résultant de la différenciation des lymphocytes B et la réponse cellulaire basée sur l'action des lymphocytes T qui coordonnent les différents aspects de la réponse immunitaire et détruisent les cellules infectées ou cancéreuses. Enfin, une dernière étape consiste en la mise en place d'une réponse mémoire. La mise en jeu de ces différentes cellules nécessite une organisation spatiale et temporelle particulière. Les communications intercellulaires intervenant dans les réactions immunitaires spécifiques et non spécifiques ainsi que dans l'inflammation font appel à des protéines, le plus souvent glycosylées, dont la masse moléculaire varie entre 8 et 50kDa, appelées cytokines. Il apparaît aujourd'hui que les cytokines représentent un langage universel dans le dialogue entre les différentes cellules de l'organisme. L'intégration des différents signaux induits par les cytokines génère un message qui aboutit à différents effets comme l'activation de la prolifération, la différenciation et la maturation fonctionnelle des cellules impliquées dans la réponse contre les pathogènes (induction d'activités cytotoxique et phagocytaire, production d'anticorps, accroissement de l'hématopoïèse).

# I. Généralités

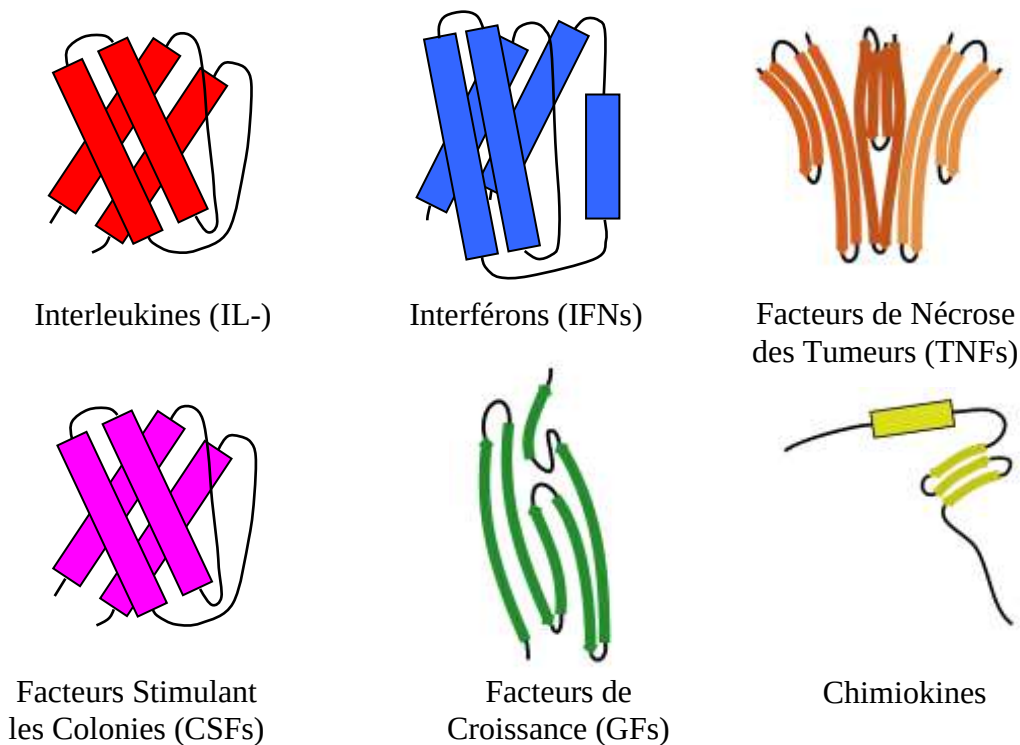
## A. Les cytokines

Le développement d'une réponse immunitaire efficace implique des cellules lymphoïdes, des cellules de l'inflammation et des cellules hématopoïétiques. Les interactions complexes entre ces cellules sont médiées par un groupe de protéines dénommées collectivement cytokines. Les cytokines sont des protéines régulatrices de faible poids moléculaire ou des glycoprotéines sécrétées par les cellules immunitaires du sang et par un ensemble d'autres cellules de l'organisme en réponse à de nombreux stimuli. Ces protéines participent à la régulation du développement des cellules immunitaires effectrices. Certaines cytokines possèdent par elles-mêmes des fonctions effectrices directes, tout comme les hormones servent de messagers au système endocrine, les cytokines servent de messenger au système immunitaire. Cependant, contrairement aux hormones endocrines, qui exercent leurs effets à distance, les cytokines agissent généralement localement.

Elles sont impliquées dans la régulation des fonctions immunitaires, mais aussi dans l'hématopoïèse, l'hémostase.... Une cytokine donnée peut se lier aux récepteurs membranaires de la cellule qui l'a sécrété (autocrinie). Elle peut aussi se fixer sur les récepteurs d'une cellule cible très proche de la cellule productrice (paracrinie). Dans quelques rares cas, elle peut se lier à des cellules cibles dans des régions éloignées de l'organisme (endocrinie). Elles peuvent également agir à l'intérieur des cellules productrices sans être sécrétées (intracrinie). Les cytokines membranaires peuvent exercer leur action au contact de cellules voisines exprimant le récepteur (juxtacrinie). Les cytokines régulent l'intensité et la durée de la réponse immunitaire en stimulant ou en inhibant l'activation, la prolifération et/ou la différenciation de différentes cellules et en régulant la production d'anticorps ou d'autres cytokines. L'ensemble des interactions entre les différentes cytokines forme le réseau cytokinique. Ce réseau de cytokines est également défini par le fait qu'une action simultanée de différentes cytokines peut aboutir à un effet additif, synergique ou antagoniste.

Les cytokines sont généralement regroupées 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**

Les interleukines (en rouge), les interférons (en bleu), les facteurs de nécrose des tumeurs (en marron), les facteurs stimulant les colonies (en rose), les facteurs de croissance (en vert) et les chimiokines (en jaune).



A la différence des hormones dont le taux de sécrétion est continu bien que modifié par des signaux physiologiques, les cytokines ne sont habituellement pas synthétisées par les cellules au repos mais principalement en réponse à un signal activateur. La production de cytokines est, généralement, rapide, brève, intense et leur sécrétion est immédiate. Hormis quelques exceptions comme l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , les cytokines ne sont pas stockées à l'intérieur des cellules. Il existe cependant des cytokines qui sont exprimées à un niveau basal, comme celles qui sont produites par les cellules stromales du microenvironnement médullaire ou thymique. La plupart des cytokines entraînent des réactions en cascade en induisant la production d'une autre cytokine par leur cellule cible. Leurs effets sont très souvent redondants. La majorité des cytokines sont des facteurs solubles sécrétés, cependant certaines peuvent se présenter sous deux formes : soluble et membranaire, toutes deux biologiquement actives.

Malgré leur hétérogénéité, les cytokines assurent des fonctions biologiques précises dans l'immunité innée et adaptative, ce qui implique la coordination de l'expression de plusieurs molécules, par une régulation transcriptionnelle commune. Cependant il existe des cas de régulation post-transcriptionnelle via la stabilisation d'ARNm (GM-CSF, IL-7, IL-15) ou post-traductionnelle via un clivage protéolytique. Ce clivage peut être celui d'une pro-cytokine afin de libérer la cytokine mature, ou celui du domaine extracellulaire d'une forme membranaire permettant la libération de la cytokine soluble mature.

Au fur et à mesure de la découverte de cytokines, de récepteurs, ou de nouveaux modes d'action et d'interaction, le réseau cytokinique apparaît de plus en plus complexe.

## B. Les récepteurs de cytokines

Pour exercer leurs effets biologiques, les cytokines doivent d'abord se lier à des récepteurs spécifiques exprimés au niveau de la membrane des cellules cibles sensibles. Les chaînes réceptrices des différentes cytokines sont structurellement très diverses, mais appartiennent à l'une des neuf familles de récepteurs protéiques (**Figure 2**).

**a) Les récepteurs de classe I (cytokines hématopoïétiques)** comme la chaîne gp130, la chaîne  $\beta$  commune ( $\beta_c$ ) et la chaîne  $\gamma$  commune ( $\gamma_c$ ).

**b) Les récepteurs des cytokines de classe II (familles des IFNs et de l'IL-10)** tels les IFN-Rs, IL-10R, IL-20R, IL-22R et IL-28R.

**c) Les récepteurs de classe III (cytokines de la superfamille des TNFs)** qui correspondent par exemple aux TNF-R, NGF-R, Fas, CD27, CD40 et TRAIL-R.

**d) Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines sans activité tyrosine kinase** comme les IL-1Rs et IL-18R.

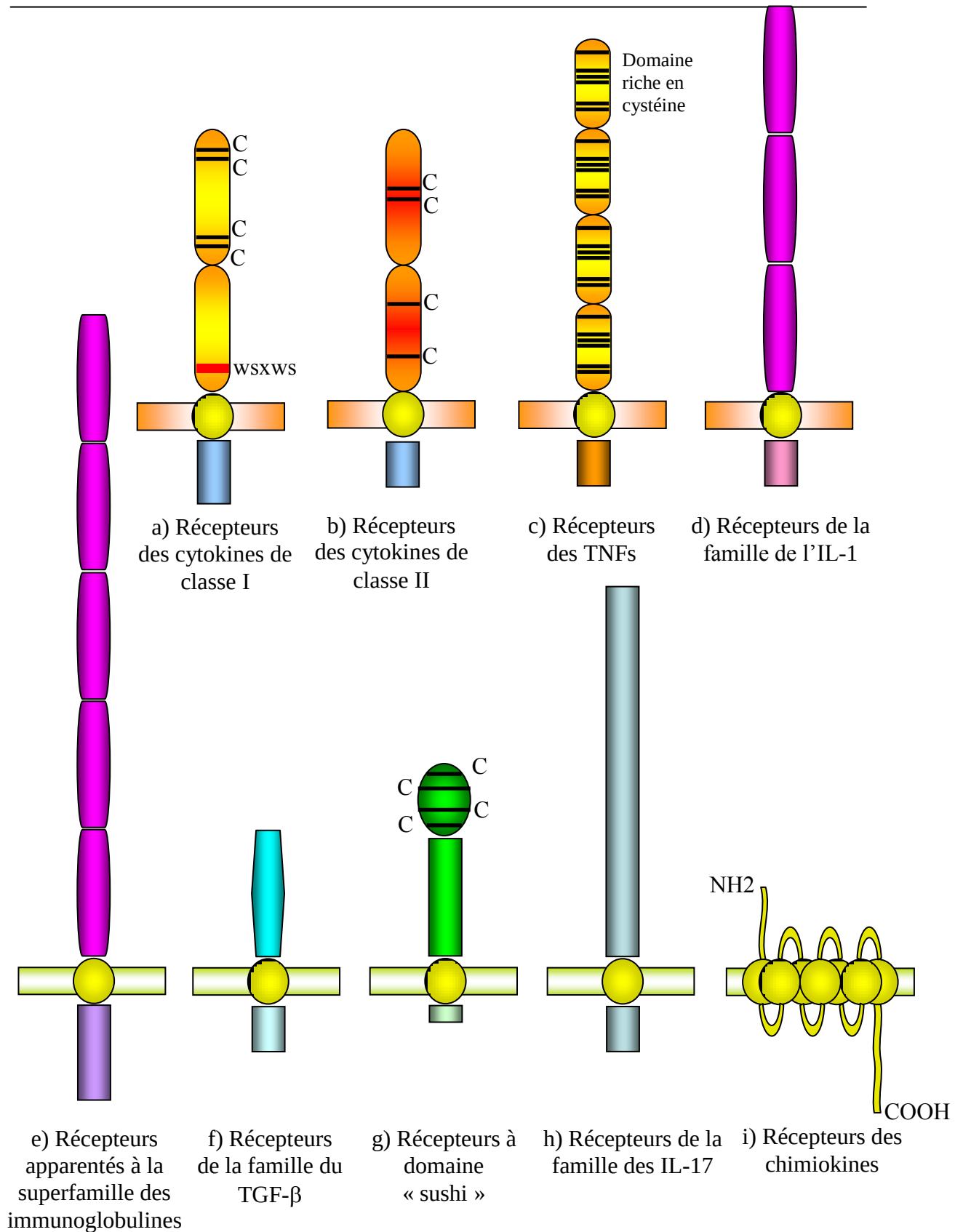
**e) Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines avec activité tyrosine kinase** qui correspondent entre autres aux M-CSF-R, EGF-R et PDGF-R.

**f) Les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase des cytokines de la famille du TGF $\beta$**  comprenant par exemple les TGF $\beta$ -R, Inh-R et Act-R.

**g) Les récepteurs à domaine sushi** dont l'IL-2R $\alpha$  et l'IL-15R $\alpha$  sont les seuls membres.

**h) Les récepteurs des cytokines de la famille des IL-17 (IL-17Rs).**

**i) Les récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines** comme le CXCR-1, les CCRs, les CXCRs et le CX<sub>3</sub>CR-1.



**Figure 2 : Familles de Chaînes Réceptrices Membranaires des Cytokines**

## II. Les cytokines hématopoïétiques

Ce travail de thèse s'est intéressé à l'étude du "système interleukine-15". L'IL-15 est une cytokine hématopoïétique à quatre hélices  $\alpha$  courtes, structurellement et fonctionnellement proche de l'IL-2 (Burton *et al.* 1994 ; Grabstein *et al.* 1994). Les récepteurs fonctionnels de l'IL-2 et de l'IL-15 partagent les chaînes transductrices IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ , de la famille des récepteurs hématopoïétiques (Bamford *et al.* 1994 ; Giri *et al.* 1994 ; Grabstein *et al.* 1994). Leur spécificité de réponse est conférée par leurs chaînes réceptrices spécifiques, l'IL-15R $\alpha$  et l'IL-2R $\alpha$ .

### A. Caractéristiques des cytokines hématopoïétiques

Les cytokines hématopoïétiques sont des protéines de faible poids moléculaire impliqués dans la différenciation et l'expansion des cellules sanguines. Elles présentent généralement des N-glycosylations et des O-glycosylations. La structure tertiaire de la plupart de ces glycoprotéines est maintenue par des ponts disulfures. L'organisation spatiale des structures secondaires donne une structure tertiaire cylindrique aux cytokines à hélices  $\alpha$  longues, et une structure globulaire aux cytokines à hélices  $\alpha$  courtes. Ces cytokines se fixent généralement sous forme monomérique sur différentes chaînes réceptrices hématopoïétiques.

### B. Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques

#### 1. Structure des chaînes réceptrices

Les récepteurs de classe I constituent le groupe le plus important des récepteurs de cytokines. Ce sont des glycoprotéines membranaires de type I, à l'exception de la chaîne CNTF-R qui est ancrée à la membrane par une liaison glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), avec une extrémité NH<sub>2</sub>-terminal extracellulaire et COOH-terminal intracellulaire. Les régions extracellulaires de ces chaînes réceptrices sont variables, mais présentent toutes une architecture de type "Cytokine Receptor Homology" (CRH) (Bazan *et al.* 1990),

caractérisée par deux domaines fibronectine de type III (FNIII) connectés par un « linker » et impliqué dans la liaison de la cytokine. Le premier domaine fibronectine, situé en NH<sub>2</sub>-terminal, présente quatre cystéines conservées qui forment deux ponts disulfures intracaténaux successifs indispensables à la fonctionnalité du CRH (Yawata *et al.* 1993). Le second domaine fibronectin, situé en COOH-terminal possède un motif W-S-X-W-S conservé spécifique des récepteurs hématopoïétiques (**Figure 2**).

Certains récepteurs de classe I possèdent en plus des domaines de type "immunoglobuline" (Ig). Les domaines Ig peuvent également jouer un rôle dans la liaison de la cytokine (Layton *et al.* 2001 ; Bitard *et al.* 2003) alors que les régions de type FNIII peuvent permettre des interactions entre les chaînes réceptrices (Kurth *et al.* 2000 ; Timmermann *et al.* 2002).

Les parties intracellulaires des chaînes réceptrices hématopoïétiques sont de longueur variable et ne présentent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Deux motifs conservés, "Box1" et "Box2", sont retrouvés sur ces domaines intracellulaires et participent à la transduction du signal biologique. Le motif "Box1" possède un site, riche en proline, essentiel à la transduction du signal en permettant l'ancrage de protéines tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille des JAKs ("Janus-Associated Kinases"). Le motif "Box2", moins conservé, est constitué de plusieurs résidus hydrophobes chargés négativement ce qui augmenterait l'affinité des JAKs pour la région intracytoplasmique des chaînes transductrices (Bazan *et al.* 1990).

## 2. Les familles de récepteurs hématopoïétiques

En réponse à un stimulus, la cytokine ainsi produite se fixe sur son récepteur et induit une homodimérisation des chaînes réceptrices ou l'association de deux ou trois chaînes réceptrices différentes. La spécificité d'interaction des complexes récepteurs multimériques avec la cytokine est conférée par la chaîne  $\alpha$ . Elle s'associe, alors, dans le récepteur fonctionnel à un homo ou hétérodimère de chaînes transductrices. Cette oligomérisation entraîne le rapprochement des régions intracellulaires des chaînes transductrices qui conduit à une succession de réactions qui permet aux JAKs constitutivement associées aux chaînes réceptrices d'interagir et de s'auto-activer générant ainsi un complexe de facteurs de transcription actifs qui initient la transcription de gènes spécifiques.

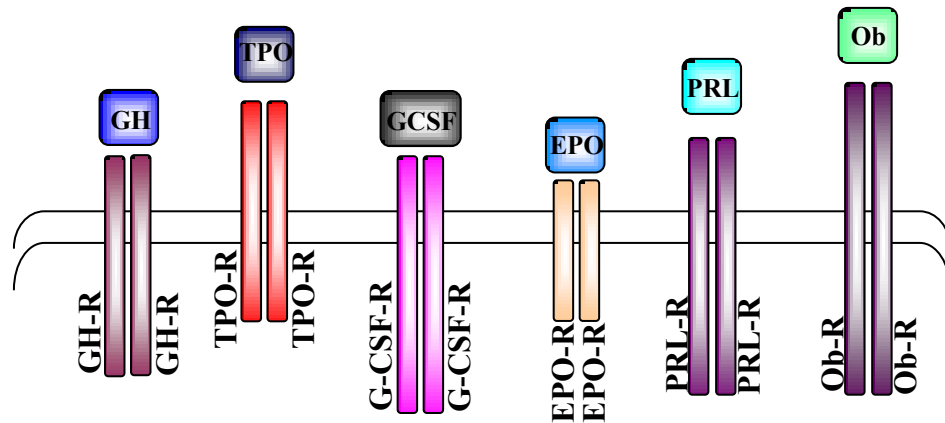
La redondance fonctionnelle des cytokines s'explique par le fait que les chaînes transductrices sont souvent partagées par plusieurs cytokines. De plus, la nature dimérique ou trimérique des récepteurs, permet de définir quatre groupes principaux de cytokines hématopoïétiques (Ozaki *et al.* 2002) : **(Figure 3 et 4)**.

**a) Le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteur homodimérique (Figure 3A)** comprend les cytokines hématopoïétiques homodimérisant leur chaîne réceptrice unique qui est transductrice. Ce groupe comprend l'EPO, le TPO, le G-CSF, la GH, la PRL et la Leptine.

**b) Le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteur hétérodimérique utilisant la chaîne transductrice  $\beta_c$  (Figure 3B).** Les cytokines de ce groupe sont l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF. Chaque cytokine possède une chaîne réceptrice spécifique  $\alpha$  qui associée à la chaîne  $\beta_c$  forme le complexe récepteur fonctionnel.

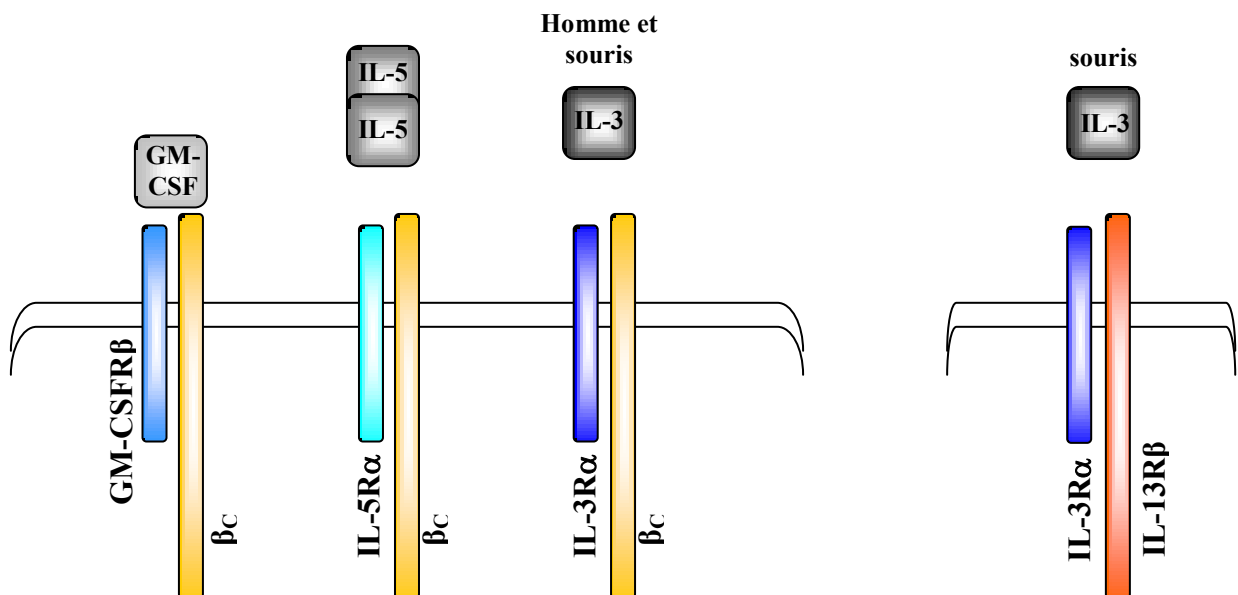
**c) Le groupe des cytokines hématopoïétiques à récepteur hétérodimérique ou hétérotrimérique utilisant la chaîne transductrice  $\gamma_c$  (Figure 3C).** Ces cytokines sont l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. La chaîne réceptrice spécifique de chaque cytokine est appelée chaîne réceptrice  $\alpha$ . L'IL-2 et l'IL-15 partagent, en plus de la chaîne  $\gamma_c$ , la chaîne transductrice IL-2R $\beta$ . L'IL-13 qui ne partagent pas la chaîne  $\gamma_c$  et dont le seul récepteur fonctionnel de forte affinité est formé de L'IL-4R $\alpha$  et de l'IL-13R $\alpha_1$ .

**d) Le groupe des cytokines à récepteur multimérique (Figure 4)** correspond à la famille IL-6/IL-12. La famille de l'IL-6 comprend, en plus de cette cytokine, l'IL-11, le CNTF, le LIF, l'OSM, la CT-1, et la CLC sécrétée uniquement si elle est complexée au "Cardiotrophin-Like Factor-1" (CLF-1) ou au CNTF-R. Deux homologues viraux de l'IL-6 sont connus : la "Kaposi Sarcoma associated human herpes Virus 8 interleukin-6" (KSV-IL-6) et la "Rhesus macaque rhadinovirus Interleukin-6" (Rm-IL-6). Toutes ces cytokines partagent la chaîne transductrice gp130, et certaines partagent la chaîne transductrice gp190. La CT-1 posséderait une chaîne spécifique non déterminée qui serait ancrée à la membrane plasmique par une liaison GPI déjà décrite pour le CNTF-R membranaire (Pennica *et al.* 1996 ; Robledo *et al.* 1997).



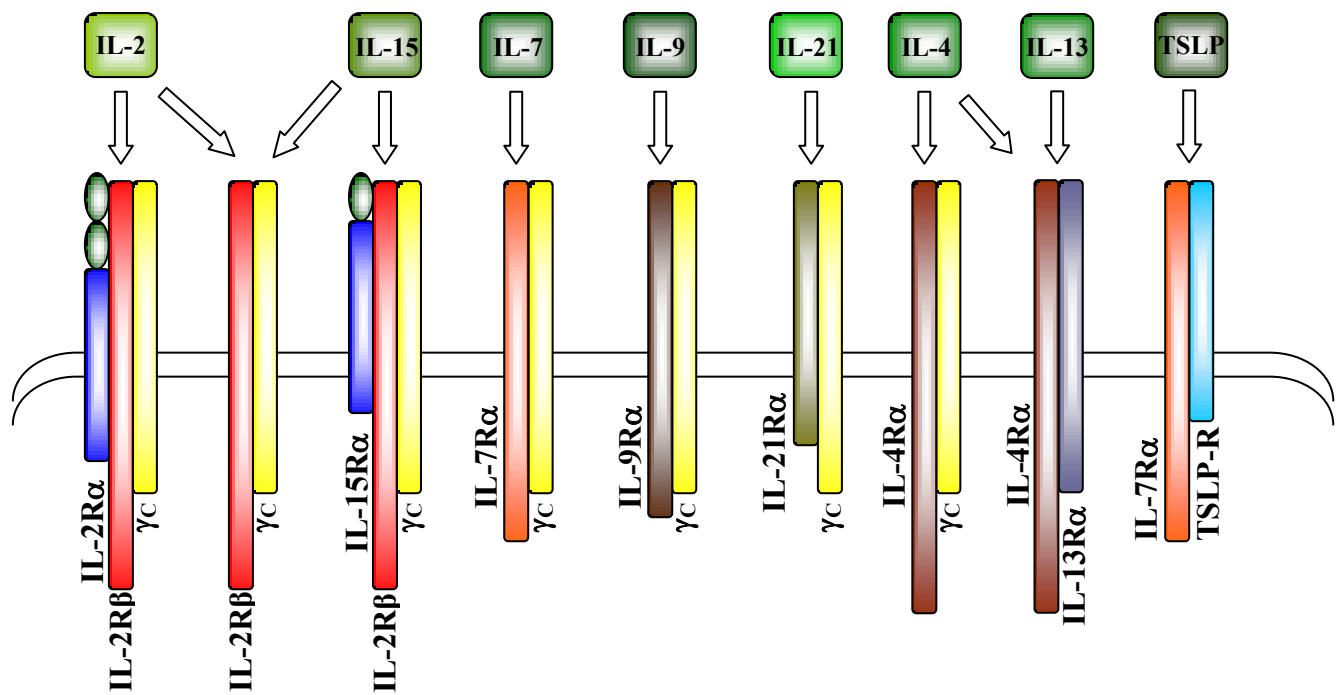
### A : Récepteurs homodimérique.

Ce groupe comprend la GH, Le TPO, le G-CSF, l'EPO, la PRL et la leptine.



### B : Récepteurs hétérodimériques utilisant la chaîne transductrice $\beta_c$ .

Contrairement aux deux autres cytokines de ce groupe, l'IL-5 agit sous la forme d'un dimère. La chaîne murine IL-3R $\alpha$  est alternativement utilisée avec la chaîne  $\beta_c$  de souris ou la chaîne IL-3R $\beta$  murine homologue de la  $\beta_c$ .



**C :** Récepteurs hétérodimériques ou hétérotrimériques utilisant la chaîne transductrice  $\gamma_C$ .

**Figure 3 : Récepteurs fonctionnels des cytokines hématopoïétiques**



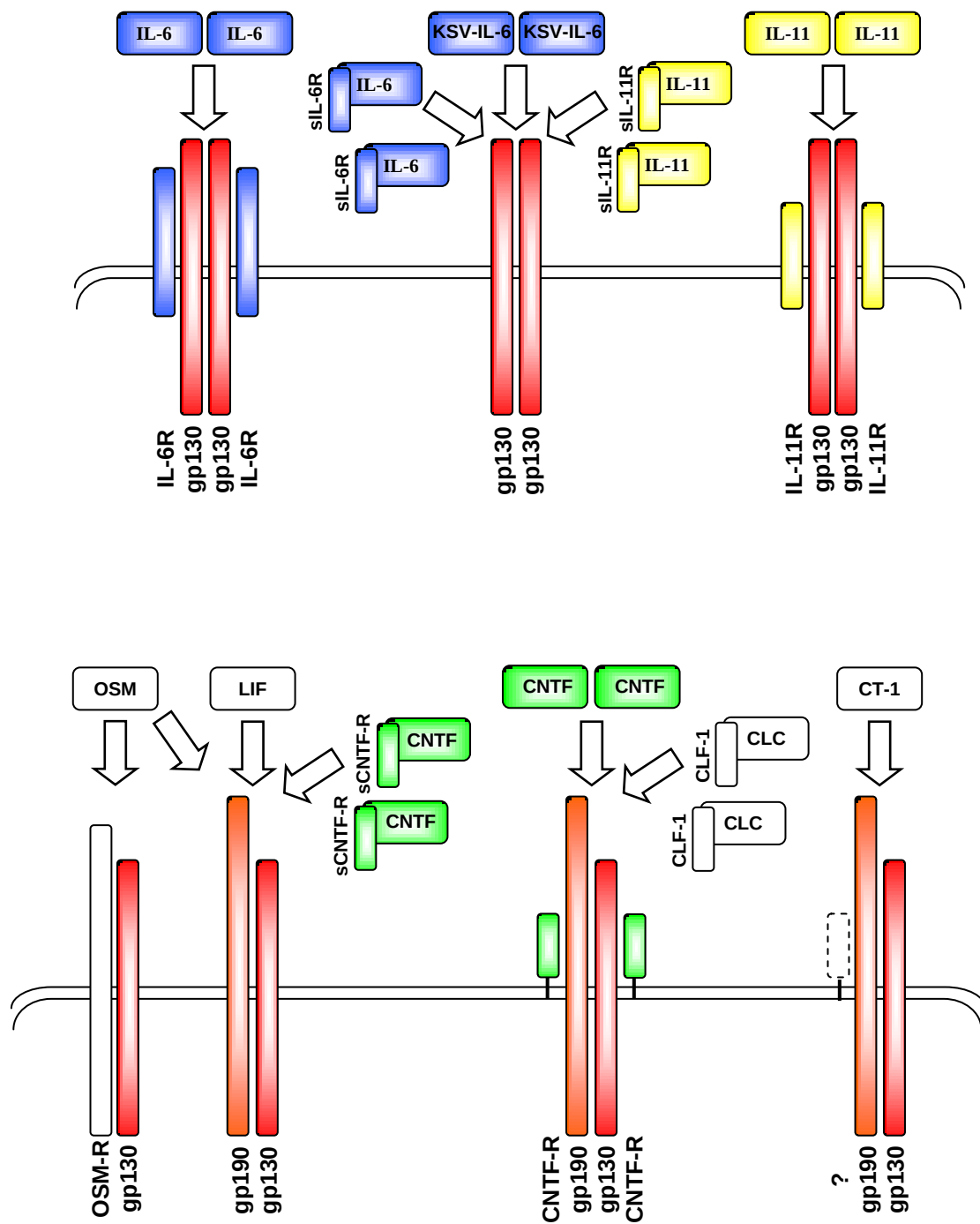
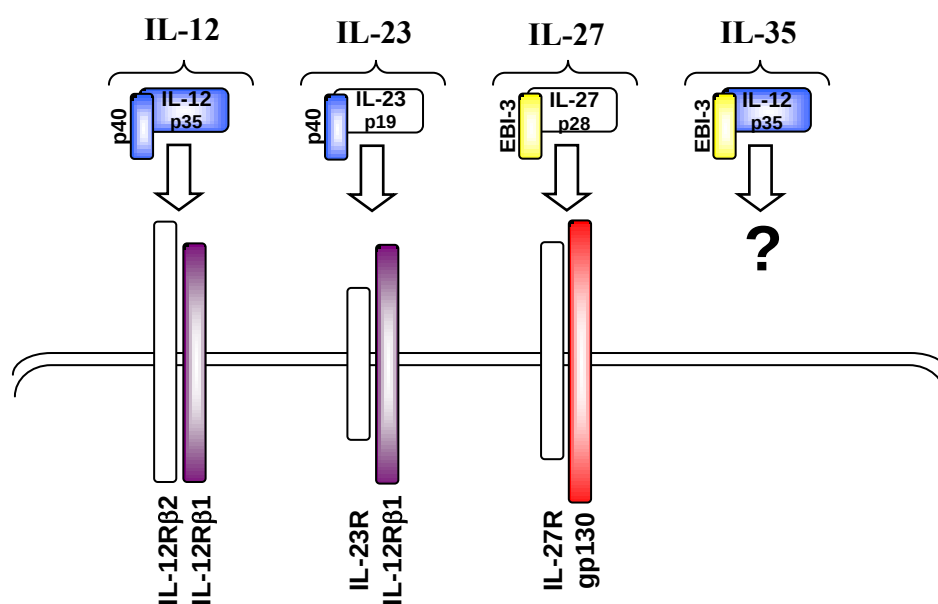


Figure 4 : Récepteurs multimériques fonctionnels des cytokines de la famille IL-6/IL-12

### e) Cas particuliers :

L'IL-12, IL-23, IL-27 et l'IL-35 sont des cytokines dont les structures sont comparables à celle d'un complexe cytokine/récepteur soluble. La structure et le mode d'utilisation des récepteurs spécifiques solubles permettent de rapprocher la famille de l'IL-6 à celle de l'IL-12. (Figure 5).



**Figure 5 : Cas particuliers de l'IL-12, l'IL-23, l'IL-27 et l'IL-35**

- L'IL-12, une cytokine hétéro-dimérique composée de deux sous-unités, p35 et p40, liées par deux ponts di-sulfures (Gately *et al.* 1991 ; Gubler *et al.* 1991 ; Wolf *et al.* 1991). La sous-unité p40 est similaire aux récepteurs de cytokines, alors que la sous-unité p35 est similaire à l'IL-6 et au G-CSF (Merberg *et al.* 1992). Les gènes codant pour p35 et p40 sont localisés sur deux chromosomes différents, respectivement le 3 et le 5. L'expression protéique de ces sous-unités est régulée de manière indépendante. Quand ces deux sous-unités sont co-exprimées dans la même cellule, elles forment un hétéro-dimère p70 biologiquement actif (Gubler *et al.* 1991). La p35 n'est pas sécrétée sous forme monomérique alors que la p40 peut être produite sous forme de monomères ou d'homodimères (p40<sub>2</sub>) en large excès par rapport à l'hétérodimère p70 *in vitro* et *in vivo*. Les homo-dimères de p40 sont antagonistes de p70 chez la souris (Gately *et al.* 1996), mais sont sans effet chez l'homme (Ling *et al.* 1995). La p40 aurait un rôle chimio-attractant pour les macrophages (Ha *et al.* 1999).

- L'IL-23 : La sous-unité p40 de l'IL-12 peut s'apparier avec une deuxième sous-unité, p19, qui possède des similitudes avec la p35, l'IL-6 et le G-CSF. Les produits bactériens induisent la production de p19 par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T et les cellules endothéliales. La sous-unité p19 requiert la co-expression de p40 pour sa sécrétion, associées, elles forment une nouvelle cytokine, l'IL-23 (Oppmann *et al.* 2000). Comme l'IL-12, l'IL-23 active la production d'IFN $\gamma$  par les cellules dendritiques et les cellules T (Belladonna *et al.* 2002). Une fonction propre à l'IL-23 est d'assurer la prolifération de cellules T mémoire (Oppmann *et al.* 2000). L'IL-23 lie un récepteur composé de l'IL-12R $\beta$ 1 et une deuxième chaîne, IL-23R (Parham *et al.* 2002). Le gène de l'IL-23R est localisé à 150kb de celui de l'IL-12R $\beta$ 2 sur le chromosome 1.

- L'IL-27 est une nouvelle cytokine hétérodimérique composée de l'EBI3 ("Epstein-Barr virus-induced gene 3") et une nouvelle sous-unité, p28 (Pflanz *et al.* 2002). La p28 est similaire à la sous-unité p35, et EBI3 est proche de p40 et ressemble à un récepteur soluble (Devergne *et al.* 1997). La co-expression des deux sous-unités est nécessaire pour une sécrétion efficace d'IL-27. La production d'IL-27 est restreinte aux cellules myéloïdes avec des niveaux élevés d'expression dans les monocytes et les cellules dendritiques activées par le LPS. L'IL-27 induit préférentiellement la prolifération des lymphocytes T naïfs, mais pas des T mémoires, en combinaison avec l'engagement du TCR (Pflanz *et al.* 2002). L'IL-27 agit seul ou en synergie avec l'IL-12 sur la production d'IFN $\gamma$  et donc joue un rôle dans la polarisation Th1. L'IL-27 lie un récepteur WSX-1 / TCCR, un autre récepteur possédant des similarités avec la gp130 (Chen *et al.* 2000 ; Yoshida *et al.* 2001). Le WSX-1 est exprimé principalement sur les lymphocytes T. Le WSX-1 apparaît nécessaire, mais non suffisant pour la signalisation de l'IL-27. Une seconde sous-unité transductrice différente des chaînes  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 est impliquée dans la signalisation. Il s'agit de la gp130 (Pflanz *et al.* 2004).

- L'IL-35 est une nouvelle cytokine de la famille IL-12 sécrétée par les lymphocytes T régulateurs mais pas par les lymphocytes T effecteurs. Cette cytokine dimérique est composée de la sous unité EBI3 également présente dans l'IL-27 et de la sous unité p35 de l'IL-12. (Niedbala *et al.* 2007). L'IL-35 supprime la réponse inflammatoire dans les modèles murins de maladies inflammatoires de l'intestin. Son activité suppressive est possible grâce à une activité sélective sur les différentes sous populations de lymphocytes T. En effet, cette cytokine induit la prolifération des cellules T régulatrices mais inhibe l'activité des cellules Th17 (Collison *et al.* 2007).

## C. La transduction du signal des cytokines hématopoïétiques

La fixation d'une cytokine sur son récepteur fonctionnel induit un signal qui, après transduction, entraîne une réponse cellulaire adaptée. La transduction du signal met en jeu différentes voies d'activation finement régulées afin que l'activation soit suffisante (Ihle *et al.* 1995 ; Gadina *et al.* 2001).

Les régions intracellulaires des chaînes réceptrices hématopoïétiques transductrices sont constitutivement associées avec des protéines tyrosine kinases, les JAKs. Les JAKs possèdent une activité kinase en C-terminal. La famille des JAKs comprend actuellement 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. La liaison de la cytokine entraîne une oligomérisation des récepteurs provoquant un rapprochement de leurs parties intracellulaires et l'activation des JAKs associées aux chaînes réceptrices. Les JAKs s'activent par autophosphorylation ou phosphorylations croisées. Elles phosphorylent les tyrosines du récepteur, ce qui permet l'initiation de différentes voies de signalisation par le recrutement de protéines adaptatrices et de kinases à motifs SH2. Cette première étape de recrutement de molécules de signalisation peut conduire à l'engagement des trois principales voies d'activation des cytokines hématopoïétiques (**Figure 6**) :

- la voie des STATs ("Signal Transducers and Activators of Transcription") : Les facteurs STATs, présents dans le cytoplasme sous forme monomérique inactive, sont phosphorylés par l'action des JAKs, ce qui conduit à leur dimérisation par interaction de leur domaine SH2 avec les phosphotyrosines. La forme dimérique de STAT (homo- ou hétérodimères) est transloquée vers le noyau où elle se lie à des séquences d'ADN spécifiques. Différentes combinaisons de JAK et STAT sont utilisées par chaque cytokine.

- la voie des MAPKs ("Mitogen-Activated Protein Kinases") : Ces MAPKs sont régulées en cascade par de nombreux facteurs. Les récepteurs membranaires phosphorylés par les JAKs recrutent d'abord des protéines adaptatrices telles que des kinases à motifs SH2 ou la protéine « Growth factor receptor-boundprotein 2 » (Grb-2) puis le facteur d'échange « son of sevenless » (Sos) ce qui active la protéine Ras ancrée à la membrane plasmique. Une cascade de phosphorylations de MAPK en découle ce qui conduit à l'action de facteurs de transcriptions (FT) impliqués dans la régulation de nombreux gènes cible. (Kishimoto *et al.* 1994)

- la voie de la PI3-K ("Phosphatidyl Inositol 3-Kinase") et d'Akt ("cellular homolog of the v-akt oncogene" ou PKB pour "Protein Kinase B") : L'activation de la PI3-K permet la phosphorylation du « phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate » (PIP<sub>2</sub>) en « phosphatidyl inositol 3,4,5-trisphosphate » (PIP<sub>3</sub>) au niveau de la membrane plasmique (Wymann *et al.* 1999). Le PIP<sub>3</sub> permet l'ancrage membranaire de la « 3-phosphatidyl inositol-dependent protein kinase 1 » (PDK1) et d'Akt puis induit un changement de conformation d'Akt nécessaire à son activation par la PDK1 (Hill *et al.* 2002). La kinase Akt devient alors cytosolique et peut avoir trois effets principaux : une augmentation de l'activité transcriptionnelle par l'intermédiaire du « nuclear factor kappa B » (NF-κB) (Romaskova *et al.* 1999), une augmentation de la traduction protéique en agissant sur la « small subunit ribosomal protein S6 kinase » (p70S6K) (Reif *et al.* 1997), et une augmentation de la survie cellulaire en induisant l'effet anti apoptotique de la « B cell leukaemia x large form protein » (Bcl-xl) (Datta *et al.* 1997).

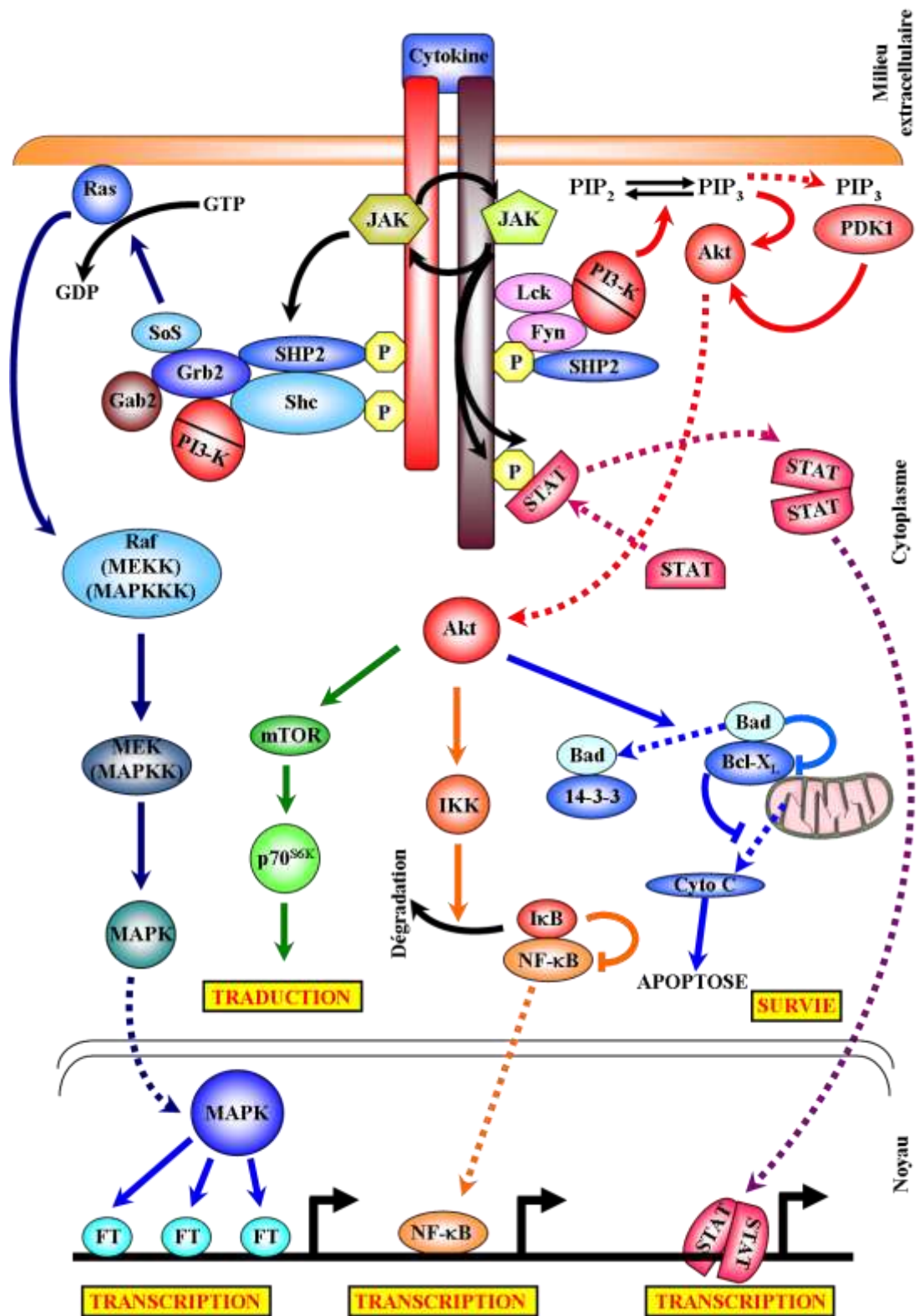


Figure 6 : La transduction du signal (voies d'activation)



La signalisation issue de la fixation de la cytokine sur son récepteur fonctionnel peut être régulée négativement de différentes façons:

- Certaines cytokines peuvent être complexées à des récepteurs solubles antagonistes ou être captées par des récepteurs membranaires non fonctionnels ("decoy receptors"). De plus, le complexe cytokine/récepteur peut être rapidement internalisé et dégradé.

- La quantité des différents éléments participant à la transduction du signal intracellulaire peut être contrôlée par dégradation au niveau du protéasome.

- L'information intercellulaire peut être contrôlée négativement voire rétrocontrôlée au niveau même de la transduction du signal intracellulaire. Par exemple, la phosphatase cytosolique « SH2-containing phosphatase 1 » (SHP1) inhibe la transduction du signal en déphosphorylant les JAKs et les régions intracytoplasmiques des récepteurs. Les gènes codants pour la famille des « suppressor of cytokine signalling » (SOCS) ont une transcription augmentée en réponse à l'activation des STATs. Ces protéines exercent leur rétrocontrôle en bloquant les JAKs activées et les phosphotyrosines des récepteurs (Alexander *et al.* 2002). Les facteurs « protein inhibition of activated STAT » (PIAS) régulent également la transduction du signal. En effet, ces protéines se lient aux STATs phosphorylées et inhibent l'activation transcriptionnelle. Pour la voie activatrice des MAPKs, les MKPs sont capables de déphosphoryler les MAPKs les rendant ainsi inactives. (Zhang *et al.* 2002). Enfin, certaines enzymes comme les « phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten » (PTEN), ou « SH2-containing inositol phosphatase » (SHIP) et « Protein phosphatase 2A » (PP2A) sont également très importantes pour la régulation négative de la voie PI3-K/Akt (**Figure 7**).





### III. Les récepteurs solubles de cytokines

Les cytokines sont responsables de nombreuses réponses cellulaires comme la régulation de l'activation du système immunitaire, la réponse aux parasites ou aux infections, la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose.... Les récepteurs solubles sont capables de fixer leurs cytokines spécifiques et de modifier leur activité biologique en exerçant un rôle agoniste ou antagoniste. La génération de telles molécules est un mécanisme clef pour moduler une signalisation dérégulée des cytokines. On retrouve des formes solubles pour une large majorité des récepteurs de cytokines. Ils sont produits soit par clivage protéolytique de la forme membranaire, soit par épissage alternatif d'un ARNmessenger.

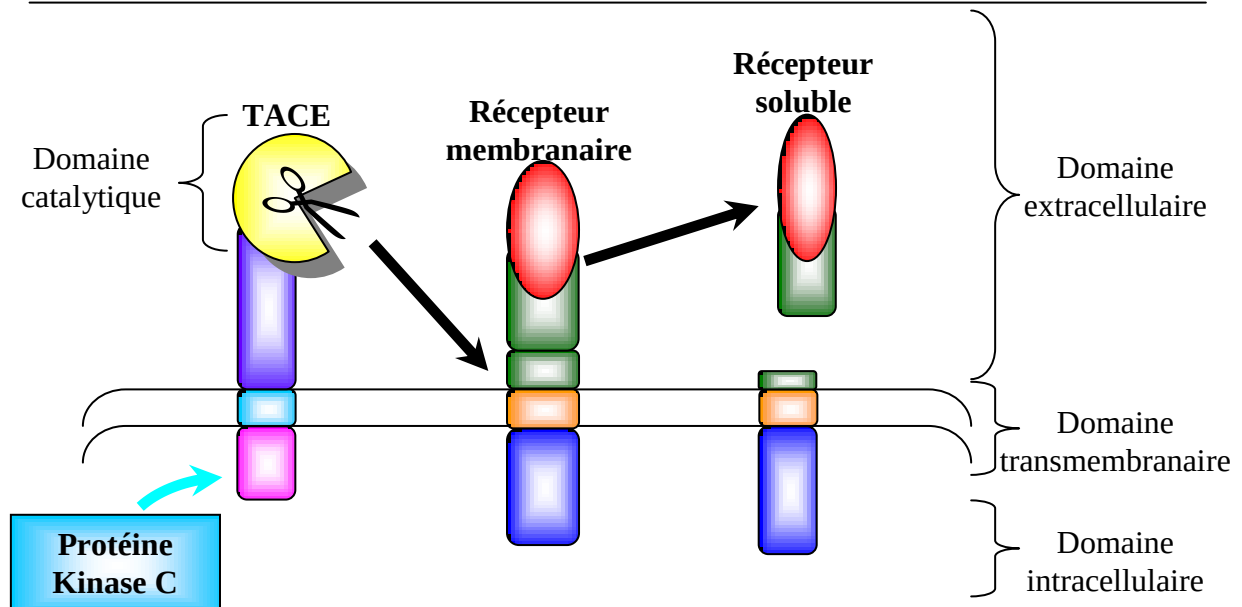
#### A. Mécanismes de génération d'un récepteur soluble

Le premier mécanisme fait appel à une coupure protéolytique et libération ("shedding") sous forme soluble du récepteur original lié à la membrane cellulaire. Le second mécanisme, plus spécialisé, consiste en une synthèse *de novo* à partir d'un ARN messenger spécifique de la forme soluble, issu d'un épissage alternatif et différent de ceux codant pour les formes membranaires. Un troisième mécanisme, moins représenté, consiste en la synthèse de protéines liant les cytokines. On peut classer les récepteurs solubles en fonction de leur mode de génération (Fernandez-Botran *et al.* 1991). Néanmoins, certains récepteurs solubles, comme le sIL-6R $\alpha$  et le sIL-4R $\alpha$ , peuvent être générés par les deux premiers mécanismes. D'autres modes de production de récepteurs solubles ont été mis en évidence comme la libération de récepteurs complets à l'intérieur de vésicules en provenance d'exosomes, ou encore à partir d'un clivage d'une forme de récepteur ancré à la membrane par une structure GPI (Soderberg *et al.* 2007).

## 1. Coupure protéolytique

Certains récepteurs solubles de cytokines, tel le sIL-2R $\alpha$  ou le sTNF-R (type I et II), sont générés exclusivement par clivage protéolytique de la forme membranaire du récepteur (Rubin *et al.* 1990 ; Smith *et al.* 1994). Des protéases agissent au niveau de la membrane plasmique et coupent la protéine membranaire à proximité du domaine transmembranaire, ce qui aboutit à la libération d'une forme tronquée du récepteur dans le milieu extracellulaire. Cependant les récepteurs membranaires cytokiniques n'ont pas l'exclusivité de ce processus protéolytique. D'autres molécules enchâssées dans la membrane peuvent subir ce type de mécanisme comme le TNF $\alpha$  (Gearing *et al.* 1994). De nombreuses protéines membranaires comme certaines molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, E-selectin, VCAM-1, CD44) et des récepteurs de facteurs de croissance (EGF, TGF $\alpha$ , NGF) sont également libérés suite à un clivage protéolytique (Gearing *et al.* 1993 ; Smith *et al.* 1994).

Le clivage protéolytique des récepteurs transmembranaires est souvent dépendant de métalloprotéases de la famille des ADAMs ("A Desintegrin And Metalloprotease"). Les ADAMs constituent une grande famille de protéines contenant de nombreux domaines : Une séquence signal en N-terminal, un prodomaine, un domaine « Zinc metalloprotease », un domaine desintégrine riche en cystéine, un domaine « EGF-like », un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Blobel *et al.* 2005 ; Milla *et al.* 2006 ; Moss *et al.* 2004). L'ADAM17 ou TACE ("TNF $\alpha$  Converting Enzyme") est une enzyme protéolytique typique qui a été identifiée grâce à son aptitude à couper le TNF $\alpha$  vers sa forme soluble (Black *et al.* 1997 ; Moss *et al.* 1997) (**Figure 8**). TACE est impliquée dans le clivage d'ectodomains et la libération de nombreux récepteurs de cytokines appartenant à différentes superfamilles, dont la famille du TNFR, comprenant le TNFR de type II (TNFRSF1B, TNFR2), TNFR1, CD30 (TNFRSF8), et CD40 (TNFRSF5); la famille IL-1/TLR (IL-1RII); la famille de récepteur de cytokine de type I (IL-6R $\alpha$ ); et l'IL-15R $\alpha$  (Budagian *et al.* 2004 ; Levine *et al.* 2004 ; Garton *et al.* 2006 ; Mortier *et al.* 2004).



**Figure 8 : Génération des Récepteurs Solubles par Coupure protéolytique**

Les mécanismes d'activation et de régulation de TACE ne sont pas clairement élucidés. La longueur du domaine juxtamembranaire et la séquence en acides aminés de part et d'autre du site de clivage participe à la spécificité de l'enzyme (Hinkle *et al.* 2004).

Il existe de nombreux mécanismes par lesquels l'activité de la TACE peut être régulée. Le prodomaine de la TACE et l'enzyme « Tissue inhibitor matrix metalloproteinases 3 » (TIMP3) agissent comme des inhibiteurs du site catalytique (Leonard *et al.* 2005 ; Mohammed *et al.* 2004). De plus, la TACE est synthétisée sous forme inactive qui devient active après clivage par des proprotéines convertases comme les furines. Le domaine intracytoplasmique de la TACE, composé d'un domaine SH2, d'un domaine SH3 et d'un domaine phosphorylable régulé par les MAPKs (Soond *et al.* 2005) pourrait intervenir dans l'activation et la régulation de la TACE. D'autres mécanismes peuvent également entrer en jeu pour réguler l'activité de TACE : l'internalisation ou l'activation de TACE modérant la présence de la protéine mature à la surface de la cellule (Doedens *et al.* 2000), le confinement de TACE et de ses substrats dans des microdomaines lipidiques (Von tresckow *et al.* 2004 ; Tellier *et al.* 2006). La plupart des études portant sur les mécanismes d'activation de TACE utilisent le PMA, un agent activateur non-physiologique de la protéine kinase C (Mezyk *et al.* 2003).

D'autres membres de la famille d'ADAMs possèdent une activité catalytique permettant la libération de récepteur soluble de cytokines (Levine *et al.* 2004). Par exemple, ADAM10 est responsable de la libération du CD30 de façon calcium dépendante ou de l'IL-6R $\alpha$  de façon constitutive et inductible par l'activation de la protéine kinase C (Levine *et al.* 2004 ; Eichenauer *et al.* 2007). Le TNF $\alpha$ , le ligand de l'ostéoprotégérine et le ligand 1 de Kit (KitL1) ont été identifiés comme substrats d'ADAM19 (Kawaguchi *et al.* 2007).

Les récepteurs solubles de cytokines peuvent également être générés via un mécanisme de coupure protéolytique intramembranaire. Le clivage du « decoy receptor » de type II de l'IL-1 (IL-1RII), par un mécanisme de type  $\alpha$ -sécrétase, libère l'ectodomaine de l'IL-1RII et laisse un fragment C-terminal membranaire protéolysé par une  $\gamma$ -sécrétase qui libère une forme soluble intracellulaire de l'IL-1RII. (Kuhn *et al.* 2007). Les métalloprotéases matricielles (MMP) possèdent également une activité protéolytique. MMP-12 (macrophage métalloélastase) est impliquée dans le clivage du domaine amino-terminal (D1) du récepteur plasminogène de type urokinase (Koolwijk *et al.* 2001). MT1-MMP est impliqué dans le clivage de CD44, libérant dans le milieu un fragment soluble de 70 kDa (Kajita *et al.* 2001). MT1-MMP et MT3-MMP sont impliqués dans le clivage du TGF- $\beta$ R de type III (T $\beta$ R-III) betaglycan (Velasco-Loyden *et al.* 2004) et MMP-9 dans celui de l'IL-2R $\alpha$  des lymphocytes T activés (Sheu *et al.* 2001).

## 2. Epissage alternatif

Un autre mécanisme de génération de récepteurs solubles de cytokines fait suite à l'épissage alternatif du transcrit ARN conduisant à un ARN messenger codant pour un récepteur délété de son domaine transmembranaire.

L'existence de différents ARN messagers codant pour les formes membranaire et soluble de différents récepteurs de cytokines ont été décrits pour : la super-famille des récepteurs de cytokines de classe I (l'IL-4R $\alpha$ , IL-5R $\alpha$ , IL-6R $\alpha$ , IL-7R $\alpha$ , IL-9R $\alpha$ , EpoR, G-CSFR, GM-CSF-R $\alpha$ , gp130, et LIFR $\alpha$ ), de classe II (type I IFNR (IFNAR1 et IFNAR2 $\alpha$ )), la famille IL-1R/TLR (IL-1RII, IL-1RAcP), les récepteurs de la famille TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-I), la superfamille TNFR (TNFRSF6/Fas/CD95, TNFRSF9/4-1BB/CD137), et le IL-17R (Levine *et al.* 2004) (**Tableau 1**). Dans tous les cas, le transcrit original dérive d'un seul et même gène, et l'épissage alternatif conduit à au moins deux types de messagers

(Wrighton *et al.* 1992). Des délétions d'exons ou des inclusions d'introns contenant une séquence codant un stop en amont du domaine transmembranaire conduisent à un messager du récepteur plus court codant pour un récepteur soluble. La traduction de ce récepteur conserve son domaine de liaison à son ligand, mais pas le domaine transmembranaire. Plusieurs récepteurs de cytokines comme l'IL-1R2, l'IL-6R $\alpha$ , l'IL-15R $\alpha$  et le TNFR2 (TNFRS1B) peuvent être produits selon les deux modes : coupure protéolytique et épissage alternatif. Par exemple, une forme soluble du TNFR2, déletée des exons 7 et 8 codant respectivement pour le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique (Lainez *et al.* 2004).

Les signaux et les mécanismes régulant l'épissage alternatif n'ont pas tous été élucidés. Il est possible que l'activation cellulaire et/ou d'autres événements puissent influencer un tel processus, conduisant à la transcription préférentielle d'une forme par rapport à une autre. Un tel processus régulateur pourrait avoir d'importants effets régulateurs sur l'activité de la cytokine impliquée en altérant l'expression différentielle des formes soluble et membranaire de son récepteur, et modifiant, de ce fait, la réponse des cellules cibles.

### 3. Protéines solubles liant les cytokines

Le troisième mécanisme de génération de récepteurs solubles implique la transcription et la traduction de gènes distincts codant pour des protéines solubles liant les cytokines, BP ("Binding Protein").

La signalisation par le TNFR et la superfamille de cytokines de classe II peut être régulée de cette façon. Le récepteur Decoy 3 (DcR3/TNFRSF6B/TR6/M68) est un membre de la superfamille TNFR qui contient un peptide signal et quatre domaines en tandem riches en cystéines mais dépourvus de domaine transmembranaire et donc sécrétés. DcR3 peut lier le Fas ligand (TNFSF6), LIGHT (TNFSF14), et TL1A ("endothelial cell-derived TNF-like factor"), et inhibe l'apoptose en empêchant l'association des ligands avec Fas, le récepteur de la lymphotoxine  $\beta$  (TNFRSF3), et le DR3 ("Death Receptor 3"). DcR3 est fortement exprimé par les cellules malignes comme mécanisme de défense contre les attaques immunitaires cytotoxiques dépendant des ligands Fas (Ho *et al.* 2007)

L'ostéoprotégérine (TNFRSF11b), un autre membre de la superfamille de TNFR, est aussi générée comme une protéine soluble qui lie le TNFSF11 et inhibe la

différenciation ostéoclastique (Levine *et al.* 2004). IL-22RA2 (IL-22R $\alpha$ 2) est un membre de la famille des récepteurs de cytokines de classe II, dépourvu de domaine transmembranaire et qui agit comme une protéine antagoniste liant l'IL-22 (Dumoutier *et al.* 2001 ; Kotenko *et al.* 2001 ; Xu *et al.* 2001). L'IL-18-BP, qui partage de faibles similitudes avec l'IL-1RII et ne possède pas de domaine transmembranaire est également capable de lier l'IL-18 pour inhiber sa fonction (Novick *et al.* 1999). La forme soluble de ST2, un membre de la famille IL-1R, lie l'IL-33 et bloque son action anti-hypertrophique (Sanada *et al.* 2007).

| Récepteurs           | Protéolyse (P)<br>Epissage Alternatif (EA)<br>Protéines liant la cytokine (BP) | Fonctions             | Références                          |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| IL-1R <sub>I</sub>   | P                                                                              | Rôle de IL-1RA        | (Dinarello <i>et al.</i> 1998)      |
| IL-1R <sub>II</sub>  | P                                                                              | Rôle de IL-1RA        | (Dinarello <i>et al.</i> 1998)      |
| ST2                  | BP                                                                             | Antagoniste           | (Berger <i>et al.</i> 1994)         |
| IL-2R                | P                                                                              | Antagoniste           | (Nelson <i>et al.</i> 1998)         |
| IL-3R                | ?                                                                              | Antagoniste           | (Mangi <i>et al.</i> 1999)          |
| IL-4R                | P + EA                                                                         | Antagoniste           | (Gessner <i>et al.</i> 2000)        |
| IL-5R                | EA                                                                             | Protéine non détectée | (Weltman <i>et al.</i> 2000)        |
| IL-6R                | P + EA                                                                         | Sensibilisation       | (Jones <i>et al.</i> 2001)          |
|                      |                                                                                | Transsignalisation    | (Montero-Julian <i>et al.</i> 2001) |
| IL-7R                | EA                                                                             | Protéine non détectée | (Hofmeister <i>et al.</i> 1999)     |
| IL-9R                | EA                                                                             | Protéine non détectée | (Demoulin <i>et al.</i> 1998)       |
| IL-10R               | ?                                                                              | Antagoniste           | (Moore <i>et al.</i> 2001)          |
| IL-11R               | ?                                                                              | Sensibilisation       | (Borbolla <i>et al.</i> 2001)       |
|                      |                                                                                | Transsignalisation    |                                     |
| p40-IL-12            | ?                                                                              | Antagoniste           | (Adorini <i>et al.</i> 1999)        |
| IL-13R               | ?                                                                              | Antagoniste           | (Murata <i>et al.</i> 1999)         |
| IL-15R               | P                                                                              | Antagoniste           | (Waldmann <i>et al.</i> 2001)       |
|                      |                                                                                |                       | (Budagian <i>et al.</i> 2004)       |
|                      |                                                                                |                       | (Mortier <i>et al.</i> 2004)        |
| IL-18-BP             | BP                                                                             | Antagoniste           | (Nakanishi <i>et al.</i> 2001)      |
| IL-22                | BP                                                                             | Antagoniste           | (Dumoutier <i>et al.</i> 2001)      |
|                      |                                                                                |                       | (Kotenko <i>et al.</i> 2001)        |
| CNTF-R               | P                                                                              | Agoniste quand        | (Davis <i>et al.</i> 1993)          |
|                      | Sécrété complexé                                                               | complexé avec CLC     | (Baumann <i>et al.</i> 1996)        |
| CT-1                 | ?                                                                              | ?                     |                                     |
| CLC-R                | BP                                                                             | Chaperon              | (Elson <i>et al.</i> 2000)          |
| CLC/CLF              |                                                                                |                       |                                     |
| CLC/sCNTFR           |                                                                                |                       |                                     |
| TNF-R <sub>I</sub>   | P                                                                              | Inhibition            | (Wajant <i>et al.</i> 2001)         |
|                      |                                                                                |                       | (Gomez <i>et al.</i> 2007)          |
| TNF -R <sub>II</sub> | P+EA                                                                           | Inhibition            | (Wajant <i>et al.</i> 2001)         |
|                      |                                                                                |                       | (Lainez <i>et al.</i> 2004)         |
| gp130                | EA                                                                             | Inhibition de la      | (Montero-Julian <i>et al.</i> 2001) |
|                      |                                                                                | Transsignalisation    |                                     |
| LIF-R $\beta$        | EA                                                                             | Antagoniste           | (Auernhammer <i>et al.</i> 2000)    |
| OSM-R $\beta$        | EA ?                                                                           | ?                     | (Gomez-Lechon <i>et al.</i> 1999)   |
| IL-2R $\beta$        | EA                                                                             | ?                     | (Nelson <i>et al.</i> 1998)         |
| IL-2R $\gamma$       | P                                                                              | Antagoniste           | (Meissner <i>et al.</i> 2001)       |

**Tableau I : Exemples de différents Récepteurs Solubles de Cytokines, leurs Modes de Production et leurs Actions**

## **B. Mécanismes de libération d'un récepteur soluble**

### **1. Vésicules exosome-like**

Les exosomes sont de petites vésicules membranaires d'origine endocytaire (Thery *et al.* 2002). La forme totale du TNFR1 peut être constitutivement libérée par les cellules endothéliales vasculaires humaines dans le milieu extracellulaire comme le constituant d'une vésicule exosome de 20-50 nm de diamètre (Hawari *et al.* 2004). Les vésicules exosome TNFR1 issues des HUVEC ne semblent pas posséder de capacité de signalisation intrinsèque. De même, le FasL associé à la membrane peut être libéré à partir de cellules de mélanomes sous forme de microvésicules (100 à 200 nm de diamètre). Il possède alors un effet pro-apoptotique sur les cellules lymphoïdes sensibles à Fas et diminue les réponses anti-tumorales (Andreola *et al.* 2002). De la même manière, les cellules de mélanomes libèrent des exosomes exprimant le TNF, le TNFR1 et le TNFR2 (Sorderberg *et al.* 2007).

### **2. Ectodomains liés par une ancre GPI**

Le clivage du CNTFR $\alpha$  (« Ciliary Neutrophilic Factor Receptor  $\alpha$  ») est dépendant de la PLC (« phospholipase C »). Le CNTFR $\alpha$  soluble permet au CNTF d'agir sur les cellules qui normalement sont insensibles à cette cytokine (Davis *et al.* 1991 ; Davis *et al.* 1993).

### **3. Origine virale**

L'utilisation de récepteurs solubles de cytokines comme modulateurs efficaces de la réponse immunitaire innée a été exploitée par les virus. Ils synthétisent des protéines identiques aux récepteurs de cytokines de mammifère afin d'échapper au système de défense de l'hôte. Le premier TNFR viral identifié est la protéine T2 du virus du fibrome de Shope, qui est structurellement proche du TNFR2, mais sans la partie transmembranaire. T2 est sécrété par les cellules infectées par le virus et agit comme une protéine liant le TNF (Smith *et al.* 1990). Une protéine proche de la protéine T2 est codée

par le virus du myxome (Upton *et al.* 1991). Quatre analogue du TNFR, issus du poxvirus, ont été identifiés : les protéines Crm (« Cytokine response modifying »), qui lient différents ligands. CrmB et CrmD lient le TNF et la lymphotoxine  $\alpha$ , alors que CrmC et CrmE lient seulement le TNF. Les poxvirus, le cowpox et le mousepox, expriment un analogue soluble de CD30, qui peut lier CD30L avec une forte affinité, et inhibe l'inflammation de type Th2 *in vivo*. Des protéines solubles virales similaires au récepteur de l'IFN de type I, du récepteur de l'IFN- $\gamma$  l'IL-1RII, et à la protéine liant l'IL-18 ont également été identifiés (Levine *et al.* 2004).

## **C. Régulation de la production de récepteur soluble**

La plupart des études originales sur les différents récepteurs solubles se basent sur des observations *in vitro* et/ou des cellules recombinantes. Cependant la production de récepteurs solubles a été confirmée *in vivo* chez l'homme et chez l'animal. Néanmoins, les informations sur le type de cellule responsable de la production de différents récepteurs solubles et les facteurs qui régulent leur production sont incomplètes.

La plupart des récepteurs solubles sont produits à de faibles concentrations, mais leur production est accrue en réponse à l'activation cellulaire (Rubin *et al.* 1990 ; Honda *et al.* 1992 ; Chilton *et al.* 1993 ; Cope *et al.* 1995). Ainsi, des concentrations sériques de sIL-2R $\alpha$ , sTNF-R (types I et II), et sIL-6R $\alpha$  ont été retrouvées à des niveaux élevés dans des conditions cliniques associées à des réponses immunitaires aiguës et/ou inflammatoires (Rubin *et al.* 1990 ; Arend *et al.* 1995). Plusieurs facteurs, dont les molécules d'activation cellulaire et les cytokines, apparaissent jouer un rôle dans la régulation de la production de récepteurs solubles pendant des réponses immunitaires ou inflammatoires.

### **1. Activation cellulaire**

L'activation cellulaire des lymphocytes, monocytes et autres populations cellulaires conduisent à une régulation positive des différents récepteurs de cytokines à la surface des



cellules (Lowenthal *et al.* 1985 ; Ohara *et al.* 1988). Par conséquent, il n'est pas surprenant d'observer que la production de formes solubles de ces mêmes récepteurs, en particulier ceux issus d'un « shedding » de la forme membranaire, soit aussi augmentée après activation cellulaire. L'identité des cellules produisant les récepteurs solubles *in vivo* est rarement élucidée et il est également difficile de prévoir quel stimulus est responsable de l'accroissement de la production d'un récepteur soluble spécifique *in vivo*. Cependant, la production de récepteurs solubles impliquées dans les fonctions et la prolifération des lymphocytes T (IL-2 et IL-4) est augmentée en réponse à une activation T (Rubin *et al.* 1990 ; Chilton *et al.* 1993). La production de récepteurs solubles de cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) est régulée positivement après activation monocytaire et/ou en réponse à une inflammation (Symons *et al.* 1990). L'activation T a également augmenté la production de sIL-6R $\alpha$  et de sTNF-R (Honda *et al.* 1992 ; Bemelmans *et al.* 1994 ; Cope *et al.* 1995).

## 2. Cytokines

La production de récepteurs solubles est régulée par des cytokines. Il apparaît que la production de récepteurs, comme le sIL-2R $\alpha$  (Lotze *et al.* 1987 ; Voss *et al.* 1989), le sIL-4R $\alpha$  (Chilton *et al.* 1993) et les sTNF-R (Lantz *et al.* 1990 ; Cope *et al.* 1995), sont régulées par leurs propres ligands, suggérant un mécanisme de rétro-contrôle dans lequel la présence de la cytokine induit la production et la sécrétion de son récepteur soluble spécifique, dans le but de réguler négativement sa propre activité. La production de sIL-4R $\alpha$  est étroitement liée à la réponse immunitaire caractérisée par une sécrétion importante d'IL-4, à savoir la réponse Th2. En effet, on observe une augmentation de la production de sIL-4R $\alpha$  par les cellules murines fraîchement isolées, lymphocytes T et B et macrophages en réponse à l'IL-4 (Chilton *et al.* 1993). De plus, l'expression de l'ARN messager codant pour le sIL-4R $\alpha$  dans les cellules spléniques stimulées par l'IL-4 est augmentée. Il existe également une corrélation entre l'expression du sIL-4R $\alpha$  *in vivo* et le développement de la réponse Th2 dans un modèle murin de schistosome (Fernandez-Botran *et al.* 1995).

Dans le cas de l'IL-2, la cytokine elle-même peut augmenter l'expression membranaire de la chaîne réceptrice IL-2R $\alpha$  (Bismuth *et al.* 1984 ; Smith *et al.* 1985). L'administration d'IL-2 chez des patients atteints de cancer a pour conséquence le développement de cellules présentant le récepteur de l'IL-2 et l'augmentation du niveau

d'expression du sIL-2R $\alpha$  dans le sérum (Lotze *et al.* 1987). De même, de fortes concentrations de sTNF-R (types I et II) ont été retrouvées dans le sérum dans des conditions favorisant la sécrétion de TNF $\alpha$ , comme l'endotoxémie dans le choc septique (Leeuwenberg *et al.* 1994 ; Kuhns *et al.* 1995). De plus, l'injection de TNF $\alpha$  chez des patients induit une augmentation de l'expression de sTNF-R dans leur sérum (Lantz *et al.* 1990). Les mécanismes responsables de la régulation de la production des récepteurs solubles par leur propre ligand ne sont pas totalement clairs. Une hypothèse serait que la liaison de la cytokine sur son récepteur membranaire pourrait induire son « shedding ».

Outre l'effet régulateur de leur propre cytokine, il existe des mécanismes de contrôle de la production de récepteur soluble par des cytokines indépendantes. Par exemple, l'activation de lymphocytes B murins par l'IL-5 augmente l'expression de l'IL-2R $\alpha$  membranaire et soluble par ces cellules (Loughnan *et al.* 1989). L'IL-6 et l'IFN $\gamma$  augmentent la production de sIL-4R $\alpha$  par une lignée cellulaire myéloïde et par les macrophages dérivés de la moelle osseuse (Ruhl *et al.* 1993). L'IL-1 régule positivement l'expression membranaire du TNF-R de type I et augmente le sTNF-R de types I et II chez des patients traités par de l'IL-1 $\beta$  (Bargetzi *et al.* 1993). Des cytokines peuvent aussi se réguler mutuellement. L'IL-1 $\beta$  induit la production de sIL-4R $\alpha$  par les cellules Th2 murines (Fernandez-Botran *et al.* 1996), alors que l'IL-4 favorise la production du sIL-1R type II et du récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1Ra) (Arend *et al.* 1995).

### 3. Autres facteurs

D'autres signaux jouent un rôle dans la régulation de la production et la sécrétion de récepteurs solubles. Certains signaux sont générés par des contacts directs entre cellules, et pourraient être médiés par un signal de co-stimulation (CD28/B7-1,-2, gp39/CD40). Une interaction physique entre des cellules murines Th2 et des CPA suffit à activer la production de sIL-4R $\alpha$  (Fernandez-Botran *et al.* 1996). Dans des cas de pathologies hématologiques ou d'infections virales, en particulier par le virus HTLV-1, on observe une expression constitutive de l'IL-2R $\alpha$  membranaire et une production importante de sIL-2R $\alpha$  (Arend *et al.* 1995).

## IV. Fonctions des récepteurs solubles

La production de récepteurs solubles fait le plus souvent suite à l'activation cellulaire par les cytokines. Après l'action de la cytokine, la production de récepteur soluble tend à désensibiliser les cellules, et donc à limiter les effets de la cytokine dans le temps. Le processus de désensibilisation est la conséquence soit de la propriété antagoniste des récepteurs solubles, soit de la diminution de l'expression de la forme membranaire du récepteur par coupure protéolytique.

### A. Effets antagonistes

Dans la plupart des cas, les récepteurs solubles empêchent la liaison de la cytokine à son récepteur membranaire fonctionnel et par conséquent inhibe la signalisation et donc la réponse biologique. Ces effets antagonistes possèdent plusieurs caractéristiques communes. Ils sont spécifiques, dépendant de la concentration en récepteurs solubles et dépendant des affinités relatives entre le récepteur soluble et le récepteur membranaire (**Figure 9A**).

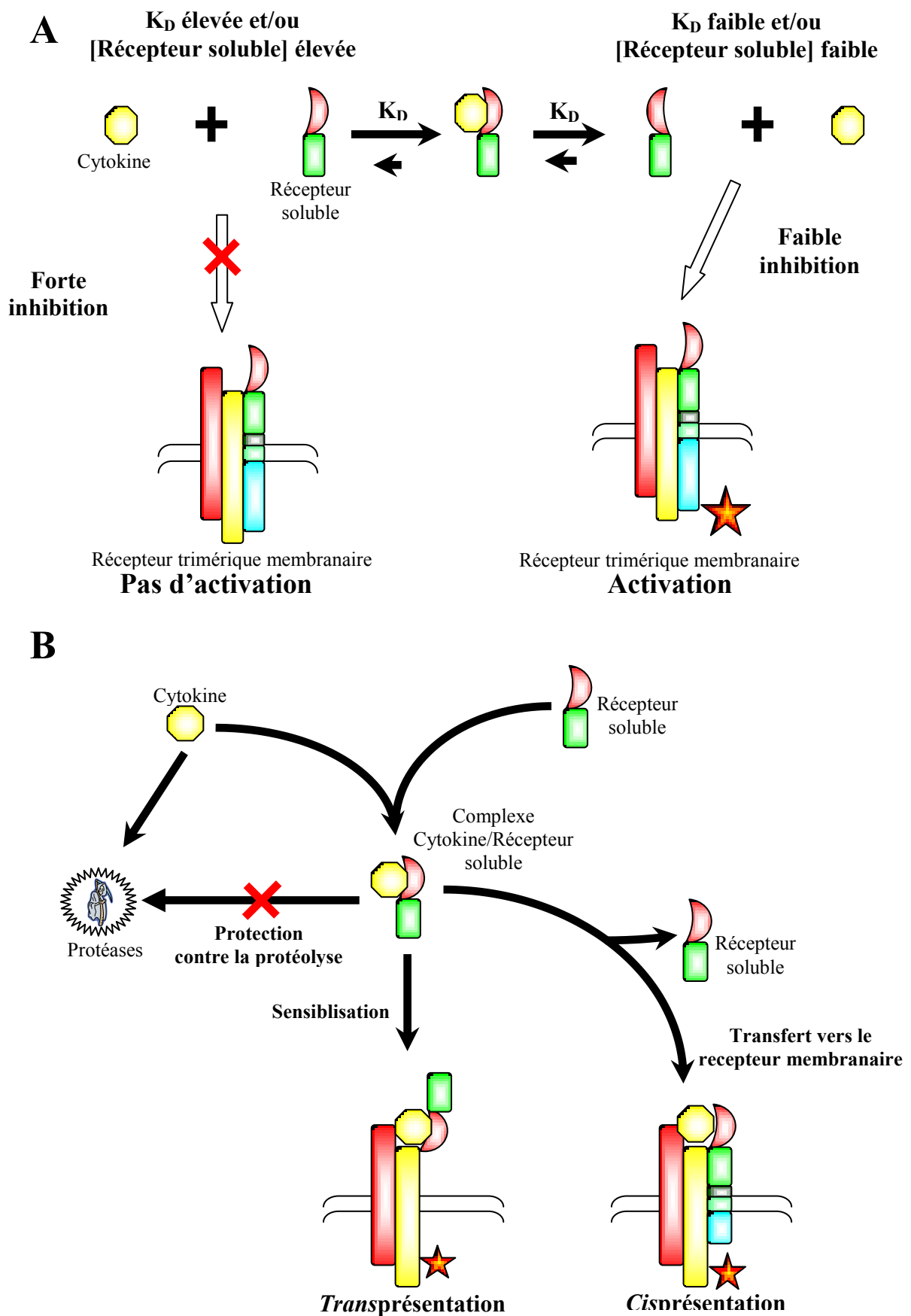
En effet, l'inhibition engendrée par le récepteur soluble se trouve restreinte à la liaison et à l'activité de son propre ligand (Mosley *et al.* 1989 ; Fernandez-Botran *et al.* 1990). L'effet antagoniste est inversement proportionnel à la concentration de cytokine. L'effet antagoniste est influencé par les affinités relatives de liaison de la cytokine pour ses récepteurs soluble et membranaire. L'association de la chaîne réceptrice spécifique du ligand avec les sous-unités transductrices conduit à la formation d'un récepteur membranaire de forte affinité. L'affinité de ces récepteurs membranaires multimériques s'avère, souvent, supérieure à l'affinité des récepteurs solubles. Par exemple, l'IL-2R $\alpha$  lie l'IL-2 avec une faible affinité, mais l'association avec les sous unités IL-2R $\beta$  et IL-2R $\gamma$ , résulte en la formation d'un récepteur trimérique de forte affinité. Ainsi, le sIL-2R $\alpha$  possède une affinité approximativement 1000 fois plus faible que celle du récepteur membranaire fonctionnel, et par conséquent ne constitue pas un compétiteur très efficace (Jacques *et al.* 1987 ; Baran *et al.* 1988). Au contraire, les récepteurs solubles capables de lier leur ligand avec une affinité comparable à celle du récepteur membranaire fonctionnel (multimérique), comme le sIL-4R et les sTNF-R, sont d'efficaces compétiteurs à faibles

concentrations (Fernandez-Botran *et al.* 1990 ; Dayer *et al.* 1994). Les effets antagonistes des récepteurs solubles jouent un rôle important dans la régulation négative et préviennent les effets toxiques de certaines cytokines (Fernandez-Botran *et al.* 1991 ; Debets *et al.* 1994). L'intérêt d'administrer des récepteurs solubles endogènes pour agir en tant qu'antagonistes des cytokines *in vivo* a été confirmé dans de nombreuses expériences (Debets *et al.* 1994 ; Gessner *et al.* 1994 ; Maliszewski *et al.* 1994 ; Arend *et al.* 1995).

## B. Effets agonistes

Certains récepteurs solubles ont des propriétés de transporteur, ou « carrier » (Fernandez-Botran *et al.* 1991 ; Mohler *et al.* 1993). Plusieurs récepteurs solubles potentialisent l'activité de leur propre cytokine *in vivo* en les protégeant notamment de la dégradation protéolytique en accroissant la stabilité de la cytokine et donc en augmentant sa  $\frac{1}{2}$  vie (**Figure 9B**).

La liaison de la cytokine sur son récepteur soluble accroît la stabilité moléculaire et peut la protéger contre l'action d'enzymes protéolytiques. *In vitro*, la présence de sIL-4R freine la dégradation de l'IL-4 par la trypsine (Fernandez-Botran *et al.* 1991). De même, *in vivo*, l'injection en intraveineuse de sIL-4R chez la souris, réduit la dégradation protéolytique d'IL-4 radiomarquée (Ma *et al.* 1996). De plus, le complexe cytokine/récepteur est transitoire, permettant ainsi un transfert de la cytokine de son récepteur soluble vers le récepteur membranaire. Le sIL-4R $\alpha$  présente une constante de dissociation pour l'IL-4 plus rapide que le récepteur membranaire, ce qui favorise la dissociation de l'IL-4 de son récepteur soluble et, par conséquent, permet la liaison à la membrane (Fernandez-Botran *et al.* 1991). L'association de la cytokine avec son récepteur soluble affecte ses propriétés pharmacocinétiques *in vivo*. L'IL-4 administrée en présence ou en l'absence de sIL-4R $\alpha$ , est rapidement éliminée de la circulation (Ma *et al.* 1996). La présence de sIL-4R $\alpha$  entraîne une augmentation dose-dépendante de sa  $\frac{1}{2}$  vie concomitamment à une diminution de sa clairance sanguine et de son élimination urinaire. La liaison au sIL-4R $\alpha$  protège aussi l'IL-4 contre l'inactivation protéolytique *in vivo*, contribuant à un niveau d'IL-4 bioactive dans la circulation plus élevé. De tels effets vont dans le sens d'une potentialisation de l'activité de leur cytokine *in vivo*. D'autres récepteurs solubles sont capables de sensibiliser certaines cellules à l'action d'une cytokine, c'est le cas de l'IL-6.



**Figure 9 : Fonctions Immunorégulatrices des Récepteurs Solubles de Cytokines**

A : Effets agonistes. B : Effets antagonistes.

## V. Les complexes Cytokine/Récepteur soluble : cas de l'IL-6/sIL-6R $\alpha$

L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle qui agit sur une grande variété de cellules. Les effets de l'IL-6 sont médiés par le son récepteur fonctionnel, IL-6R. L'IL-6R est un hétérodimère composé de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-6R et d'une sous-unité transductrice du signal, la gp130, partagée avec l'OSM-R (« Oncostatin-M Receptor »), le LIF-R (« Leukemia Inhibitory Factor Receptor ») et le CNTF-R (« Ciliary Neutropic Factor Receptor »). Le récepteur soluble de l'IL-6 (sIL-6R $\alpha$ ), seul, fixe l'IL-6 avec une faible affinité, mais la présence de la gp130 permet la formation d'un récepteur de forte affinité. Au contraire des autres récepteurs solubles, le complexe formé entre le sIL-6R $\alpha$  et l'IL-6 est capable d'interagir avec la sous-unité transductrice à la surface des cellules cibles : il est donc biologiquement actif. Le sIL-6R $\alpha$  favorise l'activité biologique de l'IL-6, que ce soit *in vitro* comme *in vivo* (Fernandez-Botran *et al.* 1996) (**Figure 10**).

Classiquement, la liaison de l'IL-6 à la forme membranaire du IL-6R $\alpha$  engendre le recrutement de 2 molécules membranaires de gp130 formant un complexe IL-6 tétra- ou hexamérique actif (Grotzinger *et al.* 1999) (**Figure 4**). Seul le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  est capable de fixer les gp130, alors que les molécules individuellement en sont incapables. De même que pour l'IL-12 (**Figure 5**), le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  constitue la cytokine active (Gearing *et al.* 1991 ; Oppmann *et al.* 2000). L'homodimérisation de deux gp130 enclenche la phosphorylation des gp130 et des STATs (STAT1 et 3) par les JAKs (JAK1 et 2, et TYK2) constitutivement associées aux gp130 (Heinrich *et al.* 1998). L'IL-6R $\alpha$  n'est pas impliqué dans la signalisation.

Le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  peut activer des cellules cibles exprimant des gp130 à leur surface. Ce processus est appelé *transsignalisation* (Rose-John *et al.* 1994) (**Figure 10**). Le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$  peut soit potentialiser l'activité de l'IL-6 sur les cellules exprimant IL-6R $\alpha$  membranaire (Mackiewicz *et al.* 1992 ; Peters *et al.* 1996 ; Peters *et al.* 1998), soit augmenter le panel de cellules cibles sensibles à l'IL-6 qui sont dépourvues de l'IL-6R $\alpha$ . Le sIL-6R $\alpha$  peut aussi protéger l'IL-6 contre la dégradation protéolytique dans les sites inflammatoires (Bank *et al.* 2000). Néanmoins, l'activité du complexe se trouve limitée par la présence d'une forme soluble de gp130, la sgp130, dans le sérum, qui entre

en compétition avec la forme membranaire de gp130 pour le complexe (Muller-Newen *et al.* 1998). Il a été suggéré qu'*in vivo*, le sIL-6R $\alpha$  jouerait un rôle antagoniste de l'IL-6 en formant un complexe ternaire IL-6, sIL-6R $\alpha$  et sgp130 (Muller-Newen *et al.* 1998). La sgp130 inhibe seulement l'effet de l'IL-6 passant par la *trans*présentation, et non celui transmis via la *cis*présentation (Jostock *et al.* 2001).

La gp130 soluble est aussi capable d'inhiber l'activité biologique d'autres cytokines qui utilisent au sein de leur complexe récepteur la gp130 (OSM, LIF, et CNTF). Il a récemment été décrit que le CNTF n'agit pas seulement avec le CNTFR membranaire ou soluble mais également avec l'IL-6R $\alpha$  sous ses deux formes (Schuster *et al.* 2003). Le sIL-6R $\alpha$  semble avoir des propriétés antagonistes en l'absence d'IL-6 (Knüpfner *et al.* 2008) notamment par l'association avec d'autres partenaires que l'IL-6.

Une protéine de fusion a été construite entre les domaines de l'IL-6 et du sIL-6R nécessaires à la fonction biologique, liés de façon covalente par un « linker » polypeptidique flexible. La protéine de fusion, appelée Hyper-IL-6, est 100 à 1000 fois plus active que le mélange d'IL-6 et de sIL-6R $\alpha$  séparés. De nombreuses cellules, comme les cellules progénitrices hématopoïétiques, les cellules neuronales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, qui ne répondent pas à l'IL-6, montrent une forte réponse à l'Hyper-IL-6 (Fischer *et al.* 1997 ; Renne *et al.* 1998 ; Jones *et al.* 2002 ; Hacker *et al.* 2003)

Cette approche a aussi été utilisée pour d'autres cytokines. Ainsi, il a été construit une protéine de fusion entre l'IL-11 et un récepteur soluble sIL-11R (Pflanz *et al.* 1999). La protéine de fusion CNTF/sCNTFR amplifie l'activité neurotrophique sur les neurones primaires de l'hippocampe (Sun *et al.* 2002).

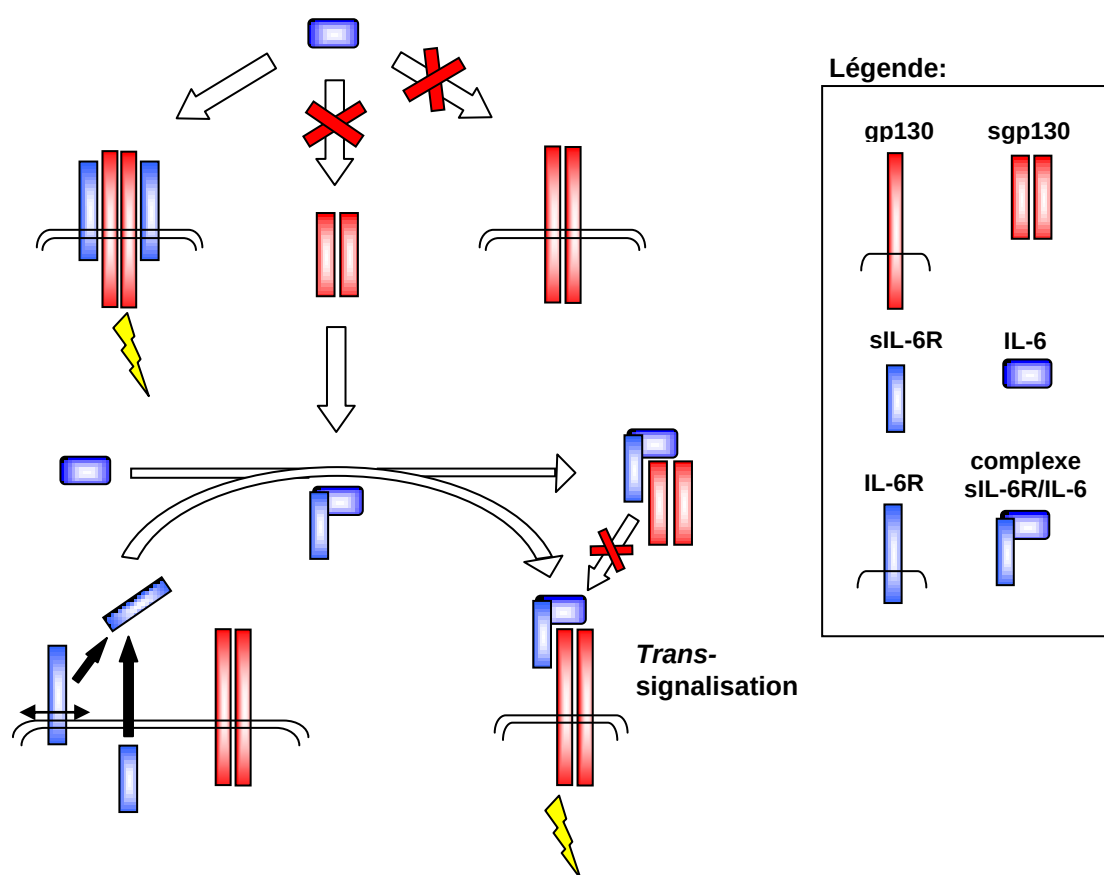


Figure 10 : Le complexe IL-6/sIL-6R $\alpha$



# LE SYSTEME IL-15

L'IL-15 est une cytokine pléiotrope de la famille des cytokines à 4 hélices  $\alpha$  comptant également comme membres entre autres l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-21. L'IL-15 a été découverte en 1994 simultanément par deux équipes (Burton *et al.* 1994 ; Grabstein *et al.* 1994). Elle a été identifiée sur la capacité des surnageants de culture des lignées CV-1 / EBNA (lignée épithéliale de rein de singe) et Hut-102 (Lymphome T humain associé au virus HTLV-1 (« Human T Cell Leukemia Virus »)), à induire la prolifération de la lignée T cytotoxique murine IL-2 dépendante, CTLL-2 (Bamford *et al.* 1994). Cette cytokine possède de nombreuses activités biologiques communes avec l'IL-2, principal facteur de croissance des lymphocytes T activés. Cette redondance fonctionnelle entre ces deux cytokines s'explique, entre autre, par le fait qu'elles partagent des chaînes réceptrices communes, IL-2/15R $\beta$  et  $\gamma_c$  (Giri *et al.* 1994). L'IL-15 possède, néanmoins, des propriétés qui lui sont propres, médiées, notamment, par une chaîne IL-15R $\alpha$  spécifique.

## I. L'Interleukine-15

### A. Caractéristiques de l'IL-15 humaine

#### 1. Le gène et les messagers de l'IL-15

L'IL-15 est très conservé à travers les espèces, l'IL-15 humaine possède 97% d'identité avec l'IL-15 de singe (*Cercopithecus aethiops saebeus*) , 82% avec l'IL-15 porcine ou 73% avec l'IL-15 de lapin (Grabstein *et al.* 1994 ; Anderson *et al.* 1995 ; Canals *et al.* 1997). L'IL-15 est codée par un gène d'environ 34 kb localisé sur le chromosome 4 en position q13 chez l'homme, et dans la région centrale du chromosome 8 murin. Contrairement à l'IL-2 qui est composé de 4 exons et 3 introns (Seigel *et al.* 1984), le gène de l'IL-15 humaine est composé de 9 exons, dont 7 sont codants, et 8 introns (Anderson *et al.* 1995 ; Krause *et al.* 1996). Il a été mis en évidence l'existence d'un exon alternatif, chez l'homme et la souris, présenté comme étant une séquence additionnelle localisée entre les exons 4 et 5 et codant pour un peptide signal, nommé exon 4A (Meazza

*et al.* 1996 ; Onu *et al.* 1997 ; Tagaya *et al.* 1997). Selon l'utilisation ou non de l'exon 4A, deux isoformes d'ARNm sont produites (**Figure 11**).

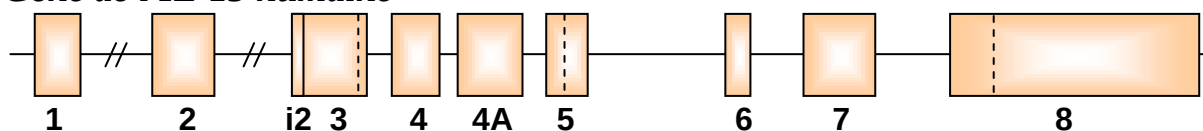
L'ARNm originel de l'IL-15 humaine comprend une région 5' non traduite (5' UTR) d'au moins 316 nucléotides (nt), une séquence codante (ORF) de 486 nt, et une région 3' non traduite (3' UTR) d'au moins 400 pb, codant pour un précurseur de l'IL-15. Ce précurseur est constitué d'un peptide signal de 48 aa et d'une protéine mature de 114 aa. Le peptide signal est codé par les exons 3, 4 et le début de l'exon 5. La fin de l'exon 5 et les exons 6, 7 et 8 codent la protéine mature (Grabstein *et al.* 1994 ; Anderson *et al.* 1995).

L'ARNm alternatif humain de l'IL-15 présente un exon additionnel de 119 nucléotides (nt) inséré entre les exons 3 et 4, mais étant dépourvu des exons 1 et 2. L'introduction de cet exon alternatif engendre l'interruption de la séquence codant pour 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 de l'IL-15 présentant un peptide signal plus court, de 21 aa, par rapport au peptide signal de 48 aa, dit long. Les deux isoformes de l'IL-15 sont appelées IL-15-LSP (« Long Peptide Signal ») et IL-15-SSP (« Short Peptide Signal ») et donnent une protéine mature identique (Anderson *et al.* 1995 ; Krause *et al.* 1996) (**Figure 11**).

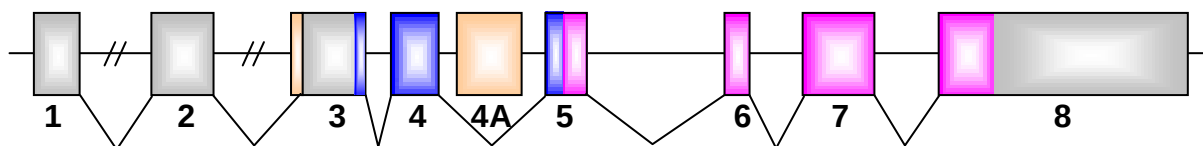
Ces deux isoformes de l'IL-15 possèdent deux profils différents en termes de localisation intracellulaire, de distribution, de trafic et de localisation endosomale. L'IL-15 présentant le peptide signal court n'est pas sécrétée mais plutôt séquestrée dans le cytoplasme (Kurys *et al.* 2000 ; Gaggero *et al.* 1999). L'IL-15 avec le peptide signal long est quant à elle trouvée dans la voie de sécrétion c'est à dire dans le golgi, les endosomes et le réticulum endoplasmique (Pereno *et al.* 2000). Néanmoins, ces deux isoformes peuvent également être localisées dans le noyau (Nishimura *et al.* 2005).

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

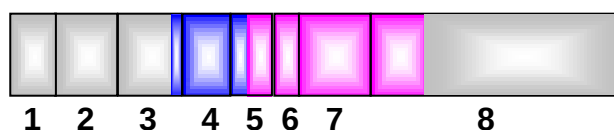
## Gène de l'IL-15 humaine



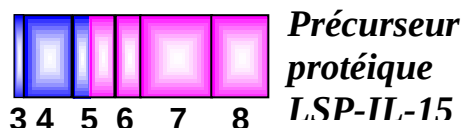
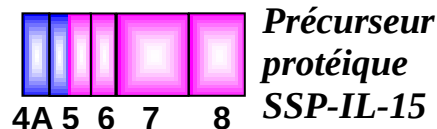
## ADN



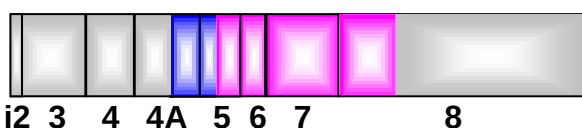
Transcription

ARNm LSP-IL-15  
(Anderson et al. 1995)

Traduction

Précurseur  
protéique  
LSP-IL-15Précurseur  
protéique  
SSP-IL-15

Traduction

ARNm SSP-IL-15  
(Meazza et al. 1996)

Transcription

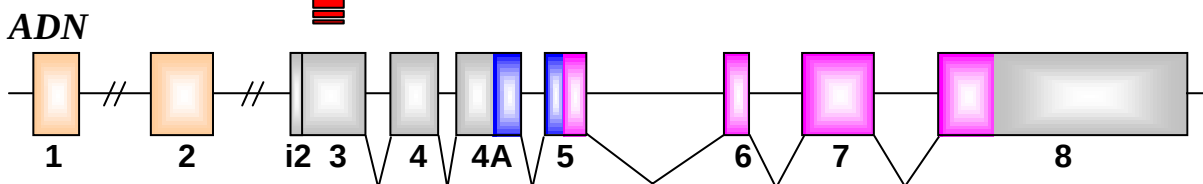
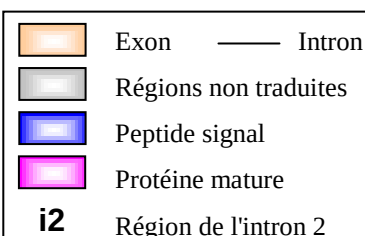
Protéine  
IL-15  
mature

Figure 11 : Gène, Transcription, Traduction et Maturation Protéique de l'IL-15 Humaine

## 2. La protéine IL-15

### a) Forme soluble

L'IL-15 mature est une glycoprotéine de 14-15 kDa composée de 114 aa codées par les exons 5 à 8 du gène de l'IL-15. L'IL-15 comporte deux ponts di-sulfure en position C42-C88 (similaire à celui de l'IL-2 situé en C58-C105) et C35-C85, et présente trois sites potentiels de N-glycosylation en C terminal de la protéine, en N71, N79 et N112 (Grabstein *et al.* 1994). Les prédictions sur la structure secondaire de l'IL-15 mature indiquent qu'elle appartient, comme l'IL-2, à la famille des cytokines composées de quatre hélices  $\alpha$  courtes amphipatiques. Pour l'IL-15, les hélices  $\alpha$  sont localisées entre les acides aminés N1 et L15, T38 et A57, N65 et G78, et K97 et S114, en configuration « up-up-down-down » (Pettit *et al.* 1997) (**Figure 12A**).

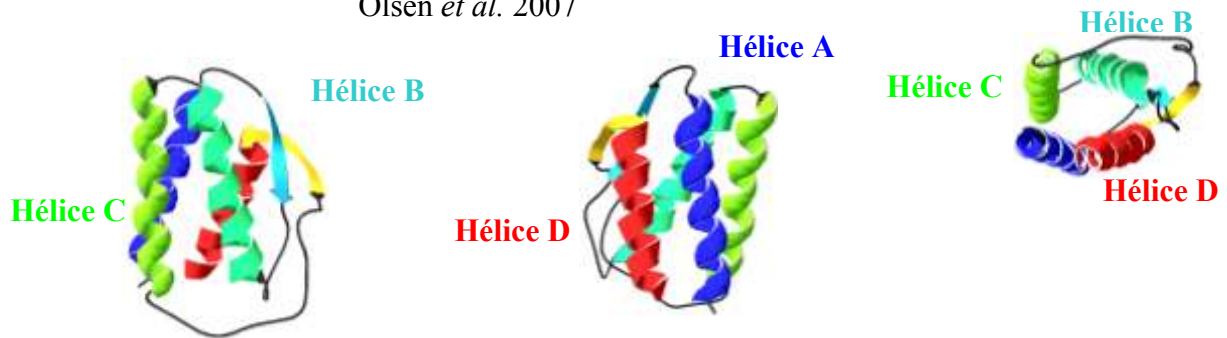
Bien que l'IL-2 et l'IL-15 présentent une faible identité de séquence primaire, les acides aminés de l'IL-2 essentiels à la liaison des chaînes réceptrices  $\beta$  et  $\gamma_c$ , sont conservés dans la structure de l'IL-15. Ainsi, le D8 de l'IL-15, similaire au D20 de l'IL-2, est indispensable à l'interaction avec IL-2R $\beta$  (Zurawski *et al.* 1993 ; Pettit *et al.* 1997). De même, le Q108 de l'IL-15, analogue du Q126 de l'IL-2, est essentiel à la liaison à la chaîne  $\gamma_c$  (Zurawski *et al.* 1993). Le complexe formé entre l'IL-15 et sa chaîne  $\alpha$  résolu par cristallographie (Chirifu *et al.* 2007) ou par RMN (Hanick *et al.* 2007) montre trois zones d'interactions (Top, Middle et bottom). Une première zone (Top) est située dans la boucle AB de l'IL-15 similaire à la boucle BC de l'IL-2 mais plus courte. Cette zone implique les résidus Glu53, Asp22 de l'IL-15 non conservés dans l'IL-2. La deuxième zone (middle) concerne les résidus de l'hélice B comme l'acide aminé Glu46 et Tyr26. Enfin, la troisième zone d'interaction (Bottom) met en cause la boucle CD flexible et beaucoup plus longue que dans l'IL-2 et implique les résidus glutamate de cette zone aux positions 87, 89 et 90 (**Figure 12B**).

## A

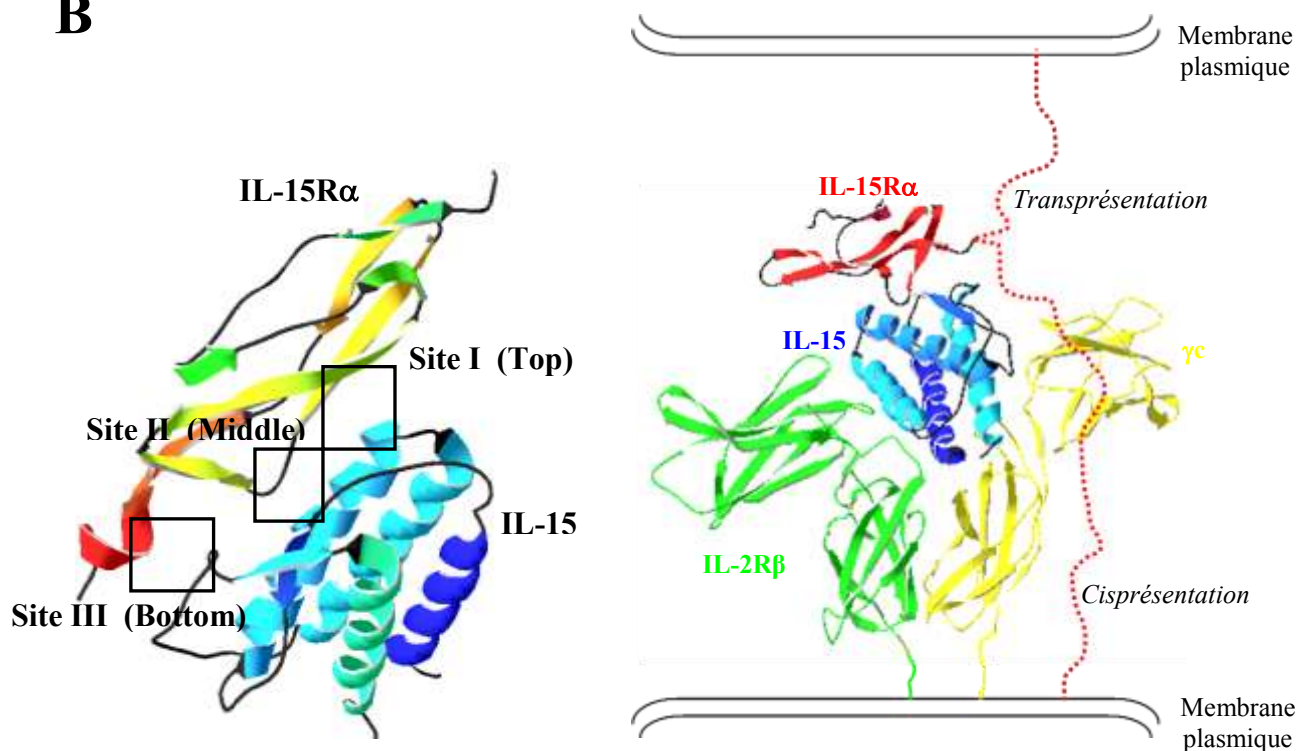
## Peptide signal

*h-IL-15* MRISKPHLRSSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILG  
Hélice A  
CFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCK  
Hélice B Hélice C  
VTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSNGNVTESG  
Hélice D  
CKECEELBEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

**hIL-15 [2psm]**  
Olsen *et al.* 2007



# B



**Figure 12 : Caractéristiques de l'IL-15 humaine**

**A.** Séquence et structure protéique en hélice  $\alpha$  de l'IL-15 humaine. Hélice A (en bleu), hélice B (en cyan), hélice C (en vert) et hélice D (en rouge).

**B. Structure du complexe IL-15/IL-15R $\alpha$  et modèle du complexe IL-15 (bleu) /IL-15R $\alpha$  (rouge) /IL-2R $\beta$  (vert) / $\gamma$ c (jaune) (Chirifu *et al.* 2007).**

## **b) Forme membranaire**

Une forme membranaire de l'IL-15 a été mise en évidence à la surface de monocytes humains primaires, de lignées humaines monocytaires et de myofibroblastes dérivés de la rate (Musso *et al.* 1999 ; Briard *et al.* 2002). L'expression de l'IL-15 membranaire constitutive est accrue lors de l'activation par de l'IFN $\gamma$  ou du LPS grâce à la mobilisation à la surface d'un stock intracellulaire d'IL-15. Cette IL-15 membranaire est biologiquement active et assure la prolifération des lymphocytes T (Neely *et al.* 2001). De plus, cette IL-15 « cross-linkée » à un anticorps anti-IL-15 ou stimulée par une forme soluble de l'IL-15R $\alpha$  induit les monocytes, par un processus de rétro-signal, à adhérer à leur support et à produire de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  (Budagian *et al.* 2004 ; Neely *et al.* 2004). L'IL-15 membranaire est également exprimée indépendamment de l'IL-15R $\alpha$  dans les carcinomes rénaux et possède une action antiapoptotique sur les cellules NK en l'absence d'IL-2. Cet effet est annulé par l'ajout de sIL-15R $\alpha$  qui lie l'IL-15 membranaire (Wittnebel *et al.* 2007). Le mécanisme de mobilisation à la membrane reste encore inconnu. Les cellules primaires de cancer rénaux semblent aussi exprimé une forme membranaire d'IL-15 formant spontanément un homodimère et clivé par ADAM10 et ADAM17 (Khawam *et al.* 2009).

## **B. Expression de l'IL-15**

### **1. Site d'expression**

L'ARN messager de l'IL-15 est détecté dans de nombreux tissus et types cellulaires après activation : le placenta, le muscle squelettique, le rein, le foie, le poumon, le cœur (Grabstein *et al.* 1994).

À l'échelle cellulaire, les monocytes/macrophages sous activation ont été les premières cellules reconnues comme source d'IL-15 (Grabstein *et al.* 1994). D'autres cellules impliquées dans la présentation de l'antigène (CPA), comme les cellules dendritiques, produisent l'ARNm et la protéine IL-15, suggérant un rôle dans l'attraction et la stimulation des cellules T. L'IL-15 est également produite par les lignées de cellules stromales, par les cellules humaines primaires stromales de la moelle osseuse, par les épithéliums thymique et intestinal fœtal. Les cellules épithéliales et fibroblastiques issues

des lignées épithéliales hépatiques ou des cellules épidermiques ainsi que les kératinocytes ou les cellules fœtales de la peau et les cellules épithéliales intestinales, expriment l'IL-15 au niveau ARNm et/ou protéique.

L'expression ubiquitaire des ARNm contraste avec la détection de la protéine qui est très rarement dosée dans des conditions physiologiques. Dans le cas de l'IL-15, cette présence ubiquitaire d'ARNm et l'absence de la protéine suggèrent que la production d'IL-15 est fortement régulée au niveau post-transcriptionnel.

## 2. Régulation de l'expression de l'IL-15

La transcription, la traduction et la sécrétion de l'IL-15 sont régulées par de multiples mécanismes complexes et aboutissent à terme à une faible sécrétion de la cytokine.

### a) Au niveau transcriptionnel

Les monocytes présentent un taux plus élevé d'ARNm suite à une stimulation par le LPS ou l'IFN $\gamma$  (Grabstein *et al.* 1994 ; Bamford *et al.* 1996), aussi suite à une infection virale ou microbienne (Doherty *et al.* 1996 ; Flamand *et al.* 1996). Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien fœtal activées par l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  augmentent leur taux d'expression de transcrits de l'IL-15 (Kumaki *et al.* 1996). Le LPS et les IFN $\alpha\beta$  induisent une augmentation des messagers IL-15 dans les cellules dendritiques (Mattei *et al.* 2001). Les rayonnements UV favorisent, également l'expression des ARNm de l'IL-15 par les kératinocytes (Mohamadzadeh *et al.* 1995).

Des études sur la recherche de séquences consensus au niveau de la région 5' régulatrice en amont de l'exon 1, ont révélé l'existence de sites de fixation de facteurs de transcription dans la région promotrice :  $\alpha$ -INF-2, NF-IL-6,  $\gamma$ -IRE, myb, GCF, IRF-1, et NF- $\kappa$ B (Azimi *et al.* 1998 ; Washizu *et al.* 1998). Le site NF- $\kappa$ B est localisé en -75 et -65 par rapport au site d'initiation de la transcription du promoteur du gène humain de l'IL-15. Il a été décrit comme étant important pour la régulation positive de l'expression de l'ARNm de l'IL-15 induite par la protéine Tax du virus HTLV-1 (Azimi *et al.* 1998) et induite par le LPS des macrophages murins (Washizu *et al.* 1998). Un motif IRF-E (« Interferon Regulatory Factor response Element ») est localisé dans la région -295 à -243

par rapport au site d'initiation de la transcription du gène de l'IL-15 murine. Il fixe les protéines IRF-1 et IRF-2. IRF-1 joue un rôle essentiel 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 les IELs (Ogasawara *et al.* 1998 ; Ohteki *et al.* 1998). La région -201 à -141 du promoteur du gène de l'IL-15 comporte des sites non identifiés de régulation négative de l'expression de l'IL-15 (Azimi *et al.* 1998). La délétion en 5' de cette région résulte en une forte augmentation de l'activité du promoteur du gène de l'IL-15.

Un autre type de régulation négative de la transcription du gène de l'IL-15 a été récemment mis en évidence chez la souris. Une IL-15 non sécrétée issue d'un épissage alternatif inhibe la production d'IL-15 induite par le LPS au niveau transcriptionnel. La co-expression de l'IL-15R $\alpha$  est indispensable à cette inhibition. Cette IL-15 intracellulaire formerait un complexe avec l'IL-15R $\alpha$  et serait transloquée dans le noyau. Le complexe inhiberait la transcription du gène de l'IL-15 en empêchant les facteurs de transcription de se fixer sur le promoteur IL-15 (Nishimura *et al.* 2005).

## **b) Au niveau traductionnel**

La forte expression de l'ARNm de l'IL-15 et la faible détection de la protéine nous a mené à étudier les mécanismes régulant la traduction des messagers de l'IL-15. La présence de multiples codons start AUG au niveau de la séquence 5' non traduite et le comportement différent des isoformes LSP et SSP ont été identifiés comme des points de contrôle en tant que régulateur de la traduction des ARNm de l'IL-15 en précurseur de la protéine IL-15.

La région 5' non traduite de l'ARNm de l'isoforme LSP de l'IL-15 est relativement longue. Elle contient 12 codons potentiels d'initiation de la traduction en amont du codon d'initiation de la traduction (Grabstein *et al.* 1994 ; Bamford *et al.* 1996). La présence de ces codons AUG a tendance à réduire fortement l'efficacité de la traduction (Kozak *et al.* 1992). La production de la protéine de fusion HTLV-1 / IL-15 par la lignée HuT-102 provient de l'augmentation de l'efficacité de transcription induite par la protéine virale Tax, mais également d'une traduction accrue (Bamford *et al.* 1996). L'ARNm de fusion est constitué d'une séquence virale de 118 nt qui s'intègre dans la région 5' non traduite du gène de l'IL-15. Cette insertion provoque la délétion de 8 des 10 codons AUG surnuméraires, ce qui permet l'augmentation de la traduction protéique.



Les peptides signaux des deux isoformes de l'IL-15, LSP-IL-15 et SSP-IL-15, contribueraient à l'inefficacité de la traduction. Le peptide signal long possède un codon AUG localisé dans une région présentant peu d'identité avec la séquence consensus Kozak (Onu *et al.* 1997 ; Tagaya *et al.* 1997). La LSP-IL-15 est ainsi moins bien traduite que la forme 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 d'IL-15

La combinaison des deux modifications de l'ARNm de l'IL-15 entraîne une synthèse d'IL-15 accrue de 250 fois par rapport à la construction sauvage avec une région 5' non traduite intacte.

### **c) Au niveau post-traductionnel**

La suppression des régulations traductionnelles des ARNm de l'IL-15 entraîne une augmentation de la production de la cytokine. Néanmoins, la traduction et la sécrétion de l'IL-15 restent faibles par rapport aux autres cytokines (Bamford *et al.* 1998). La production d'IL-15 subit une régulation également au stade post-traductionnel.

Les peptides signaux de l'IL-15 contribuent à l'inefficacité de la sécrétion de la cytokine. La substitution des séquences codantes des peptides signaux de l'IL-15 par ceux de l'IL-2, du CD33, ou de la chaîne IgV $\kappa$  augmente non seulement la traduction mais également la sécrétion de l'IL-15 (Meazza *et al.* 1997 ; Onu *et al.* 1997 ; Bamford *et al.* 1998). 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 (Meazza *et al.* 1997 ; Onu *et al.* 1997 ; Tagaya *et al.* 1997 ; Gaggero *et al.* 1999). L'IL-15 issue de l'ARNm SSP-IL-15 est détectée uniquement au niveau du cytoplasme et du noyau mais n'est pas sécrétée. Cette forme d'IL-15 régule négativement la production de la cytokine et tend à diminuer les défenses immunitaires *in vivo*. Elle a été détectée dans le cœur, le thymus, l'appendice, les testicules et les lymphoblastes humains (Nishimura *et al.* 2000). L'ARNm LSP-IL-15 est plus faiblement traduit. Le précurseur protéique est dirigé vers la voie sécrétoire en passant par 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). Le trafic intracellulaire du transcrit LSP-IL-15 est complexe, et la sécrétion de la cytokine reste faible. En effet, les précurseurs protéiques LSP-IL-15 peuvent être dirigés dans trois voies de routage différents (Kurys *et al.* 2000). Une partie des LSP-IL-15 n'est pas glycosylée, reste dans le cytoplasme et est dégradée par les protéasomes. Une autre partie est N-glycosylée mais le peptide signal subirait un clivage partiel. Elles pourraient, ainsi, être stockées ou bien dégradées avant d'être sécrétées. Une troisième partie des précurseurs protéiques suivrait la voie classique de sécrétion. Ces précurseurs seraient N-glycosylés et subiraient un clivage complet du peptide signal et enfin seraient sécrétés. Enfin, le récepteur soluble de l'IL-15 pourrait jouer un rôle dans la voie de sécrétion de l'IL-15 ainsi que sa stabilité intracellulaire (Mortier *et al.* 2008).

La partie carboxy-terminale de l'IL-15 mature régulerait négativement la sécrétion de la cytokine, en agissant comme un signal de rétention. En effet l'ajout d'une séquence protéique en COOH de l'IL-15, comme le marqueur fluorescent GFP (Gaggero *et al.* 1999) ou un marqueur antigénique « flag » (Bamford *et al.* 1998) augmente la sécrétion d'IL-15.

Le niveau élevé de régulation de l'expression de l'IL-15 participe à la difficulté de détection de l'IL-15 dans les surnageants de culture et liquides biologiques.

## II. Les Récepteurs humains de l'IL-15

L'IL-15 manifeste une importante pléiotropie et une forte redondance contrôlant un large champ de fonctions dans diverses cellules. La redondance est expliquée en partie par le partage de chaînes réceptrices parmi les membres de sa famille de cytokines (**Figure 3B et C**). Chaque cytokine possède sa propre chaîne réceptrice, mais partage une, voire plusieurs chaînes communes avec d'autres cytokines. Les similitudes fonctionnelles entre l'IL-2 et l'IL-15 sont en partie expliquées par un partage des chaînes  $\beta$  et  $\gamma_c$  (Bamford *et al.* 1994 ; Giri *et al.* 1994 ; Grabstein *et al.* 1994). L'association de ces deux chaînes constitue un récepteur fonctionnel d'affinité intermédiaire pour l'IL-2 ( $K_d = 1\text{nM}$ ) et pour l'IL-15 ( $K_d = 1\text{nM}$ ) (Wang *et al.* 2005 ; De Jong *et al.* 1996). En revanche, l'IL-15 est capable de se lier avec une forte affinité sur des cellules d'une lignée lymphocytaire B, n'exprimant pas la chaîne  $\gamma_c$ . Nonobstant le fait que l'IL-2 et l'IL-15 partagent des chaînes réceptrices communes, ces deux cytokines présentent des activités biologiques différentes (Bulfone-Paus *et al.* 1997). Fort de ces observations, l'existence d'une sous-unité réceptrice spécifique à l'IL-15, lui conférant une fonction propre, a été suspectée. Ainsi, des travaux ont permis d'identifier la chaîne IL-15R $\alpha$ , spécifique et capable de lier l'IL-15 avec une forte affinité (Anderson *et al.* 1995 ; Giri *et al.* 1995).

### A. La chaîne $\gamma_c$ réceptrice (CD132)

La chaîne  $\gamma_c$  est partagée par de nombreux récepteurs de cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) (**Figure 13A**). C'est une glycoprotéine membranaire de type I de 64 kDa. Elle est codée par un gène situé sur le chromosome X en position q13.1 (Takeshita *et al.* 1992), constitué de 8 exons et 7 introns (Noguchi *et al.* 1993). C'est une molécule qui totalise 369 aa, la protéine mature comporte 347 aa et le peptide signal 22 aa. La partie extracellulaire de la chaîne est composée de 240 aa et présente un module CRH. Dans ce domaine, on retrouve 6 sites de glycosylation (Wang *et al.* 2005). Le domaine transmembranaire de la molécule comporte 21 aa. Aucune séquence consensus permettant d'exprimer une activité tyrosine kinase n'a été identifiée dans la partie intracytoplasmique de 86 aa. Cependant, une séquence de type SH2 a été identifiée. Elle permet à la chaîne  $\gamma_c$  de se lier, par l'intermédiaire de phosphotyrosines, à des protéines de signalisation et ainsi

d'induire la transduction du signal. La chaîne  $\gamma_c$  seule est inapte à transmettre le signal, il est nécessaire qu'elle soit associée à une autre chaîne, la chaîne  $\beta$  : la cotransfection des chaînes  $\beta$  et  $\gamma_c$  dans des cellules COS est indispensable pour la fixation de l'IL-15. La chaîne  $\gamma_c$  est d'autant plus importante qu'elle est partagée par de nombreux récepteurs de cytokines et qu'un défaut d'expression provoque une immunodéficience combinée sévère ou X-SCID (« human X-linked Severe Combined ImmunoDeficiency ») (Noguchi *et al.* 1993).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> présentent un pool important de chaînes  $\gamma_c$  intracellulaires mais sa translocation à la membrane plasmique ne se fait qu'après l'activation cellulaire et l'induction des gènes IL-2R $\alpha$  et IL-2R $\beta$  (Bani *et al.* 1997). Il a également été identifié une isoforme de la chaîne  $\gamma_c$  p64, la p74. L'isoforme p74 de la chaîne  $\gamma_c$  semble remplacer la p64 dans la lignée TF-1 $\beta$ 2 (TF-1 transfectées pour exprimer IL-2R $\beta$  et cultivées en IL-2) (Monson *et al.* 2001). Deux transcrits de la chaîne  $\gamma_c$  ont été caractérisés par la présence ( $\gamma_c$ -long) ou l'absence du site SH2 ( $\gamma_c$ -short) en C terminal de la protéine (Shi *et al.* 1997), dans les lymphocytes périphériques humains. Ces deux formes suggèrent une activation différentielle de voies de signalisation et pourrait jouer un rôle important dans la réponse cellulaire aux différentes cytokines  $\gamma_c$  dépendantes. Une forme soluble de la chaîne  $\gamma_c$  murine, qui résulte d'un clivage protéolytique de la forme membranaire, a été découverte dans les surnageants de culture de cellules T, B, NK et macrophages après activation (Meissner *et al.* 2001). La  $\gamma_c$  soluble possède comme propriété physiologique d'inhiber la prolifération des cellules dépendantes de cytokines  $\gamma_c$  dépendantes. Elle jouerait donc un rôle de régulation négative des cytokines exprimant la  $\gamma_c$  membranaire en entrant en compétition avec cette dernière.

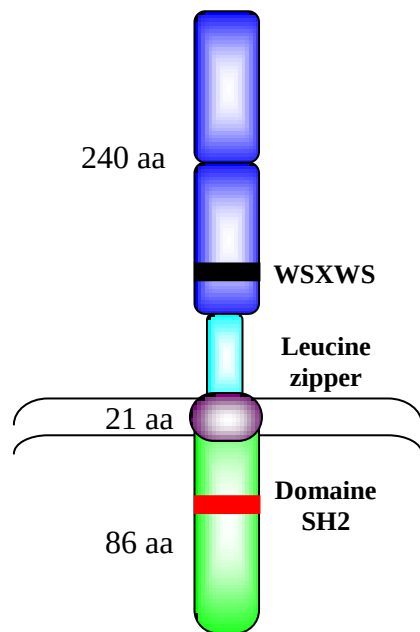
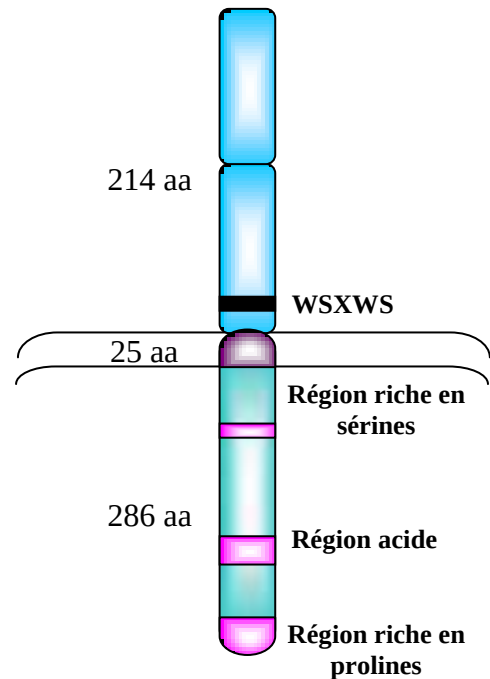
La chaîne  $\gamma_c$  peut également entrer dans la composition d'un récepteur fonctionnel pour le GM-CSF (Giron-Michel *et al.* 2003). En effet, le GM-CSF inhibe la liaison de l'IL-2 sur le récepteur fonctionnel de l'IL-2 (Kanakura *et al.* 1993), dans la lignée promégacaryocytaire MO7e. De plus, un récepteur hybride, constitué de la chaîne  $\beta_c$  du GM-CSF et de la chaîne  $\gamma_c$ , a été mis en évidence dans les précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> humains et les TF-1 $\beta$  (TF-1 transfectées pour exprimer IL-2R $\beta$  et cultivées en GM-CSF). La phosphorylation de STAT5, induite par le GM-CSF, est partiellement inhibée par l'utilisation simultanée d'anticorps anti- $\gamma_c$  et anti-IL-2R $\beta$ . De plus, la localisation dans le noyau de STAT5 induite par le GM-CSF est fortement inhibée par le mélange des deux

anticorps. Dans ces conditions,  $\gamma_c$  contribuerait principalement à la translocation de STAT5. Le partage de la chaîne transductrice  $\gamma_c$  par l'IL-15 et le GM-CSF participerait au développement hématopoïétique vers la voie myéloïde en bloquant l'engagement vers la voie lymphoïde (Giron-Michel *et al.* 2003).

## **B. La chaîne IL-2/15R $\beta$ (CD122)**

La chaîne réceptrice  $\beta$  est une glycoprotéine de 70-75 kDa (Tsudo *et al.* 1986 ; Dukovich *et al.* 1987). Son gène est localisé sur le chromosome 22 humain en position q11-12 et est organisé en 10 exons et 9 introns. Le précurseur protéique de 551 aa présente un peptide signal de 26 aa. La protéine mature de 525 aa est constituée, principalement, par un domaine CRH et présente 4 sites de N-glycosylation. Le domaine transmembranaire est composé de 25 aa. Le domaine intracellulaire de 286 aa est formé par une longue chaîne polypeptidique. Il est caractérisé par la présence de trois régions particulières riches en sérines, en acides aminés acides et en prolines, indispensables à la transduction du signal. La partie intracellulaire de la chaîne  $\beta$  est dépourvue de séquence consensus caractéristique des tyrosines kinase et contient 6 tyrosines (**Figure 13B**).

L'existence d'une forme soluble de la chaîne IL-2R $\beta$  (p75) produite de manière endogène, 20 à 25 kDa plus petite que la forme totale, a également été mise en évidence (Honda *et al.* 1990). La génération du sIL-2R $\beta$  est dépendante de l'activation cellulaire et est médiée par clivage protéolytique de la forme membranaire.

**A : IL-2R $\gamma$** **B : IL-2/15R $\beta$** **Figure 13 : Récepteurs Fonctionnels de l'IL-15**

**A.** Chaîne réceptrice de l'IL-15 : IL-2R $\gamma$  avec le module CRH (bleu) et son motif caractéristique (noir), un domaine leucine zipper (cyan) et le domaine SH2 (rouge) dans le domaine intracellulaire (vert).

**B.** Chaîne réceptrice de l'IL-15 : IL-2/15R $\beta$  avec le module CRH (bleu) et son motif (noir) et les 3 régions intracellulaires essentielles à la transduction du signal (rose) riche en sérine, acide ou proline.

**C. La chaîne privée du récepteur de l'IL-15**

L'IL-15 se fixe, avec une forte affinité, sur une lignée lymphocytaire B n'exprimant pas la chaîne  $\gamma_c$ , sans engendrer d'internalisation permettant d'identifier la chaîne IL-15R $\alpha$  (Giri *et al.* 1994 ; Kumaki *et al.* 1995).

**1. Identification et clonage de la chaîne IL-15R $\alpha$** 

La chaîne IL-15R $\alpha$  a d'abord été clonée chez la souris (Giri *et al.* 1995), en étudiant la fixation de l'IL-15 radiomarkée sur des cellules COS-7 transfectées par une

banque d'ADN complémentaires (ADNc) issue du clone T murin D10, choisi pour sa réponse à l'IL-15. L'ADNc murin isolé a ensuite servi de sonde afin de cloner la chaîne IL-15R $\alpha$  humaine (Anderson *et al.* 1995). Deux banques d'ADNc de deux lignées humaines présentant un nombre important de sites de fixation de forte affinité pour l'IL-15 : les lignées WI-26VA4 (lignée épithéliale pulmonaire transformée par le virus SV40) et A172 (glioblastome) ont, ainsi, été criblées et ont permis d'identifier la chaîne IL-15R $\alpha$  humaine.

## 2. Caractéristiques génétiques de l'IL-15R $\alpha$

Le gène de l'IL-15R $\alpha$  est situé sur le chromosome 10 humain en position q14-15 (Anderson *et al.* 1995) (chromosome 2 chez la souris). Le gène est organisé en 7 exons et 6 introns. Les localisations chromosomiques des gènes humains de l'IL-15R $\alpha$  et IL-2R $\alpha$  sont proches et suggèrent une origine commune. Différents messagers de l'IL-15R $\alpha$  ont été mis en évidence, issus d'épissages alternatifs du gène. Un épissage alternatif au niveau de l'exon 7 du gène entraîne l'insertion d'une région génique en amont de l'exon 7 des ARNm. La forme longue de l'exon 7 obtenue est appelée exon 7'. Les différents transcrits sont issus de la combinaison de différents sauts ( $\Delta$ ) d'exons ainsi que de l'expression différentielle de l'exon 7 ou 7'. Lors du clonage de la chaîne humaine, trois isoformes de messagers ont été découverts : IL-15R $\alpha$ (7), IL-15R $\alpha$ (7'), IL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3(7) (Anderson *et al.* 1995). Depuis, différentes isoformes supplémentaires ont été détectées dans divers tissus et lignées cellulaires : 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') (Dubois *et al.* 1999). Les dernières isoformes ont été mises en évidence dans des mastocytes murins : IL-15R $\alpha$  $\Delta$ 4(7), IL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3/4(7) et IL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3/4/5(7) (Bulanova *et al.* 2003). Les exons 2 à 5 codent le domaine extracellulaire, le 6 pour la partie transmembranaire, et les exons 7 ou 7' pour la partie intracytoplasmique. Ces différentes isoformes de messagers codent des chaînes IL-15R $\alpha$  différentes dont les fonctions restent inconnues (**Figure 14**). Certains de ces isoformes ont également été mis en évidence sous forme protéique (Giron-Michel *et al.* 2009).

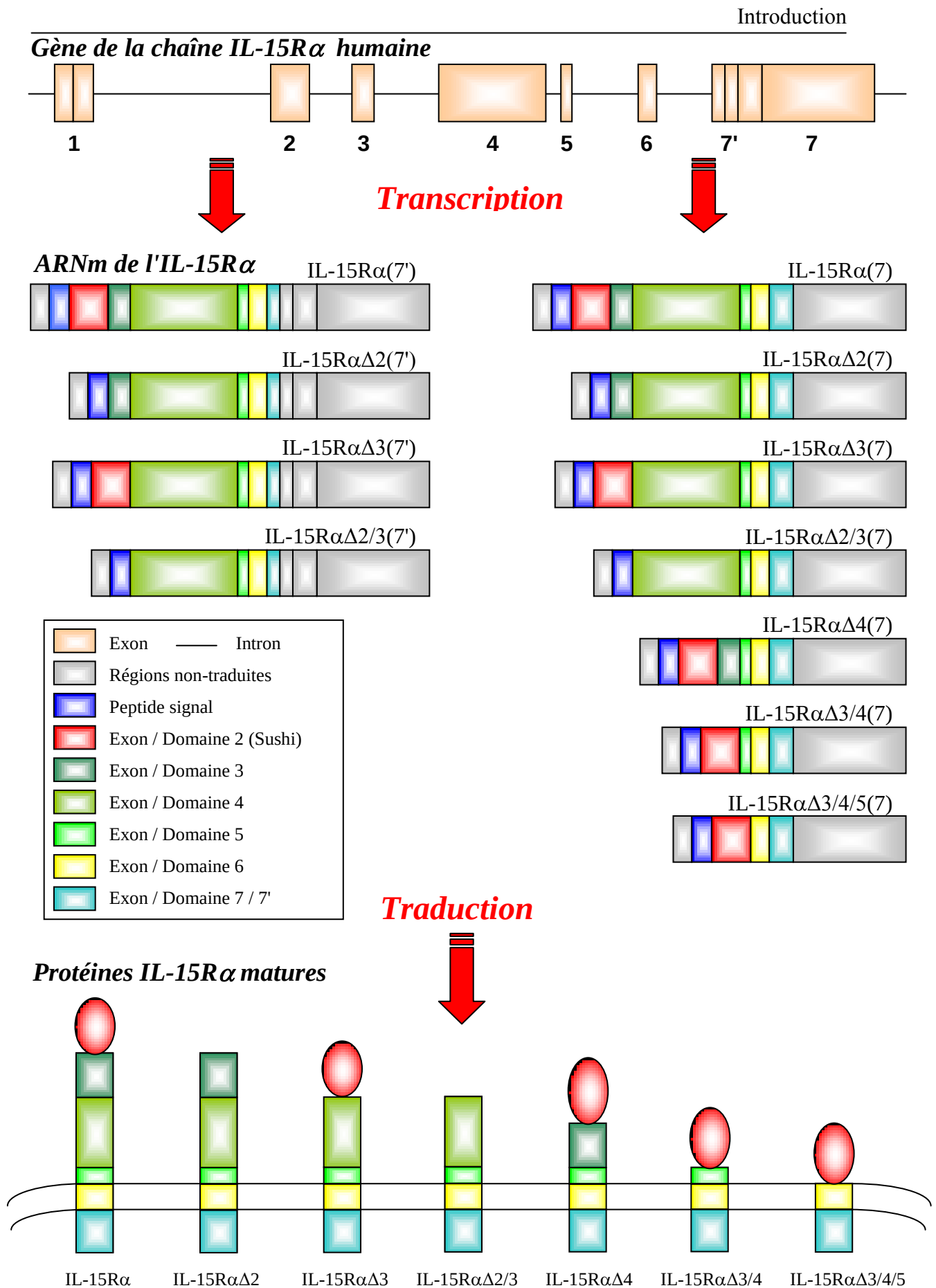
### 3. Caractéristiques protéiques de l'IL-15R $\alpha$

#### a) Forme membranaire

Le précurseur protéique de la forme totale de l'IL-15R $\alpha$ , codé par les exons de 1 à 7, est constitué de 267 aa et le peptide signal comprend 32 aa. C'est une protéine membranaire de 55- 60 kDa.

Le domaine extracellulaire de 173 aa possède un motif caractéristique commun avec le récepteur de l'IL-2 appelé domaine Sushi ou Src (« Short consensus repeat ») ou GP-1 (glycoprotéine-1) (Giri *et al.* 1995). Le domaine Sushi a initialement été mis en évidence au niveau de protéines du complément (C1s, C1r, facteurs B et H) ou de facteurs de coagulation (facteur XIII et C4BP) et est impliqué dans les liaisons de protéines (Davie *et al.* 1986 ; Perkins *et al.* 1988). Dans l'IL-15R $\alpha$ , c'est un domaine codé par l'exon 2, situé en N-terminal de la partie extracellulaire (aa 1 à 64). Sa structure globulaire est formée par deux ponts disulfures intracaténaux imbriqués C3-C45 / C29-C63 qui n'est pas glycosylé. La forme soluble du domaine sushi est capable de fixer l'IL-15 (Wei *et al.* 2001), contrairement aux isoformes de l'IL-15R $\alpha$  dépourvues de ce domaine sushi (Dubois *et al.* 1999). L'IL-15R $\alpha$  possède un seul domaine sushi alors que l'IL-2R $\alpha$  en présente deux. La partie extracellulaire de la chaîne présente un seul site de N-glycosylation (Anderson *et al.* 1995). Mais la différence de masse moléculaire entre celle estimée par pontage covalent de l'IL-15 radiomarquée (55-60 kDa) et la masse théorique (35 kDa) laisse présager l'existence de sites de O-glycosylation sur une vingtaine de résidus sérines et thréonines (Giri *et al.* 1995). Dans le cas de la chaîne IL-15R $\alpha$  humaine, les N-glycosylations augmentent de 3 kDa la masse moléculaire, et les O-glycosylations de 20 kDa (Dubois *et al.* 1999). Pour la chaîne IL-15R $\alpha$  murine, les O-glycosylations seraient toutes localisées dans le domaine 4 (Bulanova *et al.* 2003). Le domaine transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  est constitué de 21 aa. La partie intracellulaire comporte, soit 41 aa si la région est codée par l'exon 7, soit 26 aa si l'exon 7' est impliqué. Ce domaine semble être impliqué dans la transduction du signal de prolifération cellulaire induite par l'IL-15 (Anderson *et al.* 1995) (**Figure 15**). L'interaction entre la chaîne  $\alpha$  de l'IL-15 et l'IL-15 implique une large zone d'interactions ioniques (Lorenzen *et al.* 2006) expliquant la très forte affinité du complexe IL-15/IL-15R $\alpha$  essentielle pour les effets biologiques de cette cytokine (**Figure 12**).

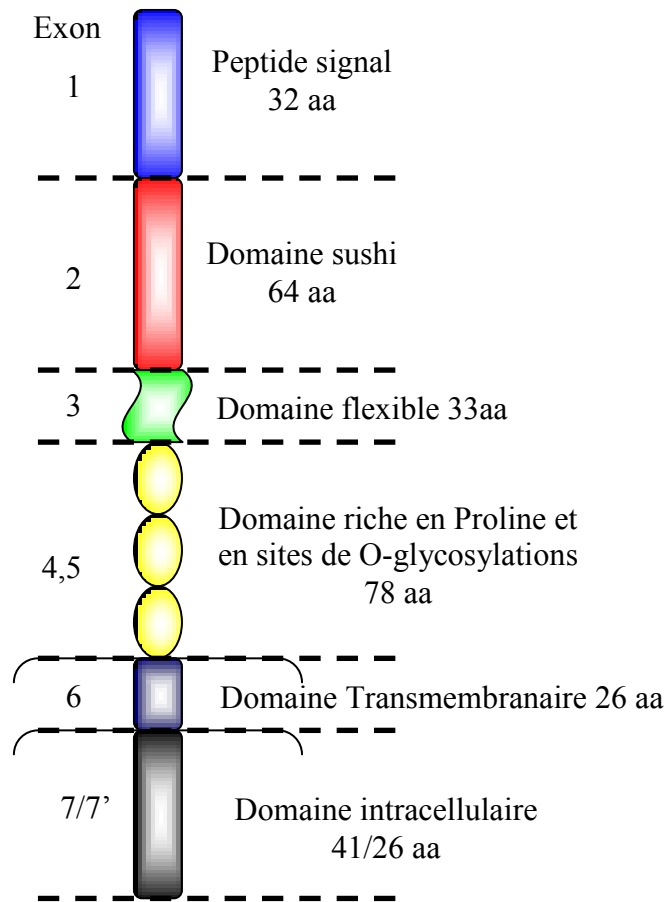
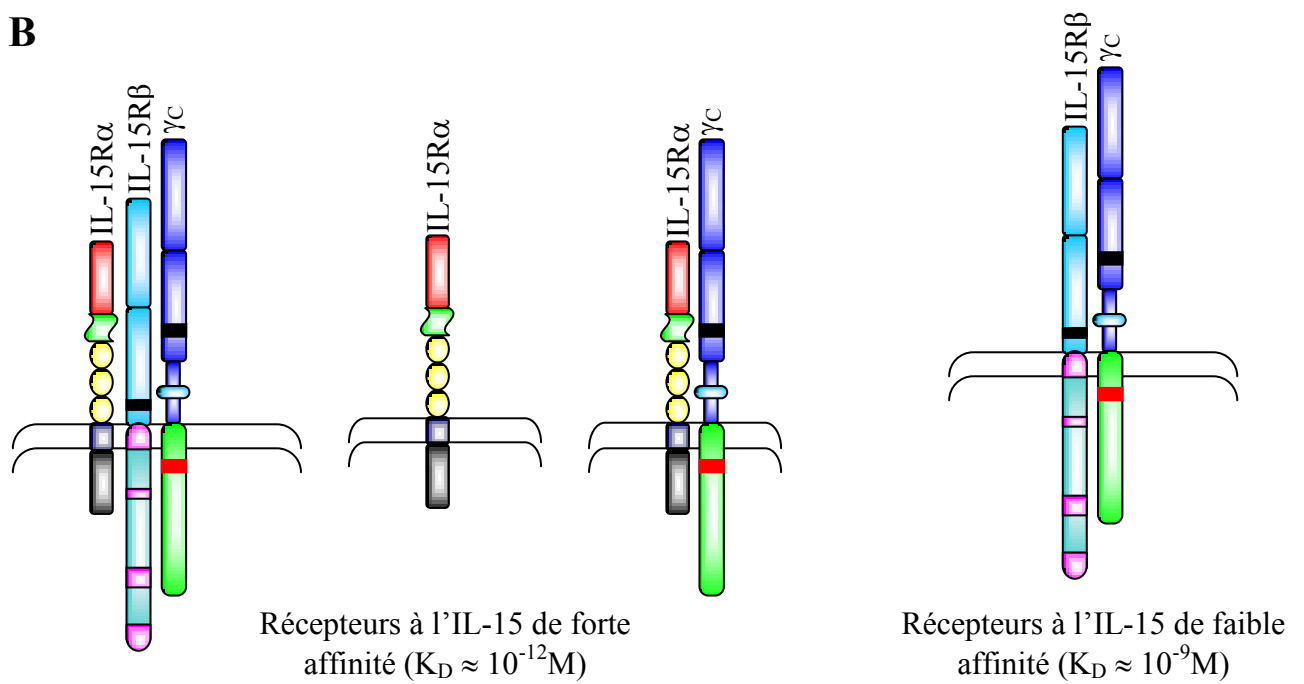




**Figure 14 : Gène, Transcription et Traduction de la Chaîne IL-15R $\alpha$**

## **b) Forme soluble**

Une forme soluble de l'IL-15R $\alpha$  issue d'un clivage protéolytique dépendant de TACE à partir de la forme membranaire a été mise en évidence récemment chez la souris (Budagian *et al.* 2004). Ce processus de clivage est augmenté en présence de certains agents chimiques comme le PMA. La forme soluble de l'IL-15R $\alpha$  murine (sIL-15R $\alpha$  murine) a une masse moléculaire de 30 kDa dont 4 kDa sont apportés par une N-glycosylation (Budagian *et al.* 2004). Le sIL-15R $\alpha$  humain a quant à lui une masse apparente de 42 kDa dont une douzaine de kDa de O-glycosylations (Mortier *et al.* 2004). Le sIL-15R $\alpha$  entre en compétition avec l'IL-15R $\alpha$  membranaire pour la fixation de l'IL-15 sur le récepteur membranaire de forte affinité IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ c et ainsi inhibe la signalisation induite par l'IL-15. Il peut contrôler la biodisponibilité d'IL-15. Le sIL-15R $\alpha$  prolonge le temps de demi-vie de l'IL-15 et contrôle la libération de la cytokine dans les tissus avoisinants en la séquestrant sous forme de complexe sIL-15R $\alpha$ /IL-15. Le domaine sushi soluble du sIL-15R $\alpha$  exerce un effet agoniste de l'IL-15 à travers le récepteur membranaire de faible affinité IL-2R $\beta$ / $\gamma$  (Mortier *et al.* 2005). De cette manière le sIL-15R $\alpha$  influence la nature et/ou la durée de la signalisation induite par l'IL-15 mais aussi augmente la portée d'action de l'IL-15 d'un mode autocrine ou juxtacrine vers un mode paracrine ou endocrine. Ceci montre un nouveau niveau de difficulté dans la biologie du système IL-15/récepteur et une partie de ce travail de thèse permet de mieux comprendre ce système.

**A****B****Figure 15 : La chaîne privée de l'IL-15**

A : la chaîne privée de l'IL-15, l'IL-15Rα.

B : Les récepteurs de l'IL-15.

#### 4. Sites d'expression de l'IL-15R $\alpha$

Les ARNm codant pour la chaîne IL-15R $\alpha$  ont été mis en évidence dans un grand nombre de tissus et de lignées cellulaires. Ils ont été détectés dans le foie, le coeur, la rate, l'ovaire, l'intestin grêle, le colon et, également dans différents tissus foetaux comme l'épithélium pigmentaire rétinien, la microglie, le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe et le thalamus (Kumaki *et al.* 1996 ; Hanisch *et al.* 1997 ; Kurowska *et al.* 2002). Les transcrits de l'IL-15R $\alpha$  ont été détectés aussi dans les fibroblastes dermiques, les lymphocytes T et les monocytes du sang périphérique (Anderson *et al.* 1995), les cellules endothéliales vasculaires (Angiolillo *et al.* 1997), les cellules NK (Carson *et al.* 1997), les neutrophiles (McDonald *et al.* 1998) et les cellules dendritiques spléniques (Mattei *et al.* 2001), de plus l'IL-15R $\alpha$  semble être fonctionnel à la surface des cellules rénales (Tejman-yarden *et al.* 2005).

#### 5. Régulation de l'expression de l'IL-15R $\alpha$

L'expression des ARNm de l'IL-15R $\alpha$  est faible dans les lymphocytes T au repos mais est augmentée après stimulation par l'IL-2, un anticorps anti-CD3, ou le PMA. L'IFN $\gamma$  augmente le taux d'ARNm de l'IL-15R $\alpha$  dans les macrophages (Giri *et al.* 1995). Les cellules dendritiques ont un taux d'ARNm augmenté suite à une activation par les IFN $\alpha\beta$  ou le LPS (Mattei *et al.* 2001). La dexaméthasone diminue l'expression des transcrits de l'IL-15R $\alpha$ . L'IL-15 induit une diminution rapide de l'expression membranaire de la chaîne IL-15R $\alpha$  dans les lymphocytes T et B activés (Kumaki *et al.* 1996). De plus, l'activité transcriptionnelle du gène de l'IL-15R $\alpha$  pourrait être contrôlée par NF- $\kappa$ B et IRF-4 (Mariner *et al.* 2001 ; Mariner *et al.* 2002).

Toutes les isoformes décrites peuvent s'exprimer à la membrane des cellules (Anderson *et al.* 1995 ; Dubois *et al.* 1999 ; Bulanova *et al.* 2003) (**Figure 14**). Les isoformes dépourvues du domaine sushi sembleraient, quant à elles, fortement être localisées au niveau perinucléaire (Dubois *et al.* 1999 ; Bulanova *et al.* 2003). Une expression intranucléaire de l'IL-15R $\alpha$  a été mise en évidence dans des lignées de mélanomes humains (Pereno *et al.* 2000).

## 6. La chaîne réceptrice IL-15RX des mastocytes

Cette chaîne a été mise en évidence dans des lignées mastocytaires murines proliférant en réponse à IL-15 mais pas à l'IL-2. Ces cellules n'expriment pas la chaîne IL-2R $\beta$  et la surexpression de la chaîne  $\gamma_c$  n'intervient pas dans la prolifération induite par l'IL-15. L'IL-15 se fixe sur une protéine de 60-65 kDa à la surface des cellules, protéine dont la nature reste inconnue, nommée IL-15RX (Tagaya *et al.* 1996). La fixation de l'IL-15 sur l'IL-15RX permettrait l'activation de JAK2 et STAT5. L'IL-15 inhibe également l'apoptose, augmente la production d'IL-15 par ces cellules et jouerait un rôle dans la migration des mastocytes humains et murins (Jackson *et al.* 2005).

## III. La transduction du signal IL-15

L'IL-15 peut se fixer et stimuler *cis* les cellules exprimant le complexe récepteur IL-15R $\alpha$ /IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$  ou fixée à sa chaîne IL-15R $\alpha$  membranaire ou soluble, et stimuler *trans* des cellules exprimant des complexes récepteurs IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$  (Dubois *et al.* 2002).

Différentes expériences de transfection des chaînes IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$  dans diverses cellules ont permis de définir le complexe IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$  comme récepteur fonctionnel de l'IL-15 (Giri *et al.* 1994). Ce récepteur IL-2R $\beta$ / $\gamma_c$ , est capable de répondre à des concentrations en IL-15 de l'ordre du nanomolaire (Balasubramanian *et al.* 1995 ; De Jong *et al.* 1996). La chaîne spécifique IL-15R $\alpha$  peut s'associer avec les chaînes IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$  pour former un complexe trimérique de forte affinité pour l'IL-15 (50 pM) (De Jong *et al.* 1996). Les signaux prolifératifs induits par ces deux complexes sont identiques et mettent en jeu principalement les JAKs, les STATs, les MAPKs et la PI3-K (**Figure 16**).

## A. Les kinases JAK1 et JAK3

Ces JAKs sont respectivement couplées aux chaînes IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$  dans les lymphocytes T (Johnston *et al.* 1994 ; Johnston *et al.* 1995), mais JAK3 peut aussi se lier à IL-2R $\beta$  (Russell *et al.* 1994 ; Zhu *et al.* 1998). Après leur activation, JAK1 et JAK3 induisent la phosphorylation des tyrosines de l'IL-2R $\beta$ . Ces JAKs sont importantes pour la prolifération et la différenciation des lymphocytes (Cao *et al.* 1995 ; Nosaka *et al.* 1995 ; Thomis *et al.* 1995 ; Rodig *et al.* 1998).

## B. Les facteurs STAT3 et STAT5

STAT3 et STAT5 se fixent sur les phosphotyrosines (Y392 et Y510) de la chaîne IL-2R $\beta$ . Cela engendre la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT5 dans les lymphocytes T au repos, ou de STAT3 et STAT5 dans les lymphocytes T activés (Johnston *et al.* 1995 ; Lin *et al.* 1995). STAT3 serait impliqué dans le cycle cellulaire et dans la régulation de l'apoptose (Takeda *et al.* 1998 ; Catlett-Falcone *et al.* 1999). STAT5 n'aurait pas d'influence sur le cycle cellulaire mais semble nécessaire à la protection anti-apoptotique (Zamorano *et al.* 1998). STAT5 est plus (Goldsmith *et al.* 1995) ou moins (Fujii *et al.* 1995) impliqué dans la prolifération cellulaire suivant le modèle étudié.

## C. Les MAPKs ERK1, JNK et p38 MAPK

Cette activation met en jeu JAK1 qui phosphoryle Y338 de l'IL-2R $\beta$  (Friedmann *et al.* 1996). Cela permet le recrutement et la phosphorylation de la protéine adaptatrice shc. La shc phosphorylée s'associe à Grb-2 et Sos, et active les MAPKs (Ravichandran *et al.* 1994).

La Y338 de l'IL-2R $\beta$  permet aussi le recrutement et la phosphorylation de Gab2 par JAK3 (Gadina *et al.* 2000). La protéine Gab2 activée associée à SHP2 et à la PI3-K pourrait former un complexe avec Shc/Grb-2/Sos et activer les MAPKs (Gadina *et al.* 1999). JAK3 activerait Pyk2 (« Proline-rich tyrosine kinase 2 ») (Miyazaki *et al.* 1998),

indépendamment des STAT. Cela induirait l'activation de ERK1-2 (Dikic *et al.* 1996) et JNK (Tokiwa *et al.* 1996).

## D. La PI3-K

Le recrutement et la phosphorylation de la PI3-K mettent en jeu l'IL-2R $\beta$  (Kanazawa *et al.* 1994), JAK1 (Migone *et al.* 1998), et les kinases Lck (Taichman *et al.* 1993) et Fyn (Karnitz *et al.* 1994). La PI3-K induit la prolifération cellulaire (Karnitz *et al.* 1995), active la biosynthèse protéique (Reif *et al.* 1997), et active la kinase anti-apoptotique Akt (Ahmed *et al.* 1997).

## IV. Signalisation par la chaîne $\alpha$

La chaîne  $\alpha$  a une activité anti-apoptotique, en activant TRAF2 (« TNF-R Associated Factor 2 ») ou Syk (« Spleen tyrosine kinase »). Dans la lignée fibroblastique murine L929, n'exprimant que la chaîne IL-15R $\alpha$  sans les chaînes de transduction du signal IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ , la fixation de l'IL-15 sur sa chaîne spécifique entraîne le recrutement de TRAF2 (Bulfone-Paus *et al.* 1999). Ainsi captée, TRAF2 ne peut plus se fixer à TNF-R1 et s'associer à ses partenaires pour former le complexe de mort TRAF2/FADD/TRADD/RIP. En présence d'IL-15, le TNF-R1 n'active plus la voie pro-apoptotique des caspases, mais le complexe IL-15/ IL-15R $\alpha$ /TRAF2 active plutôt la voie anti-apoptotique NIK/IKK/NF- $\kappa$ B. L'IL-15 protège donc de l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  et active la voie NF- $\kappa$ B. L'activation de NF- $\kappa$ B par l'IL-15 a aussi été mise en évidence dans les neutrophiles (McDonald *et al.* 1998), les précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> humains, dans des lignées leucémiques (Giron-Michel *et al.* 2003) et de mélanomes (Pereno *et al.* 2000) (**Figure 16**).

Le recrutement de Syk par la chaîne IL-15R $\alpha$  se fait en réponse à l'IL-15 dans les lignées humaines lymphocytaires B (Bulanova *et al.* 2001). La kinase Syk activée phosphoryle l'IL-15R $\alpha$  et la Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Dans ces lignées lymphocytaires B, la chaîne IL-15R $\alpha$  isolée entraîne une réponse cellulaire et une protection contre l'apoptose induite par le C2-céramide en réponse à l'IL-15.

Les mastocytes prolifèrent en réponse à l'IL-15 par l'intermédiaire de la chaîne IL-15RX en l'absence de l'IL-2R $\beta$  et indépendamment de  $\gamma_c$  (Tagaya *et al.* 1996). La signalisation par la chaîne IL-15RX passe par JAK2/STAT5 (Tagaya *et al.* 1996) et Tyk2/STAT6 (Masuda *et al.* 2000). Le facteur STAT6 est essentiel aux mastocytes pour la production d'IL-4. De plus, il protège ces cellules contre l'apoptose en augmentant les ARNm de la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> (Masuda *et al.* 2000).

Différentes isoformes de l'IL-15R $\alpha$  ont été mise en évidence dans les mastocytes : IL-15R $\alpha\Delta 4(7)$ , IL-15R $\alpha\Delta 3/4(7)$  et IL-15R $\alpha\Delta 3/4/5(7)$ . Suite à la liaison de l'IL-15, ces isoformes recrutent et phosphorylent la tyrosine kinase Syk et induit la phosphorylation de JAK2 et STAT5. L'isoforme IL-15R $\alpha\Delta 3/4(7)$  induit en plus la phosphorylation de STAT3, alors que les deux autres isoformes recrutent STAT6 (Bulanova *et al.* 2003).

Dans les fibroblastes murin, l'IL-15R $\alpha$  est associée avec un récepteur tyrosine kinase : AxL, qui est transactivé après liaison de l'IL-15R $\alpha$  avec l'IL-15 (Budagian *et al.* 2005). Ceci induit l'activation de la voie PI3K/Akt et augmente la transcription de Bcl-2 et de Bcl-X<sub>L</sub>.

De plus, le domaine intracytoplasmique de l'IL-15R $\alpha$  semble également intervenir dans la transduction du signal induit par l'IL-15. En effet, le remplacement de la partie intracellulaire de l'IL-15R $\alpha$  par celle de l'IL-2R $\alpha$  entraîne une diminution de la réponse à l'IL-15 par le récepteur trimérique mais n'a aucun effet sur la *transpré*sensation (Wu *et al.* 2008).



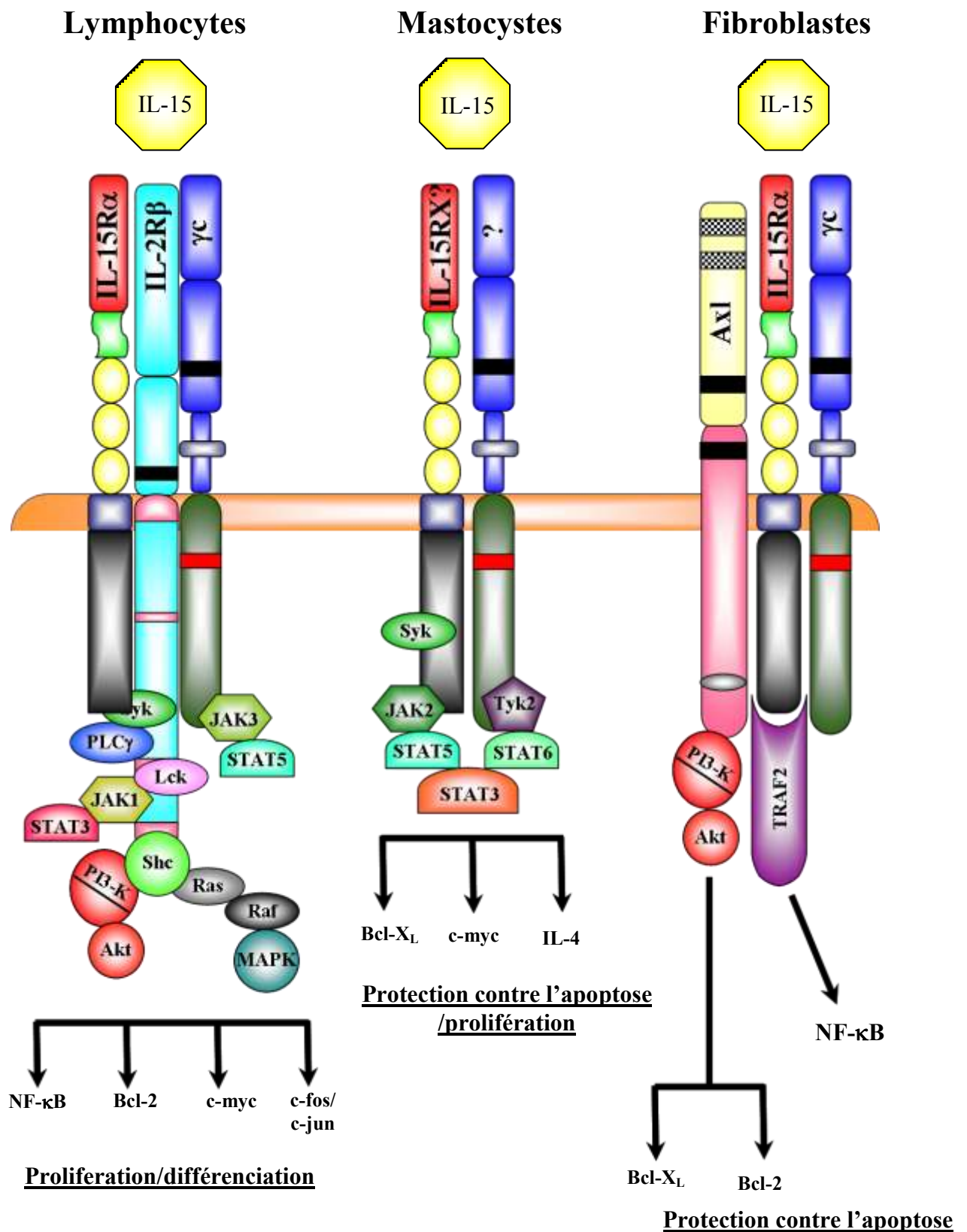


Figure 16 : Signalisation par les chaînes du récepteur à l'IL-15

## V. Les Fonctions Biologiques de l'IL-15

Les redondances fonctionnelles entre l'IL-15 et l'IL-2 s'expliquent par l'utilisation de chaînes transductrices communes. Cependant, l'IL-15 et sa chaîne réceptrice spécifique IL-15R $\alpha$  sont exprimées dans de nombreux types tissulaires et cellulaires, alors que l'expression de l'IL-2 est restreinte aux lymphocytes T activés. L'IL-15 exerce, ainsi, des activités biologiques variées. L'importance du système IL-15 a été démontrée suite à des expériences d'inactivation génique de l'IL-15 ou de l'IL-15R $\alpha$ . Des indications importantes ont été également apportées par des expériences de surexpression du gène.

### A. IL-15 et système immunitaire

#### 1. Les cellules immunitaires

Les voies de signalisation induites par le système IL-15 modulent les fonctions de nombreuses populations cellulaires du système immunitaire (**Figure 17**). En effet, l'IL-15 et ses chaînes réceptrices sont présentes ou interviennent spécifiquement au niveau des monocytes, macrophages, des cellules dendritiques, des neutrophiles, des éosinophiles, des mastocytes, des lymphocytes B et des lymphocytes T et en particulier les cellules NK. (**Tableau II et III**).

| Type cellulaire                | Effet de l'IL-15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Références                                                                                                                                                     |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Monocytes/<br>Macrophage       | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Principale source d'IL-15 de l'organisme.</li> <li>-Production d'IL-8 et du MCP-1 en réponse à l'IL-15.</li> <li>-Expression du CD40 membranaire qui active la sécrétion d'IL-12 et l'expression d'IL-12R<math>\beta</math>1.</li> </ul>                                                                                                                                                                                             | Grabstein <i>et al.</i> 1994<br>Badolato <i>et al.</i> 1997<br>Avicé <i>et al.</i> 1998<br>Wu <i>et al.</i> 1997                                               |
| Cellules<br>dendritiques       | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Production d'IL-15 en réponse à l'activité phagocytaire ou au CD40L</li> <li>- Production d'IL-15 après stimulation par le LPS et les IFN<math>\alpha\beta</math> chez la souris.</li> <li>-Activation de la sécrétion d'IFN<math>\gamma</math> qui retarde l'apoptose en augmentant l'expression de Bcl-xL, en levant l'inhibition Bcl-2.</li> <li>-Activation des lymphocytes T et régulation de la production d'IL-12.</li> </ul> | Jonuleit <i>et al.</i> 1997<br>Mattei <i>et al.</i> 2001<br>Kuniyoshi <i>et al.</i> 1999<br>Pirtskhalaishvili <i>et al.</i> 2000<br>Krutzik <i>et al.</i> 2005 |
| Mastocytes                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Augmentation de la production d'IL-4 et protection contre l'apoptose en agissant sur Bcl-xL chez la souris.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Tagaya <i>et al.</i> 1996<br>Masuda <i>et al.</i> 2000<br>Masuda <i>et al.</i> 2001                                                                            |
| Neutrophiles /<br>éosinophiles | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Induction de l'expression de NF-<math>\kappa</math>B</li> <li>-Induction de l'expression de Mcl-1</li> <li>-Inhibition de l'activité des caspases 3 et 8 diminuant l'expression de Bax.</li> <li>-Induction de la sécrétion d'IL-8, d'IL-1Ra, d'IL-1<math>\beta</math>, d'IL-7 et stimule la production de GM-CSF</li> </ul>                                                                                                         | Hoontrakoon <i>et al.</i> 2002<br>Jablonska <i>et al.</i> 2001<br>Ferretti <i>et al.</i> 2003<br>Pelletier <i>et al.</i> 2002<br>Bouchard <i>et al.</i> 2004   |
| lymphocytes B                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Protection contre l'apoptose</li> <li>-Induction la prolifération et la différenciation</li> <li>-En synergie avec le CD40L, stimulation de la synthèse d'IgM, IgG1 et d'IgA.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                             | Armitage <i>et al.</i> 1995<br>Kumaki <i>et al.</i> 1996                                                                                                       |

**Tableau II : Effet de l'IL-15 sur les différentes cellules du système immunitaire à l'exception des lymphocytes T et des NK**

### a) Les lymphocytes T

L'IL-15 joue un rôle dans différents aspects de la vie des lymphocytes T (**Tableau III**). L'IL-15 intervient dans l'homéostasie des lymphocytes T (**Figure 17**). Il existe plusieurs types de lymphocytes T :

**Les lymphocytes T à TCR  $\alpha\beta$**  qui représentent 95% des lymphocytes T.

**Les lymphocytes à TCR  $\gamma\delta$**  comme par exemple les DETC (« Dendritic Epidermal T Cell ») qui sont des CPA qui migrent au niveau de la peau au stade fœtal.

**Les lymphocytes T intra-épithéliaux (IEL) :** qui sont localisés au niveau de l'intestin et impliqués dans l'immunité des muqueuses. Les IELs exprimant le TCR  $\alpha\beta$  présentent les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CD8 ou un homodimère CD8 $\alpha\alpha$ , ou sont CD4<sup>+</sup>. Les IELs à TCR  $\gamma\delta$  sont tous CD8 $\alpha\alpha$ .

**Les cellules NK-T :** expriment simultanément le TCR  $\alpha\beta$  des cellules T et le marqueur NK1.1 des cellules NK.

### b) Les cellules NK

**Les cellules NK :** grands lymphocytes granuleux ou LGL (« Large Granular Lymphocytes ») jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée. Les cellules NK possèdent une activité tueuse naturelle ou NK (« Natural Killing »), une fonction tueuse activée par les lymphokines ou LAK (« Lymphokine-Activated Killing ») et une cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC (« Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity »).

**Les cellules IKDC :** sont des cellules NK et/ou des cellules dendritiques B220(+), CD11c(+), CD3(-), NK1.1(+) productrice d'IFN $\gamma$ .

| Lymphocytes T                      | Effet de l'IL-15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Références                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lymphocytes T à TCR $\alpha\beta$  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Induction de la prolifération des lymphocytes T mémoires et naïfs.</li> <li>-Protection des lymphocytes T activés contre l'apoptose induite par un anticorps anti-Fas et effet chimioattractant sur les lymphocytes T activés ou au repos.</li> <li>-Formation d'uropodes sur les lymphocytes T qui vont interagir avec ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD43 et CD44.</li> <li>-Expression de l'IL-2R<math>\alpha</math> (CD25), de Fas (CD95), de CD30, de TNF-R2, de CD40L (CD154), de CD69 et CD94/NKG2-A.</li> <li>-Diminution de l'expression du CD27.</li> <li>-Activation de la sécrétion d'IFN<math>\gamma</math> et d'IL-4 par les lymphocytes T CD4<math>^{+}</math> activés, et d'IL-2 par les lymphoblastes.</li> <li>-Avec l'IL-12, augmentation de la sécrétion d'IFN<math>\gamma</math> par les cellules T CD4<math>^{+}</math> non activées.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Kanegane <i>et al.</i> 1996</li> <li>Bulfone-Paus <i>et al.</i> 1997</li> <li>Wilkinson <i>et al.</i> 1995</li> <li>Nieto <i>et al.</i> 1996</li> <li>Kumaki <i>et al.</i> 1996</li> <li>Mingari <i>et al.</i> 1998</li> <li>Borger <i>et al.</i> 1999</li> <li>Seder <i>et al.</i> 1996</li> <li>Avicé <i>et al.</i> 1998</li> </ul> |
| Lymphocytes T à TCR $\gamma\delta$ | -Induction de la prolifération et de la survie après activation des DETC murins.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Edelbaum <i>et al.</i> 1995                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| IKDC                               | -Inhibition des CMH de classe I ou II chez la souris                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Ullrich <i>et al.</i> 2008                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Lymphocytes T intra-épithéliaux    | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Maturation des CD8<math>\alpha\alpha</math> murins.</li> <li>-Augmentation de la survie des TCR<math>\alpha\beta</math> CD8<math>\alpha\alpha</math> mature <i>in vivo</i> en activant une voie impliquant MyD88 chez la souris.</li> <li>-Protection des TCR<math>\gamma\delta</math> murins contre l'apoptose en augmentant l'expression de Bcl-2 et en stabilisant la quantité de Bcl-xL.</li> <li>-Activation de la production d'IFN<math>\gamma</math> chez la souris.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Lodolce <i>et al.</i> 1998</li> <li>Kennedy <i>et al.</i> 2000</li> <li>Bayer <i>et al.</i> 2008</li> <li>Yu <i>et al.</i> 2006</li> <li>Inagaki-Ohara <i>et al.</i> 1997</li> <li>Chu <i>et al.</i> 1999</li> <li>Ebert <i>et al.</i> 1998</li> </ul>                                                                                |
| NK-T                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Induction de l'expansion, de la maturation fonctionnelle et de la survie chez la souris.</li> <li>-Augmentation de la prolifération et de la sécrétion d'IFN<math>\gamma</math>.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Ohteki <i>et al.</i> 1997</li> <li>Kennedy <i>et al.</i> 2000</li> <li>Ohkawa <i>et al.</i> 2001</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                           |
| NK                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Augmentation de l'activité cytotoxique ainsi que de la sécrétion cytokinique</li> <li>-Induction du développement à partir des cellules souches hématopoïétiques.</li> <li>-Induction de la différenciation en NK CD56<math>^{+}</math></li> <li>-Effet chimioattractant favorisant l'adhésion dépendante de LFA-1 (« Leucocyte Function-associated Antigen-1 ») à l'endothélium vasculaire.</li> <li>-Augmentation de la production d'IFN-<math>\gamma</math>, de TNF-<math>\alpha</math> et de GM-CSF.</li> <li>-Augmentation de la survie, en maintenant l'expression de Bcl-2.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Yu <i>et al.</i> 1998</li> <li>Allavena <i>et al.</i> 1997</li> <li>Carson <i>et al.</i> 1997</li> <li>Ross <i>et al.</i> 1997</li> <li>Fehniger <i>et al.</i> 1999</li> <li>Carson <i>et al.</i> 1995</li> <li>Bluman <i>et al.</i> 1996</li> <li>Fehniger <i>et al.</i> 1998</li> </ul>                                             |

Tableau III : Effet de l'IL-15 sur les lymphocytes T et les NK

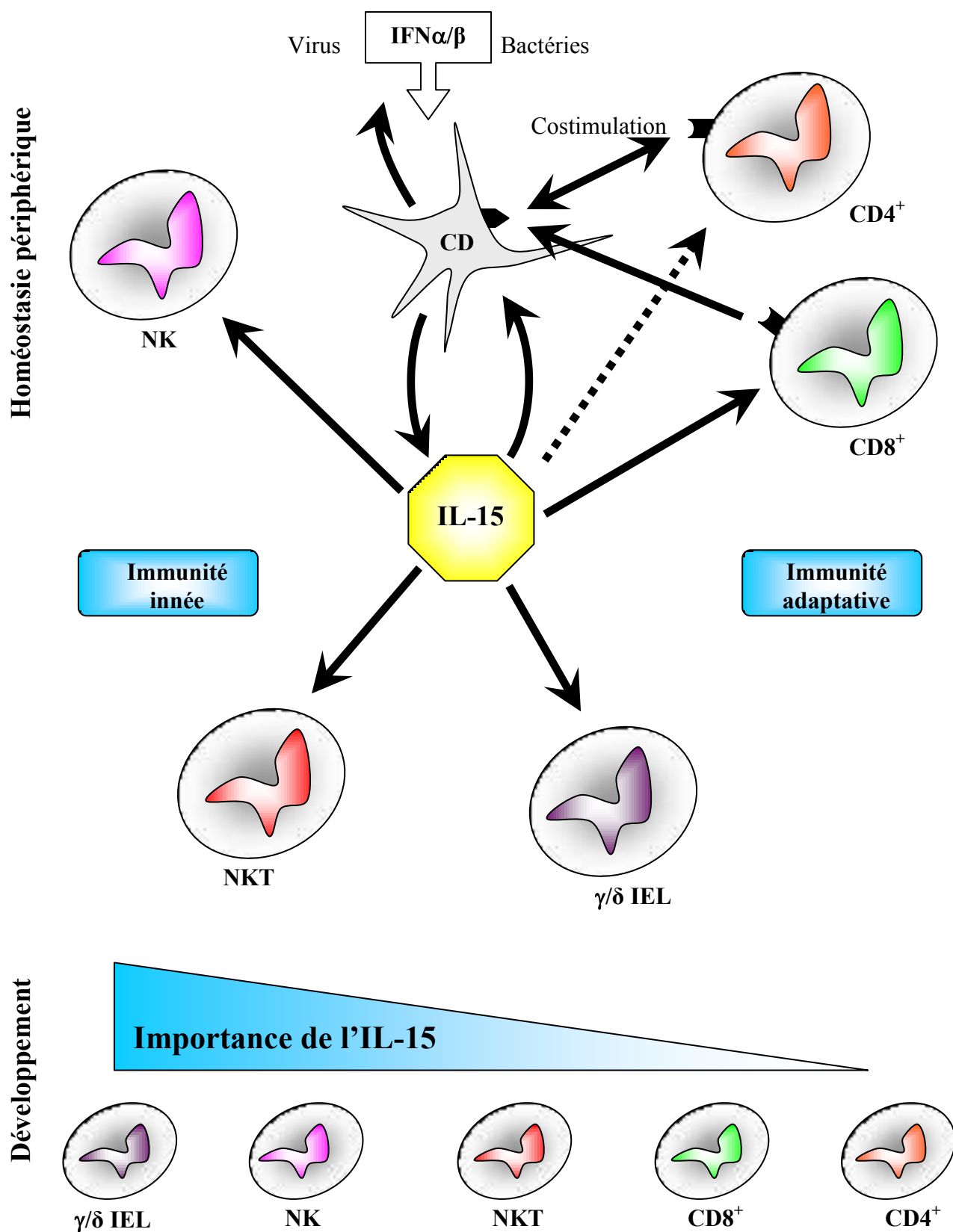
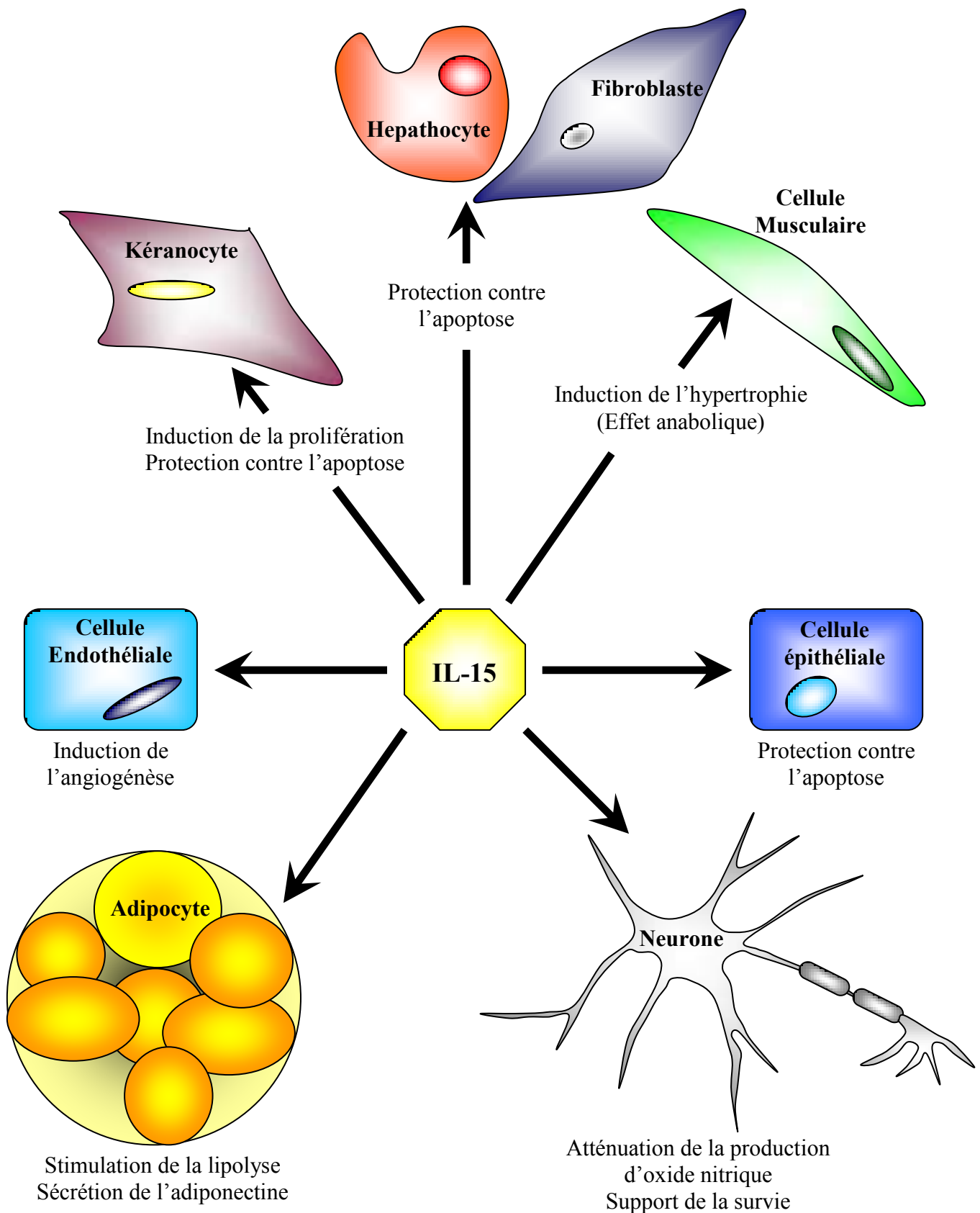


Figure 17 : Fonctions Physiologiques de l'IL-15 dans le Système Immunitaire.

## B. L'IL-15 en dehors du système immunitaire

L'IL-15 agit sur différentes cellules n'appartenant pas au système immunitaire. Les fibroblastes humains issus de la rate et de la peau expriment constitutivement l'IL-15 (Nilsen *et al.* 1998 ; Briard *et al.* 2002). L'IL-15 inhibe l'apoptose des fibroblastes synoviaux (Yang *et al.* 2002). De plus les cellules épithéliales intestinales prolifèrent en réponse à l'IL-15. L'IL-15 active l'angiogénèse *in vivo* et protège les cellules endothéliales contre l'apoptose *in vitro*. L'IL-15 semble jouer un rôle dans la régulation de la formation des jonctions cellulaires de la barrière intestinale (Nishiyama *et al.* 2001). L'IL-15 pourrait induire la différenciation des cellules musculaires et réguler positivement la quantité de protéines dans le muscle squelettique (Fehniger *et al.* 2001). Ceci se ferait par une réduction de la protéolyse (Busquets *et al.* 2005). L'IL-15 pourrait également participer dans la régulation des masses musculaire et adipeuse (Carbo *et al.* 2001). En effet, il a été mis en évidence que l'IL-15 module la sensibilité à l'insuline et la répartition de la masse graisseuse par une action endocrine et stimule la sécrétion d'adiponectine (Quinn *et al.* 2005). L'IL-15 semble aussi maturer les ostéoclastes et jouer un rôle dans la résorption osseuse (Ogata *et al.* 1999). Enfin, l'ARNm de l'IL-15 est exprimé dans la microglie, les astrocytes et les cellules neuronales (Kurowska *et al.* 2002). A faible dose, l'IL-15 supporte la prolifération des cellules de la microglie, atténue leur production d'oxide nitrique et induit la phosphorylation de JAK1 (Hanisch *et al.* 1997) (**Figure 18**).



**Figure 18 : Propriétés fonctionnelles de l'IL-15**

Schéma de l'effet de l'IL-15 en dehors du système immunitaire.



## VI. Le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$

A l'instar du système IL-6, le complexe formé entre le sIL-15R $\alpha$  et l'IL-15 est capable d'interagir avec les sous-unités transductrices IL-2/15R $\beta$  et  $\gamma_c$  à la surface des cellules cibles portant ce récepteur dimérique et donc d'induire la signalisation en « *trans* » sur ces cellules (effet agoniste). En revanche, comme beaucoup de récepteurs solubles, le sIL-15R $\alpha$  agit comme antagoniste en entrant en compétition avec le récepteur trimérique. (**Figure 19A**)

Dans certains cas physiologiques ou pathologiques, le clivage protéolytique de l'IL-15R $\alpha$  semble très important et représente le facteur régulateur de la signalisation induite par l'IL-15. D'une part, la présence du sIL-15R $\alpha$  inhibe la biodisponibilité de l'IL-15 libre. D'autre part, le sIL-15R $\alpha$  représente un mécanisme protecteur contre une suractivation induite par un excès d'IL-15 libre par compétition avec le récepteur membranaire (Mortier *et al.* 2004 ; Bulfone-Paus *et al.* 2006). Du fait de son activité pléiotropique dans l'immunité innée et adaptative, la biodisponibilité du sIL-15R $\alpha$  et du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  représente un autre niveau de régulation de ce système.

En effet, après sa synthèse, l'IL-15 est transloquée dans le réticulum endoplasmique indépendamment de la présence de l'IL-15R $\alpha$  puis transportée uniquement sous forme de complexe dans le golgi des cellules dendritiques activées avant d'être libérée après clivage du complexe (Duitman *et al.* 2008) (**Figure 19C**). De plus, le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  est induit durant l'inflammation et stimule la production d'INF $\gamma$  montrant ainsi le rôle primordial de l'IL-15R $\alpha$  dans les fonctions de maturation des cellules NK et dans la *trans*présentation *in vitro* comme *in vivo* (Mortier *et al.* 2008). Ceci montre comment l'IL-15R $\alpha$  agit comme un chaperon pour l'IL-15 et explique la faible concentration d'IL-15 libre mesurée dans les liquides biologiques.

L'activité biologique de l'IL-15 est considérablement augmentée en la complexant avec le sIL-15R $\alpha$ . L'administration du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  induit une régression massive et rapide de tumeurs solides dans plusieurs modèles murins (Epardaud *et al.* 2008). Cette destruction de la tumeur est orchestrée par les cellules T CD8+ déjà présentes, activées par le complexe.

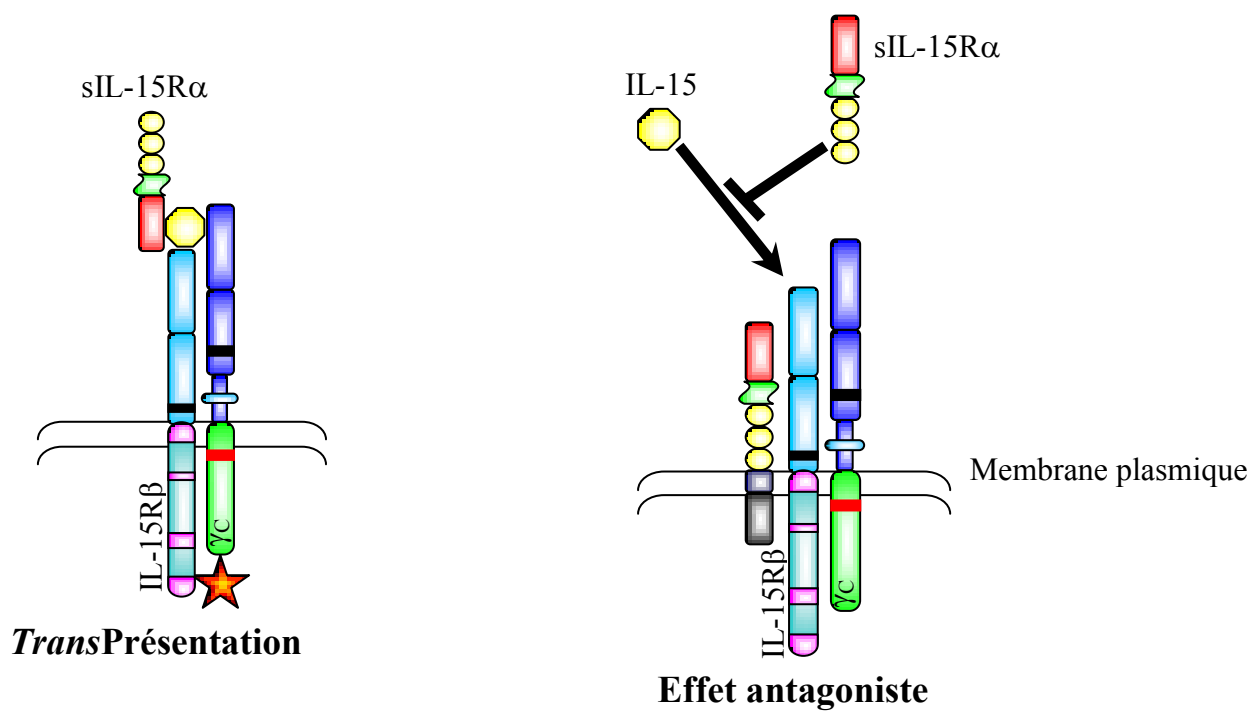
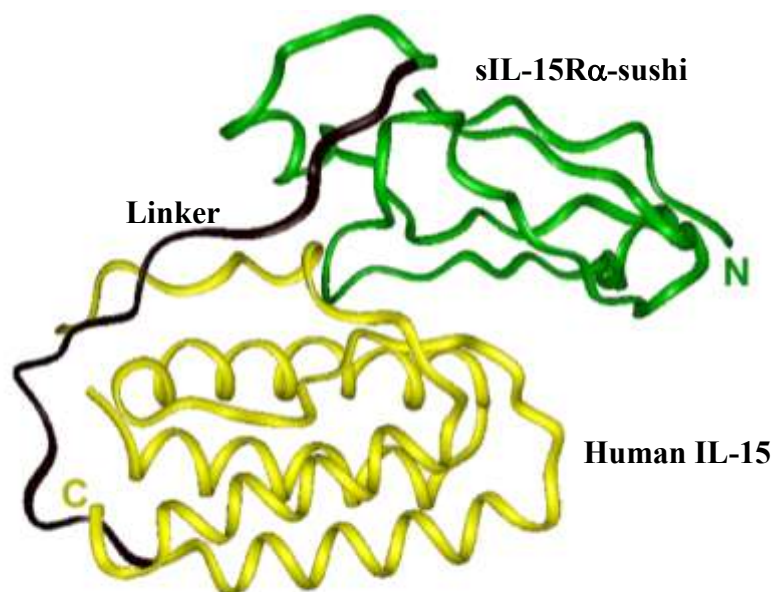
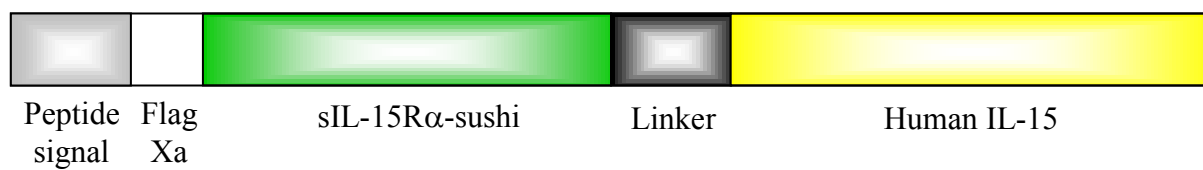
L'injection du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  induit également une expansion rapide et sélective des lymphocytes T CD8+ mémoires et des NK. Ces effets peuvent être dus au fait

que la liaison de l'IL-15 à son récepteur soluble pourrait induire un changement de conformation de l'IL-15 augmentant la reconnaissance par les récepteurs IL-15R $\beta$ / $\gamma$ <sub>C</sub> des cellules T (Rubinstein *et al.* 2006). Néanmoins, la viabilité et la prolifération des CD8<sup>+</sup> est augmentée par l'action de l'IL-15 via la cisprésentation sur des cellules CD8<sup>+</sup> transfectée avec la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-15 (Rowley *et al.* 2009). La transprésentation de l'IL-15 couplé au sIL-15R $\alpha$  permet également la différenciation et la prolifération *in vivo* des NK CD56<sup>high</sup>/CD16<sup>-</sup>/KIR<sup>-</sup> en CD56<sup>low</sup>/CD16<sup>+</sup>/KIR<sup>-</sup> puis en CD56<sup>low</sup>/CD16<sup>+</sup>/KIR<sup>+</sup> (Huntington *et al.* 2008).

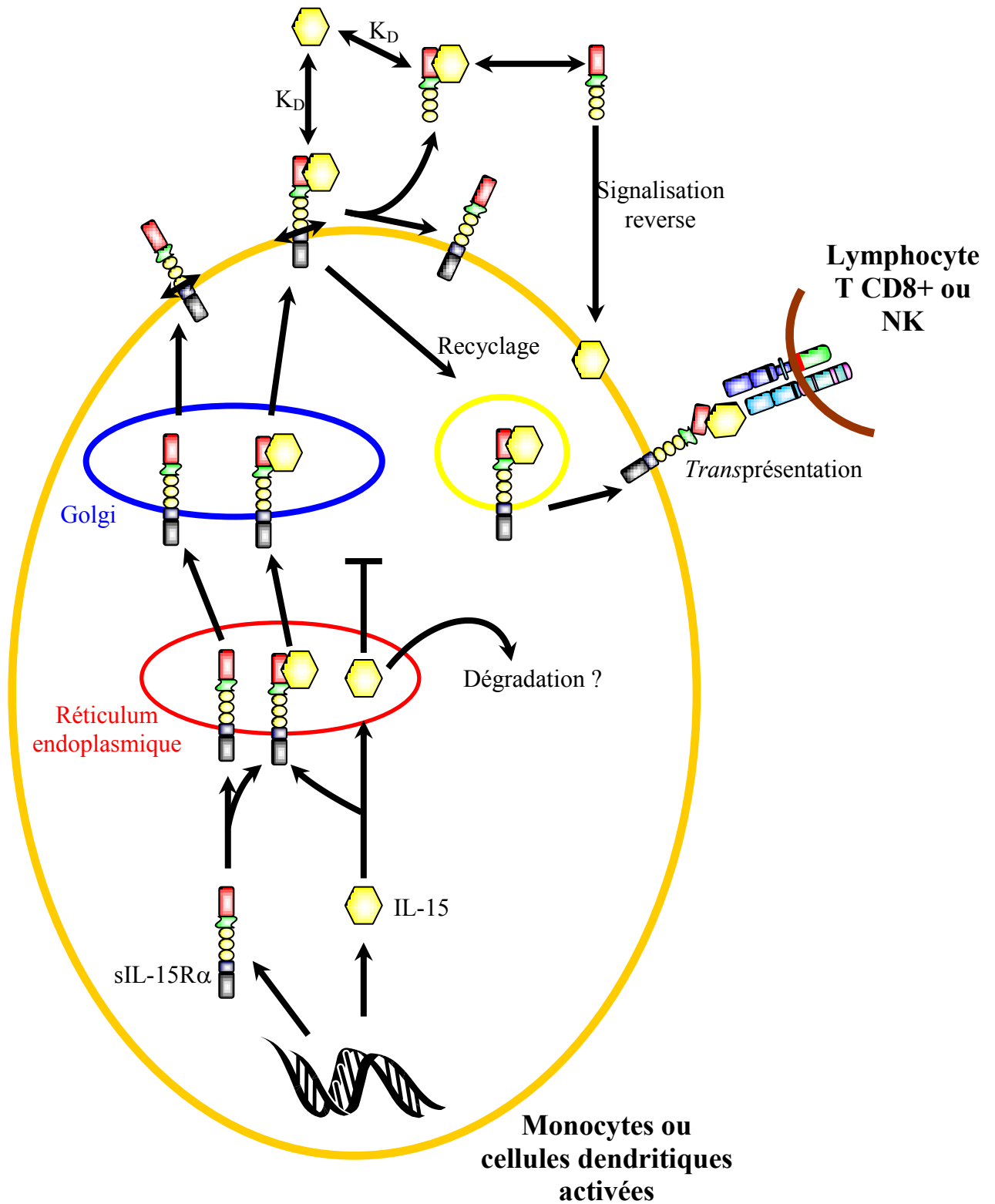
La transprésentation de l'IL-15 peut être imitée en utilisant une protéine chimérique composée du sIL-15R $\alpha$  couplé à un fragment Fc d'IgG1 humains (sIL-15R $\alpha$ /Fc). Le sIL-15R $\alpha$ /Fc augmente la prolifération des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> induite par l'IL-15 chez la souris. Le sIL-15R $\alpha$ /Fc augmente également la cytotoxicité et l'effet anti-tumoral de l'IL-15 et ce de façon supérieur au fragment Fc seul (Dubois *et al.* 2008).

Une fusokine composée de l'IL-15 et du GM-CSF a également été construite et elle possède une meilleure affinité pour le récepteur IL-15R $\beta$ / $\gamma$ <sub>C</sub> que l'IL-15 ce qui résulte en une hyperphosphorylation de STAT3 dans les macrophages et les splénocytes. (Rafei *et al.* 2007).

Une protéine de fusion a été construite entre l'IL-15 et le domaine sushi du sIL-15R $\alpha$  nécessaire à la liaison avec la cytokine (**Figure 19B**). Les deux protéines sont liées de façon covalente par un « linker » polypeptidique flexible. La protéine de fusion, appelée RLI pour Récepteur-Linker-Interleukin-15, est 100 à 1000 fois plus active que l'IL-15 seule. En effet, les cellules Mo7 exprimant les chaînes IL-2/15R $\beta$  et  $\gamma$ <sub>C</sub> mais pas l'IL-15R $\alpha$  possèdent une EC50 de l'ordre de 3 nM pour l'IL-15 et de 30 pM pour le RLI (Mortier *et al.* 2005). De plus, cette efficacité est renforcée par rapport au mélange sIL-15R $\alpha$ -sushi/IL-15 grâce à la stabilisation du complexe par le « linker ». Cet effet agoniste du sIL-15R $\alpha$ -sushi est renforcé dans le RLI et ceci a été confirmé par des études d'apoptose par marquage à l'annexine V. Le RLI possède un effet anti-apoptotique nettement supérieur à celui de l'IL-15 et meilleur que celui du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$ . Le RLI induit une expansion des cellules NK dans des souris déficientes en sphingosine 1-phosphate récepteur (Walzer *et al.* 2008). Enfin, dans des modèles murins de métastases pulmonaires et de carcinomes humains du côlon, l'administration du RLI inhibe la formation de métastases plus efficacement que l'IL-2 ou l'IL-15 (Bessard *et al.* 2009).

**A****B**

C



**Figure 19 : Le système IL-15/sIL-15R $\alpha$**

A. Effets agonistes et antagonistes du sIL-15R $\alpha$ . B. RLI ou Hyper IL-15. C. Voie de sécrétion du complexe IL-15/IL-15R $\alpha$

## VII. Le système IL-15 en pathologie

### A. Les Infections virales

#### 1. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine : VIH

Le rôle de l'IL-15 dans l'infection par le VIH est complexe car l'IL-15 exerce deux actions paradoxales pour les patients infectés. L'IL-15 active la réplication du virus tout en stimulant les fonctions immunitaires contre le virus (Fehniger *et al.* 2001 ; Mastroianni *et al.* 2004). En effet l'IL-15 restaure la fonction cytotoxique et la sécrétion d'IL-12 des cellules NK des patients (Chehimi *et al.* 1997 ; Lin *et al.* 1998). De plus, l'IL-15, en synergie avec l'IL-12, permet la production de différentes chimiokines (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES) par les cellules NK et inhibe l'infection *in vitro* (Fehniger *et al.* 1998). Ces chimiokines sont sécrétées par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et bloquent le tropisme du VIH pour les monocytes/macrophages (Cocchi *et al.* 1995). De plus, ces chimiokines entrent en compétition avec la gp120 du VIH, et diminuent l'expression du récepteur CCR-5, impliqué dans l'entrée du virus dans les cellules (Samson *et al.* 1996 ; Dragic *et al.* 1998).

La production d'IL-15 est défectueuse chez les patients infectés par le VIH. Une forte expression d'IL-15 dans les séra est corrélée avec une meilleure réponse à la thérapie (Amicosante *et al.* 2003). Une différence significative quant à la production d'IL-15 par les cellules mononuclées du sang en réponse à différents antigènes a été observée entre les patients non traités et ceux ayant un traitement antirétroviral HAART « highly active antiretroviral therapy » (d'Ettorre *et al.* 2002). Les cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH et les cellules NK jouent un rôle important dans la réponse immunitaire pendant l'infection virale (Kottlil *et al.* 2003). Pour les individus infectés par le VIH, le traitement *ex vivo* par l'IL-15 active les fonctions des neutrophiles (Mastroianni *et al.* 2000), augmente la survie et la fonction des cellules NK (Naora *et al.* 1999) et assure l'expansion des lymphocytes T spécifique du VIH (Fehniger *et al.* 2001). L'IL-15 est importante pour maintenir le pool de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires (Mueller *et al.* 2003 ; Mueller *et al.* 2003). Ces cellules sont sensibles à l'apoptose induite par Fas (CD95). L'IL-15 augmente leur survie, par un mécanisme qui ferait intervenir une augmentation du taux de Bcl-2 intracellulaire (Zaunders *et al.* 2003). L'IL-15 active la survie à long terme et les fonctions effectrices des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH en augmentant la cytotoxicité et la production d'IFN $\gamma$  *ex vivo* (Mueller *et al.* 2003). Des études révèlent que l'IL-15 est la cytokine la plus

efficace par rapport à l'IL-2 et l'IL-7, pour augmenter la réponse des cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques du gag-VIH. L'IL-15, en synergie avec l'IL-21, régule positivement la production d'IFN $\gamma$  dans les cellules T et NK (Strengell *et al.* 2003).

## 2. Autres virus

La transcription et la sécrétion d'IL-15 par les monocytes et les cellules NK est augmentée après infection *in vitro* de PBMC humains par le HHV-6 (« Human Herpes Virus typ-6 »), HHV-7, HSV-1 (« Herpes Simplex Virus type-1 ») ou l'EBV (« Epstein-Barr Virus »). L'IL-15 limite ainsi l'expansion virale en activant la cytotoxicité et la sécrétion de l'IFN $\gamma$  des cellules NK. Des observations *in vivo* décrivent une augmentation de la sécrétion d'IL-15 lors de l'infection par le virus de l'hépatite C (Fehniger *et al.* 2001).

## B. Les infections microbiennes

L'expression d'IL-15 est augmentée suite aux infections par *Burkholderia pseudomallei*, le Bacille de Calmette-Guérin (BCG) ou *Mycobacterium tuberculosis* (Doherty *et al.* 1996). La surexpression d'IL-15, *in vivo*, active la réponse immunitaire cytotoxique des cellules T et NK, et protège contre l'infection par le BCG. L'IL-15 a un rôle protecteur, également, contre l'infection par *Toxoplasma gondii* (Khan *et al.* 2002). De plus, l'administration d'IL-15 avant une infection par *Plasmodium falciparum*, augmente la défense immunitaire de l'hôte en favorisant l'élimination du pathogène par activation et prolifération des lymphocytes T $\gamma\delta$  (Elloso *et al.* 1998). Ces derniers interviennent également dans la protection contre *Salmonella choleraesuis* (Nishimura *et al.* 1996). Lors de l'infection par *Listeria monocytogenes*, les cellules épithéliales intestinales produisent de l'IL-15 qui va agir sur la prolifération et la sécrétion cytokinique des IELs CD8 $\alpha\alpha$  (Yajima *et al.* 2001). L'IL-15, lors de cette infection, va également induire une forte sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires. L'infection des monocytes par *Mycobacterium leprae* provoque une réponse cellulaire T dépendant de la sécrétion d'IL-15 (Jullien *et al.* 1997). Enfin, l'IL-15 montre une action anti-microbienne contre *Cryptococcus neoformans* (Mody *et al.* 1998). et *Candida albicans* (Vazquez *et al.* 1998).

## C. Les maladies inflammatoires

### 1. La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire affectant les jonctions osseuses périphériques, caractérisée par une hyperplasie de la membrane synoviale et par une infiltration de cellules immunitaires au niveau des liquides synoviaux. Au cours de cette maladie, on observe des taux élevés de cytokines proinflammatoires dans les fluides articulaires. L'IL-15 est détectée dans les fluides synoviaux (McInnes *et al.* 1996 ; McInnes *et al.* 1997) et est exprimée par les cellules de la membrane synoviale et augmente la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> chez les patients atteints de la forme active de la maladie (McInnes *et al.* 1996). *In vitro*, l'IL-15 induit sélectivement les cellules CD57(+) CD28(-) CD4(+) qui provoque la production de TNF- $\alpha$  par les monocytes (Yamada *et al.* 2007).

L'IL-15 est également produite par les synoviocytes de type fibroblastique (Harada *et al.* 1999) qui maintiennent ainsi leur taux d'expression de Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> impliqués dans la survie cellulaire (Kurowska *et al.* 2002). L'IL-15 des liquides synoviaux permet la migration des lymphocytes T vers les membranes synoviales ainsi que leur activation et la production de TNF $\alpha$  par ces cellules (McInnes *et al.* 1996 ; McInnes *et al.* 1997). L'IL-15 induit également l'expression du CD40L, par les lymphocytes T synoviaux (Mottonen *et al.* 2000), qui va interagir avec le CD40 des monocytes qui vont sécréter des cytokines de type Th1 (Avicé *et al.* 1998). L'IL-15 provoque la sécrétion d'IL-17 qui est impliquée dans la résorption ostéoclastique par les PBMC lors de la maladie (Kotake *et al.* 1999 ; Ziolkowska *et al.* 2000).

### 2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin regroupent la maladie de Crohn (MC) et la recto-colite hémorragique (RCH), caractérisées par des désordres gastro-intestinaux et extra-intestinaux. On détecte un pourcentage de PBMC sécrétant de l'IL-15 plus élevé chez les patients atteints de RCH ou de la forme aiguë de la MC par rapport aux sujets sains ou aux patients atteints d'une forme plus modérée de la MC (Kirman *et al.*

1996). L'IL-15 serait produite par les macrophages et les cellules épithéliales de la muqueuse rectale (Sakai *et al.* 1998 ; Liu *et al.* 2000). La surexpression d'IL-15 au niveau de la *lamina propria* provoquerait une expansion locale des cellules NK-T participant à l'inflammation pathologique (Ohta *et al.* 2002). De plus, l'IL-15 de la muqueuse intestinale permet l'activation des lymphocytes T qui, par interaction CD40/CD40L, induit les monocytes à produire du TNF $\alpha$  et de l'IL-12 par les monocytes (Liu *et al.* 2000). Un blocage de l'IL-15 aggrave les dommages épithéliaux dans le modèle murin de colite induit par le sulfate de sodium dextran (DSS) en augmentant l'apoptose et la sécrétion d'IL-6, de TNF et d'IFN $\gamma$ . Dans le modèle de souris avec une immunodéficiência sévère, (SCID), la neutralisation de l'IL-15 réduit l'inflammation et la production de cytokine pro inflammatoire (Obermeier *et al.* 2006).

### 3. Les autres pathologies inflammatoires

L'expression d'IL-15 est augmentée dans d'autres pathologies inflammatoires comme la sarcoïdose. C'est une maladie qui affecte principalement les poumons. Des taux élevés d'IL-15 sont retrouvés dans les macrophages isolés à partir de lavages bronchio-alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose active (Agostini *et al.* 1996 ; Zissel *et al.* 2000). L'IL-15 induirait la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pulmonaires (Agostini *et al.* 1996 ; Agostini *et al.* 1999). L'IL-15 jouerait un rôle au niveau des lésions épithéliales chez les patients atteints de la maladie coeliaque (Di Sabatino *et al.* 2005). L'IL-15 intervient également dans diverses inflammations hépatiques chroniques (Kakumu *et al.* 1997), maladies autoimmunes de la thyroïde (Ajjan *et al.* 1997), sclérose en plaques (Pashenkov *et al.* 1999), formation de cicatrices hypertrophiques (Castagnoli *et al.* 1999), pemphigoïdes bulleuses (Ameglio *et al.* 1999).

## D. Les maladies immunes et auto-immunes

### 1. Le rejet de greffes

L'IL-15 pourrait jouer un rôle important dans le rejet de greffe allogénique. Ce phénomène inflammatoire est caractérisé par l'infiltration et l'activation de cellules immunitaires dans l'organe transplanté. Le taux de transcrits d'IL-15 est augmenté au cours du rejet de greffes rénales (Pavlakakis *et al.* 1996). L'IL-15 serait donc impliquée dans



le rejet de greffe rénale (Li *et al.* 1998 ; Baan *et al.* 2002) mais également d'îlots pancréatiques (Ferrari-Lacraz *et al.* 2001 ; Ferrari-Lacraz *et al.* 2002). Les ARNm de l'IL-15 ont aussi été détectés lors de la transplantation hépatique (Baan *et al.* 1998). Les rejets de greffes cardiaques et hépatiques font intervenir les lymphocytes T circulants (Baan *et al.* 2000) et agissent en réponse à l'IL-15 produite par les macrophages CD68<sup>+</sup> infiltrés dans le transplant (Baan *et al.* 1999).

## 2. Le lupus érythémateux

Le lupus érythémateux disséminé (SLE) est caractérisé par des dépôts de complexes immuns et par la présence d'une inflammation qui cause la destruction des tissus, principalement de la peau, des reins, des vaisseaux sanguins et du système nerveux central (Mok *et al.* 2003). Une forte concentration d'IL-15 est corrélée avec l'expression de Bcl-2 et CD25 dans les lymphocytes issus de patients (Aringer *et al.* 2001). L'IFN $\gamma$  associé au LPS induit la synthèse et l'augmentation de l'IL-15 membranaire et sécrétée par les monocytes des patients atteints de lupus en phase active (Baranda *et al.* 2005). De plus, l'IL-15 membranaire semble être augmenté à la surface des cellules T et B de souris atteinte de SLE (Bo *et al.* 2009)

## 3. Autres maladies auto-immunes

La concentration d'IL-15 est augmentée dans le sérum de patients atteints de diabète de type I (*diabetes mellitus*) et corrèle avec un contrôle métabolique à long terme (Kuczynski *et al.* 2005). Le psoriasis est une inflammation chronique, hyperproliférative de la peau et se caractérise par une hyperplasie épidermique et une infiltration des monocytes et des lymphocytes T (Schön *et al.* 2005). L'IL-15 est augmentée dans les kératinocytes et dans la synovie (McInnes *et al.* 2005).

## E. Hypertension et athérosclérose

Une surexpression de l'ARNm de l'IL-15 a été observée dans les fibrolipides des plaques d'athérosclérose des souris ApoE déficientes (Wuttge *et al.* 2001). Dans ce cas, la principale source d'IL-15 serait les macrophages infiltrés qui recruterait les lymphocytes T sur le site des lésions (Houtkamp *et al.* 2001). De plus, l'IL-15 est fortement augmentée

chez les patients présentant une hypertension essentielle avec des dommages sévères. Cette surexpression systémique est reliée à la maladie cardiovasculaire (Kaibe *et al.* 2005).

## F. Maladies musculaires

L'inflammation stimule la production d'IL-15 des cellules musculaires dans la polymyosite et la dermatomyosite et l'IL-15 peut contribuer à l'immunopathogénèse en recrutant et en activant les cellules T (Sugiura *et al.* 2002). L'administration d'IL-15 protège le muscle de la dégénération dans un modèle murin de la myopathie de Duchenne (Harcourt *et al.* 2005)

## G. Les cancers

Les propriétés anti apoptotique de l'IL-15 suggèrent un rôle de cette cytokine dans la propagation des tumeurs, de leur expansion et des métastases. L'IL-15 intervient dans la leucémie lymphocytaire T de l'adulte. L'infection des lymphocytes T par le virus HTLV-1 est susceptible d'entraîner une leucémie lymphocytaire T de l'adulte (ATL, « Adulte T cell Leukemia »). Cette maladie est caractérisée, dans sa phase précoce, par une prolifération anormale des lymphocytes T dépendante d'une boucle autocrine d'IL-2 (Maeda *et al.* 1987 ; Yodoi *et al.* 1987). Les phases tardives de la maladie font intervenir les facteurs de transduction JAK1 et 3, et STAT3 et 5 (Xu *et al.* 1995 ; Takemoto *et al.* 1997) en l'absence d'IL-2, suggérant un possible rôle de l'IL-15 dans la prolifération des lymphocytes T qui expriment en outre la chaîne IL-15R $\alpha$  (Yamada *et al.* 1998). De plus, la protéine Tax du virus HTLV-1 présente une activité *transactivatrice* de la transcription de l'IL-15 (Azimi *et al.* 1998) et de l'IL-15R $\alpha$  (Mariner *et al.* 2001 ; Mariner *et al.* 2002), suggérant qu'une boucle autocrine d'IL-15 pourrait être impliquée dans la prolifération des lymphocytes T.

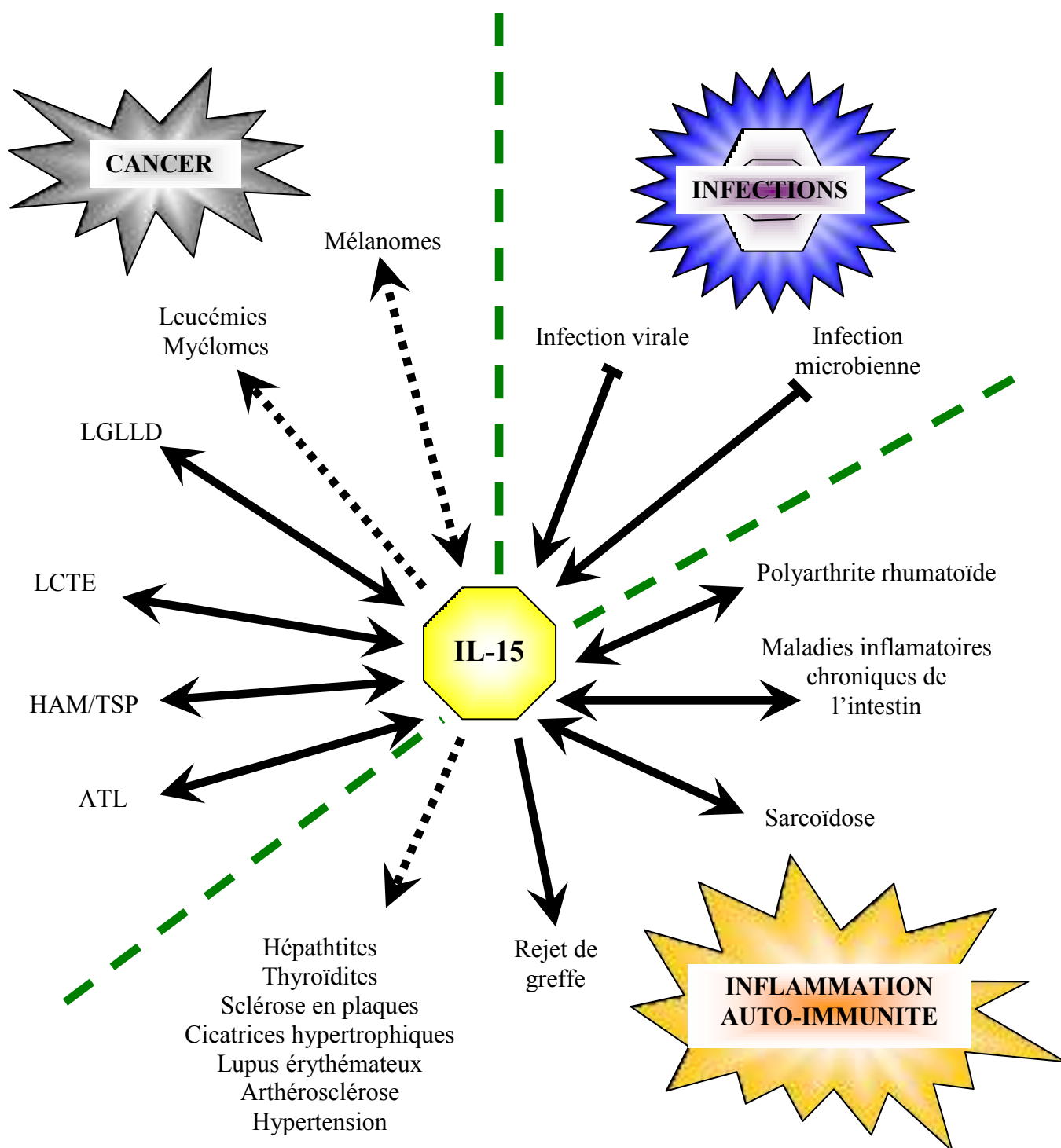
L'IL-15 est également impliquée dans la paraparésie spasmodique tropicale et les lymphomes cutanés T épidermotropes. La paraparésie spasmodique tropicale (TSP, « Tropical Spastic Paraparesis », ou HAM, « HTLV-1 Associated Myelopathy ») est une pathologie neurologique touchant la gaine de myéline. Les lymphocytes T infectés par le HTLV-1 prolifèrent spontanément par des boucles autocrines IL-2 et IL-15 (Azimi *et al.* 1999 ; Azimi *et al.* 2000). De plus, l'IL-15 exerce une action anti-apoptotique pour les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> infectés (Azimi *et al.* 2001). Les lymphomes cutanés T

épidermotropes (LCTE) regroupent les Mycosis Fongoïdes (MF), les Syndromes de Sézary (SS), et d'autres lymphomes T périphériques survenant primitivement au niveau de la peau. La protéine IL-15 est détectée dans les MF et les SS (Dobbeling *et al.* 1998 ; Leroy *et al.* 2001) et pourrait agir de façon autocrine/paracrine (Dobbeling *et al.* 1998). L'IL-15 et l'IL-17 prolongent la survie des LCTE (Dobbeling *et al.* 1998) en augmentant l'expression de Bcl-2 (Qin *et al.* 2001), et agissent aussi sur le cycle cellulaire (Qin *et al.* 1999). De plus, les souris transgéniques surexprimant l'IL-15 développent des infiltrats épidermiques lymphocytaires (Fehniger *et al.* 2001).

Enfin, la leucémie à grands lymphocytes à grains, les leucémies lymphocytaires B et les myélomes font intervenir le système IL-15. La leucémie à grands lymphocytes à grains (LGL ou LGLLD, « Large Granular Lymphocytes Lymphoproliferative Disorder ») est associée à une forte expansion en lymphocytes T et cellules NK. Ces cellules expriment les trois chaînes réceptrices IL-15R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ , et prolifèrent en réponse à l'IL-15 (Zambello *et al.* 1997). Des souris transgéniques surexprimant l'IL-15 présentent une expansion notable des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> et des cellules NK, et développent une leucémie lymphocytaire létale, similaire à la LGL (Fehniger *et al.* 2001). Ainsi, la sur-activation des cellules par l'IL-15 pourrait induire une maladie lymphocytaire chronique et induire une transformation maligne des lymphocytes. L'IL-15 a une action proliférative *in vitro* dans les leucémies lymphocytaires B et à tricholeucocytes (Trentin *et al.* 1996). De plus, l'IL-15 assure la prolifération de la lignée leucémique myéloïde aigue MO7e (Meazza *et al.* 1998), et la lignée leucémique myéloïde K-562 exprime les trois chaînes IL-15R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$  (Anderson *et al.* 1995). Chez les patients atteints de myélome multiple, les plasmocytes malins expriment également les trois chaînes réceptrices de l'IL-15. L'IL-15 jouerait un rôle dans la propagation tumorale (Tinhofer *et al.* 2000).

L'IL-15 pourrait jouer un rôle dans le développement des mélanomes. En effet, les rayonnements UV provoquent une augmentation de la transcription de l'IL-15 par les kératinocytes (Mohamadzadeh *et al.* 1995). De plus, les transcrits de l'IL-15 et de la chaîne IL-15R $\alpha$  ont été détectés dans certaines lignées de mélanomes (Doucet *et al.* 1997 ; Barzegar *et al.* 1998). L'IL-15 induit le développement de mélanomes plus agressifs *in vivo*. L'IL-15 produite par ces lignées diminuerait l'expression membranaire du HLA de classe I, ce qui permettrait l'échappement des tumeurs vis-à-vis du système immunitaire (Gilboa *et al.* 1999).

Les messagers de l'IL-15 sont retrouvés dans de nombreuses tumeurs solides comme les sarcomes d'Ewing, les ostéosarcomes, les rhabdomyosarcomes, les glioblastomes, les neuroblastomes et les mésothéliomes. Les lignées issues de carcinome rénal ou cervical, de rétinoblastome, de gliome, de tératocarcinome, ou issues de cancer du poumon à petites cellules ou de cancer colorectal expriment les messagers de l'IL-15. Les rhabdomyosarcomes sécrètent l'IL-15 et expriment les récepteurs membranaires. Certains gliomes et glioblastomes expriment également les transcrits de la chaîne IL-15R $\alpha$  (Fehniger *et al.* 2001).



**Figure 20 : IL-15 et pathologies**

## VIII. Le système IL-15 en thérapie

L'IL-15 est une cytokine pléiotrope qui gouverne la prolifération, la survie, les activités sécrétrices et la différenciation de nombreux types cellulaires. Le système IL-15 est un biorégulateur qui ne sert pas seulement dans l'immunité innée mais qui module également une réponse adaptative sélective et de ce fait lie l'inné à l'acquis. La détection du complexe IL-15/IL-15R $\alpha$  dans les surnageants et les membranes cellulaires suggère que non seulement la transduction du signal mais aussi la stabilisation, la compartimentation et la régulation de cette cytokine dépend de son récepteur  $\alpha$ . Une caractéristique intéressante de l'IL-15, qui contraste avec l'IL-2, est la diversité d'utilisation de ses chaînes réceptrices (IL-2/15R $\beta$ , IL-15R $\alpha$ ,  $\gamma_c$  et IL-15RX) qui dépend non seulement du type cellulaire mais aussi de l'état d'activation de la cellule.

Cette variété d'utilisation représente un important potentiel thérapeutique qui nécessite une bonne compréhension du système pour élaborer des stratégies ciblant le système IL-15/IL-15R. Une stimulation ou une inhibition peut être obtenue en ciblant l'activité de la cytokine. En ciblant la chaîne privée de l'IL-15, il est possible d'obtenir un effet beaucoup plus spécifique sur le type de cellule ou le niveau de maturation cellulaire (Waldmann *et al.* 2004 ; Signore *et al.* 2003 ; Amlong *et al.* 2006). Une administration systémique d'antagoniste de l'IL-15 comme des anticorps contre l'IL-15, ou contre les sous-unités réceptrices de l'IL-15, de sIL-15R $\alpha$  ou de la protéine de fusion sIL-15R $\alpha$ /Fc (Ferrari-Lacraz *et al.* 2001 ; Ferrari-Lacraz *et al.* 2004) permet une manipulation de l'activité de l'IL-15 *in vivo*.

Par exemple, l'administration de la chaîne sIL-15R $\alpha$  recombinante diminue fortement l'arthrite induite par le collagène (Ruchatz *et al.* 1998), retarde le rejet de greffe cardiaque (Smith *et al.* 2000), réduit l'inflammation aigue, inhibe la prolifération lymphocytaire T (Wei *et al.* 2001) et prévient de l'induction d'une inflammation de type allergique au niveau des bronches (Ruckert *et al.* 2005). Le sIL-15R $\alpha$  bloque également l'IL-15 endogène dans des modèles anti-tumoraux (Gri *et al.* 2002) et antimicrobiens (Khan *et al.* 2002).

Un autre exemple d'antagoniste de l'IL-15 est réalisé en mutant la Q108 en C-terminal de l'IL-15 (Kim *et al.* 1998) et en couplant l'IL-15 au Fc $\gamma$ 2a. Cette protéine de fusion mutante (CRB-15) diminue le rejet d'allogreffes de cellules des îlots pancréatiques

d'allogreffe chez la souris (Ferrari-Lacraz *et al.* 2001 ; Ferrari-Lacraz *et al.* 2002) et prévient le développement de l'arthrite induite par le collagène dans des modèles murins.

Des anticorps contre l'IL-15 ont été utilisés efficacement dans différents modèles de maladies autoimmunes dont le psoriasis (Villadsen *et al.* 2003). De tels anticorps sont également efficaces chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Baslund *et al.* 2005).

De la même manière, l'administration d'agoniste de l'IL-15 comme la protéine de fusion IL-15/Fc, l'ADNc de l'IL-15 ou l'IL-15 elle-même ont été testé comme adjuvant dans des thérapies anti-tumorales (Sun *et al.* 2006). L'IL-15 semble même être un très bon sinon le meilleur candidat pour les thérapies anti-cancéreuses (Cheever *et al.* 2008).

L'administration d'IL-15 aux souris, moins toxique que l'IL-2 (Katsanis *et al.* 1996), accroît l'activité anti-tumorale après transplantation syngénique de la moelle osseuse, en favorisant la reconstitution et la fonction des cellules NK, NK-T et CD8<sup>+</sup>. De plus, l'administration d'IL-15 peut augmenter les réponses T antigène-spécifiques après le transfert de lymphocytes T provenant d'une souris transgénique pour le TCR où les cellules T CD8<sup>+</sup> reconnaissent l'antigène de mélanome gp100. L'IL-15 pourrait être utilisée comme un adjuvant potentiel pour la thérapie cellulaire et les diverses stratégies de vaccination (Alpdogan *et al.* 2005).

L'aptitude des récepteurs solubles à spécifiquement lier et inhiber l'effet biologique de leur cytokine est à la base de l'intérêt porté pour leur utilisation en thérapie, avec cependant des avantages et des inconvénients.

L'avantage certain de l'utilisation des récepteurs solubles par rapport à d'autres médicaments est leur haute spécificité, permettant de ne pas affecter les autres cytokines. Cette thérapie par récepteur soluble permet de mieux préserver l'immunocompétence de l'hôte contrairement aux médicaments immunosuppresseurs peu spécifiques. Un autre avantage présenté par la majorité des récepteurs solubles est leur forte affinité pour leur ligand, faisant d'eux de puissants inhibiteurs. Comme les récepteurs solubles naturels dérivent de molécules endogènes, ils ne sont pas immunogènes, ce qui évite le développement d'une réponse humorale par l'hôte. De plus, les récepteurs solubles sont faiblement toxiques pour l'organisme (Fernandez-Botran *et al.* 2002).

Les récepteurs montrent tout de même certaines limites quant à leur utilisation comme agents immunothérapeutiques. Les cytokines sont impliquées dans de nombreuses manifestations pathologiques dans différents types de maladies, et leur production et leur sécrétion sont souvent la résultante de causes sous-jacentes. Donc, les récepteurs solubles

ne vont pas nécessairement agir à la source de la maladie. Les récepteurs solubles présentent, également, une demie vie courte de l'ordre de quelques heures (Jacobs *et al.* 1991). Pour pallier ce problème, des protéines de fusion ont été construites entre le récepteur et la partie Fc d'une immunoglobuline ou par l'addition de molécules de PEG ("Polyéthylène Glycol") (Kurschner *et al.* 1992 ; Mohler *et al.* 1993 ; Richter *et al.* 1999). De plus, à cause de leur nature protéique, les récepteurs solubles sont les cibles de nombreuses protéases et nécessitent des conditions de stockage spéciales et ne peuvent pas être administrés oralement. Enfin, une limite supplémentaire est la dissociation du complexe cytokine/récepteur surtout si le récepteur soluble n'est pas en concentration suffisante. Les cytokines elles-mêmes présentent des limites, par exemple, l'IL-15 est capable d'aggraver la GVHD ("Graft vs. Host Diseases"), ainsi l'administration d'IL-15 au receveur ne doit avoir lieu qu'après déplétion de la moelle osseuse en lymphocytes T. De plus l'administration d'IL-15 peut augmenter l'activité GVL ("Graft vs. Leukemia") (Alpdogan *et al.* 2005).

*Cytokine specificity is conferred by private alpha chains. IL-15R $\alpha$  exists as a soluble form shed from the membrane-bound form. In this study, we identify molecular basis wich gouverne antagonistic effect or agonist effect of the sIL-15R $\alpha$ . This work shows that sIL-15R $\alpha$  is implicated in pathologies like cancer or inflammatory diseases and could lead to therapeutic applications.*

**Key Words :** Immunology, Cytokine, Interleukin-15, Interleukin-15 Soluble Receptor, Antagonist Activity, Fusion Protein, Transsignalisation.

**Centre de recherche en cancérologie Nantes/Angers  
INSERM U892, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu  
44093 Nantes cedex 01**



# ***RESULTATS***

## AVANT PROPOS

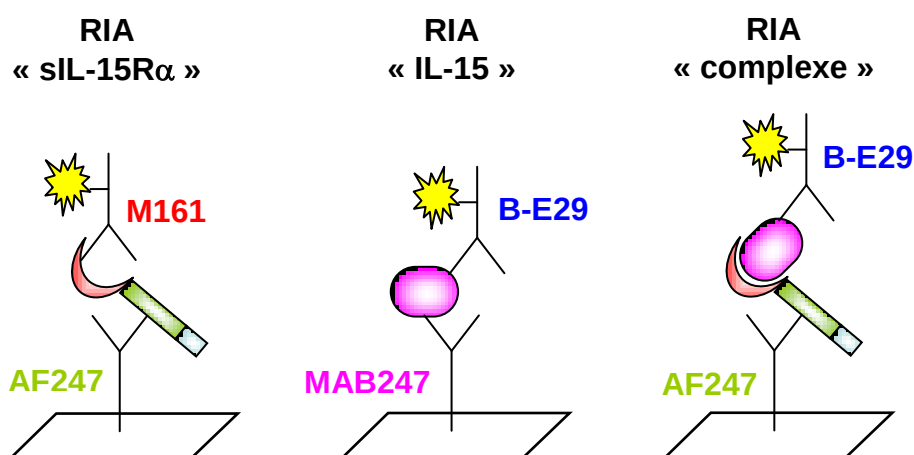
Cette étude est scindée en quatre parties incluant trois articles, l'un publié dans le *Journal of Molecular Biology*, le second soumis à *American Journal of Gastroenterology* et le troisième publié dans *Cancer Research*.

Dans la première étude, nous avons étudié le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  d'un point de vue structural et fonctionnel *in vitro* et mis en évidence le rôle du domaine codé par l'exon 3 situé en C-terminal du domaine sushi du sIL-15R $\alpha$ . Celui-ci est indispensable à la fonction antagoniste du sIL-15R $\alpha$  et stabilise le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  en diminuant sa constante de dissociation (Article I).

La mise en évidence au laboratoire du récepteur soluble, sIL-15R $\alpha$ , grâce à une technique de RIA sensible, avec une limite de détection de 1 pM ainsi que notre compréhension des différents rôles du sIL-15R $\alpha$  nous ont amené à doser l'IL-15, le sIL-15R $\alpha$  et le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  dans différents contextes pathologiques pour évaluer leurs rôles à la fois dans un contexte physiologique, dit "normal" et dans différentes situations pathologiques (degré d'évolution, réponse à différents traitements). Dans ce but, un premier anticorps polyclonal (AF247, R&D) est utilisé afin de piéger le sIL-15R $\alpha$  présent dans les surnageants ou les liquides biologiques. Le second anticorps monoclonal (M161, Medarex) est radiomarké à l' $^{125}\text{I}$  et sert à la révélation. Le M161 réagit avec un épitope de l'IL-15R $\alpha$  impliqué dans l'interaction avec l'IL-15 en bloquant sa liaison. Ainsi, ce RIA ne permet la détection que du sIL-15R $\alpha$  "libre", non lié à une molécule d'IL-15. Deux autres types de RIA ont été mis au point. Le premier permet la détection de l'IL-15 capturée par un anticorps monoclonal (Mab247, R&D) dont l'épitope se situe dans l'interface avec la chaîne  $\gamma\text{c}$ , et révélée par un anticorps monoclonal BE-29 radiomarké à l' $^{125}\text{I}$  dont l'épitope se situe dans l'interface avec la chaîne IL-15R $\alpha$ . Néanmoins, cet anticorps n'inhibe pas complètement la liaison de l'IL-15 à sa chaîne  $\alpha$ , n'excluant pas qu'une très faible partie de l'IL-15 détectée soit sous forme complexée. Enfin, le dernier test RIA permet la détection du complexe formé d'une molécule d'IL-15 avec une molécule de sIL-15R $\alpha$ . Ce complexe est capturé par l'anti IL-15R $\alpha$  (AF247) et révélé par un anti IL-15 (BE-29) radiomarké à l' $^{125}\text{I}$  (**Figure 21**).

Le système IL-15 est fortement régulé et est impliqué dans certaines pathologies. Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés, en particulier, à la maladie de Crohn (MC), une maladie inflammatoire de l'intestin. Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence une élévation du sIL-15R $\alpha$  associé à une diminution de l'IL-15 et une augmentation du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  *in vivo* dans le sérum des patients atteints de MC répondeurs au traitement par anticorps anti-TNF $\alpha$  (Rémicade®). Nous avons montré que l'Infliximab (Rémicade®) induit le clivage de l'IL-15R $\alpha$  membranaire des cellules de la muqueuse intestinale. Ce sIL-15R $\alpha$  capte l'IL-15 libre impliquée dans l'inflammation. L'IL-15 ainsi que le sIL-15R $\alpha$  sont absents du sérum des patients réfractaires au traitement ce qui fait de ce système un excellent biomarqueur quant à la réponse à l'Infliximab (Article II).

Nous avons ensuite étudié le sIL-15R $\alpha$  dans d'autres contextes pathologiques et plus particulièrement dans les cancers. Nous avons montré que la concentration sérique de sIL-15R $\alpha$  de patients atteints de cancer de la tête et du cou est un facteur de mauvais pronostic en terme de survie. En effet, nous avons montré que la cellule tumorale produisait le sIL-15R $\alpha$  par clivage protéolytique de la forme membranaire de l'IL-15R $\alpha$  par ADAM17. Le sIL-15R $\alpha$  agit alors comme agoniste de l'IL-15 favorisant le contexte inflammatoire et donc la progression tumorale (Article III). Nous avons évalué si ce mécanisme d'évasion immunitaire peut s'étendre à d'autres types de cancers comme le cancer de la prostate.



**Figure 21 : Les différents RIAs de détection du sIL-15R $\alpha$ , de l'IL-15 et du complexe**

Les sensibilités des différents RIAs sont, respectivement, de 1 pM, 2 pM et 4 pM. (Ac anti-IL-15 : B-E29 et MAB247; Ac anti-IL-15R $\alpha$  : M161 et AF247)

# **I. Rôle du domaine codé par l'exon 3 de l'IL-15R $\alpha$ dans la fonction antagoniste du sIL-15R $\alpha$**

## **A. Résumé**

Nous avons précédemment montré l'existence d'une forme soluble de l'IL-15R $\alpha$  issue du clivage protéolytique de la forme membranaire par une ou plusieurs métalloprotéase dont la TACE. La forme soluble de l'IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ) exerce un effet antagoniste de l'IL-15 en inhibant la fixation de la cytokine sur son récepteur trimérique IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ . A l'inverse, une forme recombinante du domaine sushi du sIL-15R $\alpha$  n'a pas d'effet antagoniste mais conserve un effet agoniste de l'IL-15 pour les cellules exprimant le récepteur membranaire IL-2/15R $\beta$ / $\gamma$ c. De façon à éclaircir les mécanismes moléculaires gouvernant la formation du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  et ses propriétés agonistes et antagonistes, nous avons comparé les effets biologiques et les propriétés de liaison de formes recombinantes de sIL-15R $\alpha$  contenant le domaine sushi et différentes parties du domaine extracellulaire. Nous avons d'abord démontré que le domaine du sIL-15R $\alpha$  codé par l'exon 3 et plus particulièrement les 13 résidus en N-terminal sont importants en addition du domaine sushi pour la stabilisation du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$ . Ces 13 résidus en C-terminal du domaine sushi diminuent la constante de dissociation du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  et contribuent à hauteur de 10 à 20 % à l'énergie libre d'interaction. Nous avons ensuite montré que toutes les formes de sIL-15R $\alpha$  contenant le domaine sushi sont des agonistes de l'action de l'IL-15 pour les cellules exprimant le récepteur IL-2/15R $\beta$ / $\gamma$  en augmentant la liaison de l'IL-15 sur ce récepteur. L'effet agoniste des différentes formes de sIL-15R $\alpha$  est proportionnel à leurs affinités respectives pour l'IL-15. Nous avons également déterminé que les 13 résidus en C-terminal du domaine sushi sont indispensables à l'effet antagoniste dans un contexte IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ . Ces 13 résidus créent un encombrement stérique gênant la liaison du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  au récepteur membranaire IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ . Dans le cas d'une molécule de fusion entre l'IL-15 et le domaine sushi du sIL-15R $\alpha$  contenant les 13 acides aminés (RLI), l'encombrement stérique initialement observé pourrait disparaître du fait d'un changement conformationnel dû à la présence d'un « linker » liant covalamment l'extrémité N-terminale de l'IL-15 à

l'extrémité C-terminale du sIL-15R $\alpha$ . Le RLI peut alors lier et activer à la fois le récepteur dimérique IL-15R $\beta/\gamma$  et le récepteur trimérique IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ . Le RLI induit alors un signal équivalent à celui de l'IL-15 seule dans un contexte  $\alpha/\beta/\gamma$  mais est 50 à 100 fois plus efficace que l'IL-15 seule dans un contexte  $\beta/\gamma$ .

## B. Introduction

L'IL-2 et IL-15 sont deux cytokines proches ayant des effets biologiques similaires *in vitro*. Cette redondance s'explique par le fait qu'elle possèdent des chaînes réceptrices transductrices communes, IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$  (Giri *et al.* 1995). Leur spécificité est conférée par leur chaîne  $\alpha$  privée. Le récepteur dimérique composé des chaînes IL-2/15R $\beta$  et  $\gamma_c$  possède une faible affinité pour l'IL-2 ou l'IL-15 et peut être activé par des concentrations en cytokine de l'ordre du nanomolaire. La présence de la chaîne privative  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$  ou IL-15R $\alpha$ ) confère une forte affinité aux récepteurs qui peuvent alors être activés par des concentrations de l'ordre du picomolaire (Anderson *et al.* 1995).

Contrairement à l'IL-2 qui permet l'expansion des cellules T activées, l'IL-15 est importante pour le développement des cellules NK, l'initiation de la division des cellules T et la survie des cellules T mémoire (Lodolce *et al.* 2001 ; Li *et al.* 2001). L'IL-15 peut également être exprimé de façon coordonnée avec l'IL-15R $\alpha$  par les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes et cellules dendritiques), et être présenté en *trans* aux cellules voisines comme les cellules NK ou les CD8<sup>+</sup> exprimant l'IL-15R $\beta/\gamma_c$  (Dubois *et al.* 2002). La *trans*présentation de l'IL-15 apparaît comme le mécanisme dominant pour l'action de l'IL-15 *in vivo* (Burket *et al.* 2003 ; Schluns *et al.* 2005) et joue un rôle dans l'immunosurveillance tumorale (Kobayashi *et al.* 2005).

L'IL-15R $\alpha$  possède en N-terminal un domaine « sushi » responsable de la liaison à la cytokine (Norman *et al.* 1991). Comme pour l'IL-2, une forme soluble de l'IL-15R $\alpha$  générée par coupure protéolytique de la forme membranaire impliquant une ou plusieurs métalloprotéase a été décrite (Mortier *et al.* 2004). Le récepteur soluble de l'IL-15 (sIL-15R $\alpha$ ) possède une forte affinité pour l'IL-15 et inhibe la prolifération induite par l'IL-15 sur des cellules exprimant les trois chaînes réceptrices. Le domaine sushi, quant à lui, lie également l'IL-15 avec une forte affinité et inhibe la liaison de la cytokine avec sa chaîne  $\alpha$  isolée mais est incapable de bloquer la prolifération médiée par le récepteur trimérique. Le

domaine sushi est également capable de *transpré*senter l'IL-15 et ainsi d'augmenter la liaison de l'IL-15 à son récepteur IL-15R $\beta/\gamma_c$  et l'activité biologique correspondante.

Le but initial de mon sujet de thèse était de comprendre les mécanismes moléculaires gouvernant la formation et l'activité du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$ . En particulier de comprendre le rôle joué par le domaine situé en C-terminal du domaine sushi formant une boucle flexible et pouvant influencer la formation et l'activité de cette molécule régulatrice importante et efficace (**Figure 22**).

## C. Résultats

Nos travaux ont effectivement conduit à l'identification d'une zone formée d'une boucle flexible impliquée dans la fonction antagoniste du sIL-15R $\alpha$ . Nous avons comparé quatre formes du sIL-15R $\alpha$  générées sous forme recombinante en baculovirus : la forme totale du récepteur soluble (sIL-15R $\alpha$ ), le domaine sushi seul (sIL-15R $\alpha$ -sushi), le domaine sushi allongé des treize premiers résidus codés par l'exon 3 (sIL-15R $\alpha$ -sushi+) et le sIL-15R $\alpha$  délété de l'exon 3 (sIL-15R $\Delta$ 3). Les quatre formes du sIL-15R $\alpha$  sont capables de lier l'IL-15 et d'inhiber la liaison de celle-ci à l'IL-15R $\alpha$  membranaire exprimé par les cellules TF-1 (lignée érythroleucémique). Nous avons étudié les paramètres thermodynamiques de la formation du complexe entre l'IL-15 et les différentes formes de sIL-15R $\alpha$  par résonance plasmonique de surface (Biacore). Nous avons ainsi pu montrer que le sIL-15R $\alpha$  et le sIL-15R $\alpha$ -sushi+ étaient beaucoup plus affins pour l'IL-15 que le sIL-15R $\alpha$ -sushi et le sIL-15R $\Delta$ 3 confirmant ce que nous avons pu observer par les expériences d'inhibition de la liaison de l'IL-15 à l'IL-15R $\alpha$  par les différentes formes de sIL-15R $\alpha$ . En effet, le sIL-15R $\alpha$  comme le sIL-15R $\alpha$ -sushi+ possède une constante d'affinité de l'ordre de 100 pM alors que le sIL-15R $\Delta$ 3 et le sIL-15R $\alpha$ -sushi de l'ordre de 1 et 2 nM respectivement. Ceci nous a permis de mettre en évidence que le domaine, codé par l'exon 3 du sIL-15R $\alpha$ , situé en C-terminal du domaine sushi, et plus particulièrement les 13 premiers résidus stabilisent le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  en réduisant sa constante de dissociation. En effet, le sIL-15R $\alpha$ -sushi+ possède une constante de dissociation de  $6.10^{-5} \text{ min}^{-1}$  contre  $1.10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour le sIL-15R $\alpha$ -sushi.

Nous avons ensuite utilisé des cellules kit225 (lignée érythroleucémique) exprimant le récepteur trimérique IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$  pour tester la capacité d'inhibition des différentes

formes de sIL-15R $\alpha$  dans la prolifération induite par l'IL-15. De la même manière que ce qui a été obtenu par les expériences d'inhibition de liaison, le sIL-15R $\alpha$  inhibe complètement la prolifération induite par l'IL-15 sur ces cellules avec une IC<sub>50</sub> de 18 pM. En revanche, le sIL-15R $\alpha$ -sushi n'a aucun effet sur la prolifération des kit225 même à une concentration de 100 nM. De façon surprenante, l'addition des 13 premiers résidus du domaine codée par l'exon 3 dans le sIL-15R $\alpha$ -sushi+ restore complètement le pouvoir inhibiteur du sIL-15R $\alpha$ . De plus, l'absence de l'exon 3 dans le sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3 réduit d'un facteur 30 la capacité inhibitrice du récepteur soluble. Grâce à la structure cristallographique du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  (Chirifu *et al.* 2007), nous avons pu identifié les résidus Pro67 et His71 du domaine codé par l'exon 3 comme interagissant avec l'IL-15 au sein du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$ -sushi+. Pour comprendre l'importance de ces résidus, deux mutants du sIL-15R $\alpha$  (sIL-15 $\alpha$ P67A et sIL-15R $\alpha$ H71A) ont été créés et testés comme inhibiteur de la prolifération induite par l'IL-15 sur les kit225. Bien que le sIL-15R $\alpha$ H71 montre une activité inhibitrice semblable à celle du sIL-15R $\alpha$ , le sIL-15R $\alpha$ P67A, quant à lui, a une capacité inhibitrice fortement réduite. Le sIL-15R $\alpha$ P67A possède des caractéristiques semblables à celles du sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3 (**Figure 23**).

Nous avons ensuite comparé les différentes formes du sIL-15R $\alpha$  dans leur capacité à augmenter la liaison de l'IL-15 sur le récepteur membranaire IL-15R $\beta$ / $\gamma$ c. Pour cela, nous avons étudié la liaison de l'IL-15 sur des Mo7e (lignée mégakaryocytaire), exprimant le récepteur IL-15R $\beta$ / $\gamma$ c, en l'absence et en présence des différentes formes de sIL-15R $\alpha$ . Toutes les formes de sIL-15R $\alpha$  sont capables d'augmenter la liaison de l'IL-15 à son récepteur dimérique IL-15R $\beta$ / $\gamma$ c ainsi que la prolifération induite par l'IL-15 sur ce même récepteur. Néanmoins, l'augmentation de la liaison de l'IL-15 est proportionnelle à l'affinité du récepteur pour la cytokine ainsi que l'augmentation de la prolifération résultante. En effet, le sIL-15R $\alpha$  et le sIL-15R $\alpha$ -sushi+ décale la courbe de prolifération induite par l'IL-15 sur les Mo7e d'un facteur 100 et la liaison d'un facteur 10 alors que le sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3 et le sIL-15R $\alpha$ -sushi ne permettent que des gains de 12 et 4 fois en prolifération et de 2 en liaison.

Enfin, nous avons montré que la molécule de fusion RLI est plus efficace que le mélange IL-15/sIL-15R $\alpha$ -sushi+ pour augmenter la prolifération des cellules exprimant le récepteur IL-15R $\beta$ / $\gamma$ c et est capable de lier le récepteur trimérique (**Figure 22**).

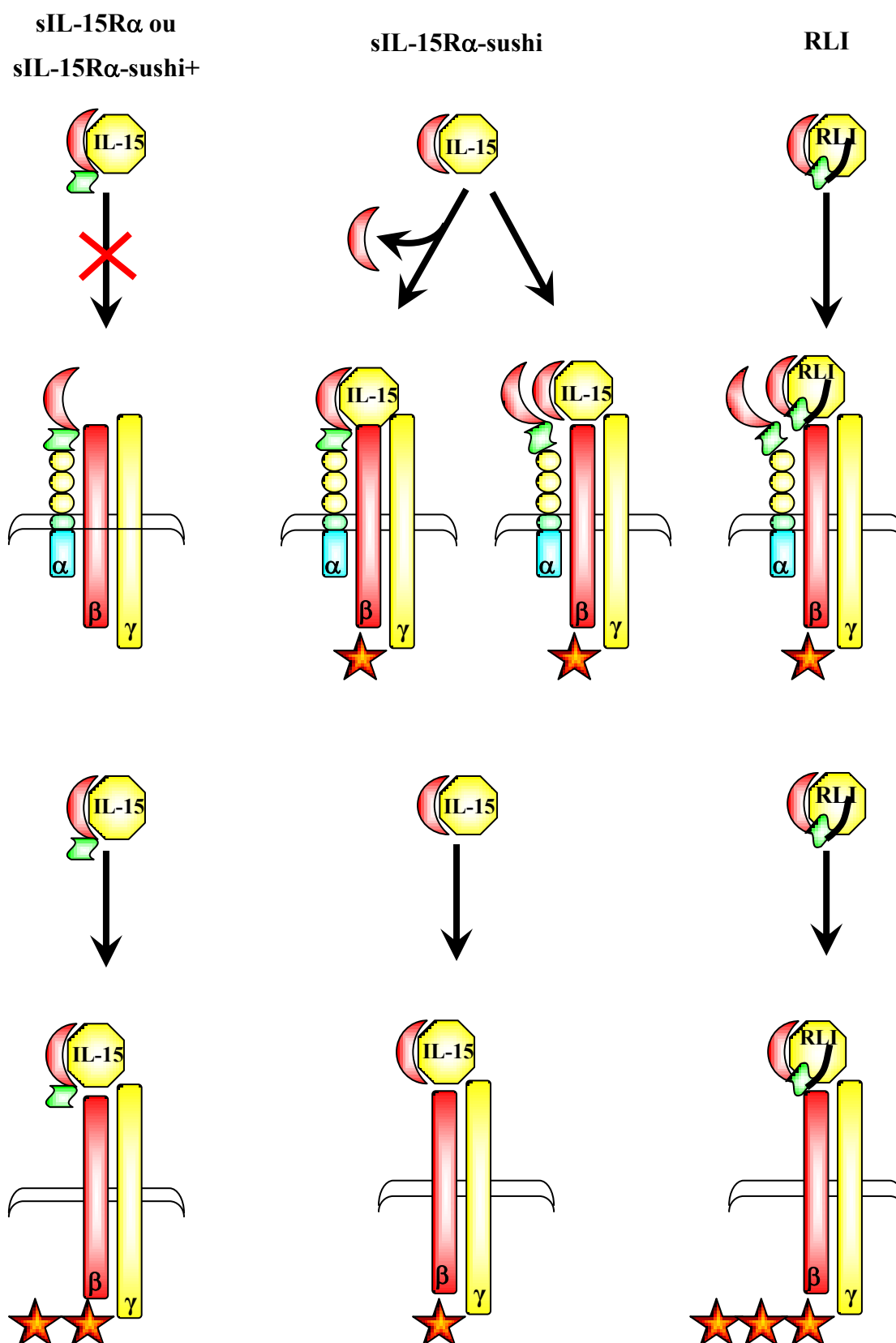
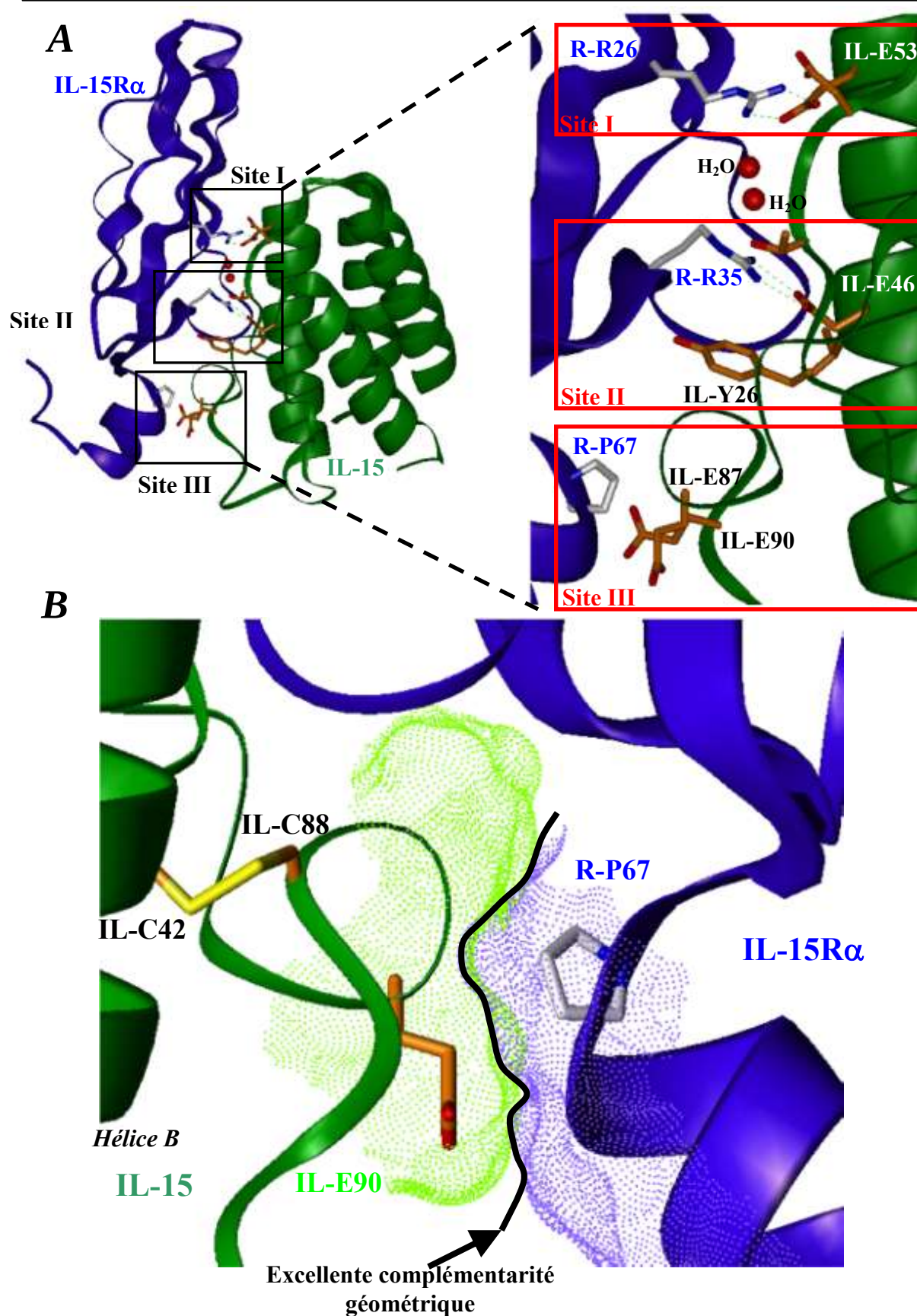


Figure 22 : Action des différentes formes de sIL-15Rα et du RLI





**Figure 23 : Interaction moléculaires entre l'IL-15 et le sIL-15R $\alpha$**

A. Représentation du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$ . B. Site III du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$ .

## **D.Article I**

### **The Exon-3-Encoded Domain of IL-15R $\alpha$ Contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15R $\alpha$**

**(BOUCHAUD G. *et al.*, (2008) *J. Mol. Biol.* 382 : 1-12)**

**Author Contributions** : Project planning was performed by G.B and Y.J., experimental work by G.B for *in vitro* analysis, V.S, H.P and Y.B. for production and purification of recombinant proteins, A.Q. for molecular modelisation, data analysis by G.B and manuscript composition by G.B., E.M., A.P., and Y.J.



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

Grégory Bouchaud<sup>1,2\*</sup>, Laure Garrigue-Antar<sup>1,2</sup>, Véronique Solé<sup>1,2</sup>,  
Agnès Quémener<sup>1,2</sup>, Yvan Boublik<sup>3</sup>, Erwan Mortier<sup>1,2</sup>,  
Harmonie Perdreau<sup>1,2</sup>, Yannick Jacques<sup>1,2</sup> and Ariane Plet<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Université de Nantes, IFR26, Nantes, France

<sup>3</sup>CNRS, 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 $\alpha$  corresponding to the full-length ectodomain of IL-15R $\alpha$  behaved as a potent antagonist of IL-15 action through IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ , whereas a recombinant soluble IL-15R $\alpha$  sushi domain did not, but instead acted as an agonist of IL-15 action through IL-15R $\beta$ / $\gamma$ . 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 $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ) 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 $\alpha$  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 $\alpha$  are agonists on IL-15R $\beta$ / $\gamma$ , 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 $\alpha$  in the context of IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  is due to the 13-aa peptide that creates a sterical constraint impeding the binding of the sIL-15R $\alpha$ -IL-15 complex to the membrane-anchored IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ . In the frame of the soluble IL-15R $\alpha$  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 $\alpha$  sushi domain-IL-15 fusion protein is therefore able to bind and activate both the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  and the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptors.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Edited by J. Karn

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

\*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 $\alpha$ , soluble IL-15R $\alpha$ ; aa, amino acid; sIL-15R $\alpha$ -sushi, soluble IL-15R $\alpha$  sushi domain; SPR, surface plasmon resonance; rIL-15, human recombinant IL-15; RLI, IL-15-sIL-15R $\alpha$ -sushi fusion protein; FCS, fetal calf serum.

### 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*.<sup>1</sup> Both cytokines belong to the four- $\alpha$ -helix-bundle family, and their membrane receptors share two subunits (IL-2/15R $\beta$  and IL-2/15R $\gamma$  chains) responsible for signal transduction.<sup>2</sup> The IL-15R $\beta$ / $\gamma$  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



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

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.<sup>4-6</sup> A novel mechanism of IL-15 action is that of transpresentation, in which IL-15 and IL-15R   are coordinately expressed by antigen-presenting cells (monocytes and dendritic cells), and IL-15 bound to IL-15R   is presented *trans* to neighboring NK or CD8<sup>+</sup> T cells expressing only the IL-15R  /   receptor.<sup>7</sup> 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*<sup>8,9</sup> and appears to play a major role in tumor immunosurveillance.<sup>10</sup>

The IL-15R   and IL-2R   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   and two in IL-2R  )—that are also found in complement or adhesion molecules.<sup>11</sup> In both cases, these sushi domains have been shown to bear most of the structural elements responsible for cytokine binding. Whereas IL-2R   alone is a low-affinity receptor for IL-2 ( $K_d = 10$  nM), IL-15R   binds IL-15 with high affinity ( $K_d = 100$  pM). The shedding of a soluble IL-2R   by proteolysis is a natural mechanism that participates in the down-regulation of lymphocyte activation. IL-2R   is cleaved by Der p1, a major mite allergen, thereby inhibiting Th1 cells and favoring an allergic environment,<sup>12</sup> and is also cleaved by tumor-derived metalloproteinases, resulting in suppression of the proliferation of cancer-encountered T cells.<sup>13</sup> The soluble IL-2R   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   can be similarly released from IL-15R  <sup>+</sup> cells by a shedding process involving matrix metalloproteinases.<sup>14</sup> In contrast to soluble IL-2R  , soluble IL-15R   (sIL-15R  ) receptor was able to bind IL-15 with high affinity and efficiently blocked proliferation driven through the high-affinity IL-15R  /  /   signaling receptor. A similar shedding of the mouse IL-15R   has been reported.<sup>15</sup> In subsequent studies, we showed that a recombinant sIL-15R   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  —was unable to block the proliferation of IL-15 mediated by the cell surface IL-15R  /  /  .<sup>16</sup> Unexpectedly, this IL-15R  -sushi isoform was also found

to enhance the binding of IL-15 to the intermediate-affinity IL-15R  /   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   receptors.

## Results

### The exon-3-encoded domain of sIL-15R   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   chain

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

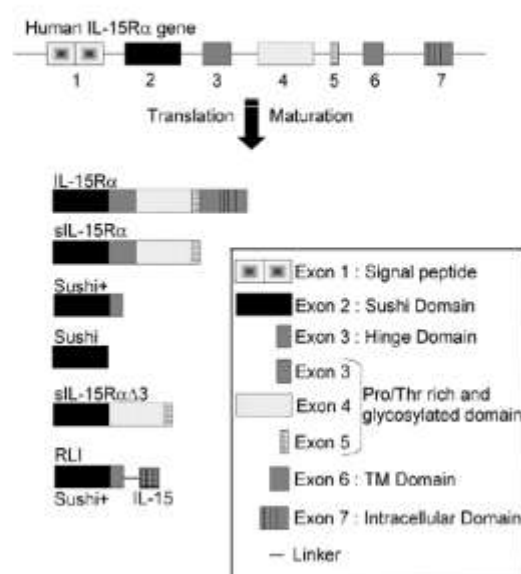
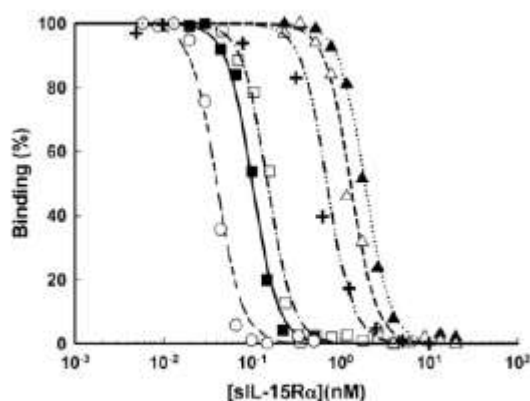


Fig. 1. Schematic diagram of the human IL-15R   gene and the IL-15R   variants used.



**Fig. 2.** Competition of the sIL-15R $\alpha$  variants with IL-15 binding to cell surface IL-15R $\alpha$ . TF-1 cells were equilibrated with a fixed concentration of radioiodinated human IL-15 (100 pM) and increasing concentrations of IL-15 (O), sIL-15R $\alpha$  (■), sIL-15R $\alpha$ -sushi (▲), sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> (□), sIL-15R $\alpha$ Δ3 (Δ), and sIL-15R $\alpha$ 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 $\alpha$  were first compared for their ability to compete with radioiodinated IL-15 binding (used at a fixed concentration of 100 pM) to IL-15R $\alpha$  expressed by the human cell line TF-1, which also expresses the  $\gamma$  common chain, but not the IL-15R $\beta$  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 $\alpha$  (IC<sub>50</sub> of 1900 pM and 100 pM, respectively) (Table 1A). Addition of 13-aa peptide at the C-terminus of the sushi domain (sushi<sup>+</sup>) markedly increased its inhibitory potency to reach an IC<sub>50</sub> value (150 pM) close to that of sIL-15R $\alpha$ . Conversely, absence of the exon-3-encoded domain (sIL-15R $\alpha$ Δ3) resulted in a 13-fold reduction in inhibitory efficacy (IC<sub>50</sub> = 1300 pM).

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

nance (SPR) technology] (Fig. 3, Table 1A). As expected, sIL-15R $\alpha$  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 $\alpha$  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<sup>+</sup>) resulted in binding parameters (Fig. 3) similar to those of sIL-15R $\alpha$  ( $k_{on} = 5.85 \times 10^{-7} \text{ pM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{off} = 5.99 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ;  $K_d = 100 \text{ pM}$ ), and the absence in sIL-15R $\alpha$  of the exon-3-encoded domain (sIL-15R $\alpha$ Δ3) 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 $\alpha$ regulates its antagonistic effect on IL-15-driven cell proliferation through the high-affinity IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ receptor

We previously reported that the full-length sIL-15R $\alpha$  was an inhibitor of IL-15-induced proliferation through the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor,<sup>14</sup> and we subsequently showed that the sushi domain did not demonstrate such inhibitory effects.<sup>16</sup> In order to further evaluate this difference, the four sIL-15R $\alpha$  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 $\alpha$ , IL-15R $\beta$ , and IL-15R $\gamma$  chains. In order to avoid any participation of low-affinity IL-15R $\beta$ / $\gamma$  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 $\beta$  chain and was previously shown to specifically inhibit IL-15 activation of the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  receptor without affecting the function of the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor.<sup>18</sup> Under these conditions, Kit225 cells proliferate in response to low picomolar concentrations of IL-15 (EC<sub>50</sub> in the range of 10 pM) (Fig. 4c), reflecting activation of their IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptors.

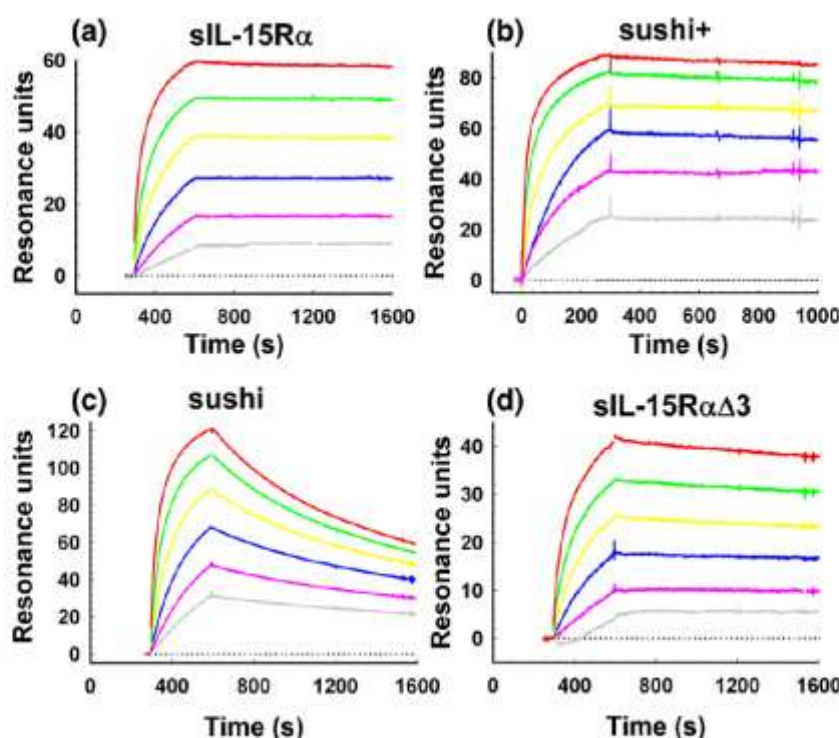
**Table 1.** Binding properties of human IL-15

| A. To the IL-15R $\alpha$ variants as measured by competitive experiment (IB) or SPR (BIAcore) |                     |                                                       |                                       | B. To IL-15R $\beta/\gamma$ in the absence or in the presence of sIL-15R $\alpha$ variants |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| IB                                                                                             |                     | BIAcore                                               |                                       | Binding                                                                                    |
| IC <sub>50</sub> (pM)                                                                          | K <sub>d</sub> (pM) | k <sub>on</sub> (pM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) | k <sub>off</sub> (min <sup>-1</sup> ) | K <sub>d</sub> (pM)                                                                        |
| IL-15                                                                                          | 25                  | NA                                                    | NA                                    | 11,000                                                                                     |
| sIL-15R $\alpha$                                                                               | 100                 | 114                                                   | 1.37 × 10 <sup>-7</sup>               | 1.56 × 10 <sup>-5</sup>                                                                    |
| sushi <sup>+</sup>                                                                             | 150                 | 102                                                   | 5.85 × 10 <sup>-7</sup>               | 5.99 × 10 <sup>-5</sup>                                                                    |
| sushi                                                                                          | 1900                | 9230                                                  | 1.30 × 10 <sup>-7</sup>               | 1.20 × 10 <sup>-3</sup>                                                                    |
| sIL-15R $\alpha$ Δ3                                                                            | 1300                | 850                                                   | 1.47 × 10 <sup>-7</sup>               | 1.25 × 10 <sup>-4</sup>                                                                    |

NA: not applicable.

NA: not applicable.





**Fig. 3.** Binding affinities of the sIL-15R $\alpha$  variants for IL-15. SPR sensorgrams of binding to immobilized sIL-15R $\alpha$  (a), sushi<sup>+</sup> (b), sushi (c), or sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3 (d) with increasing concentrations of rIL-15 (3.1 nM, 6.2 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, and 100 nM).

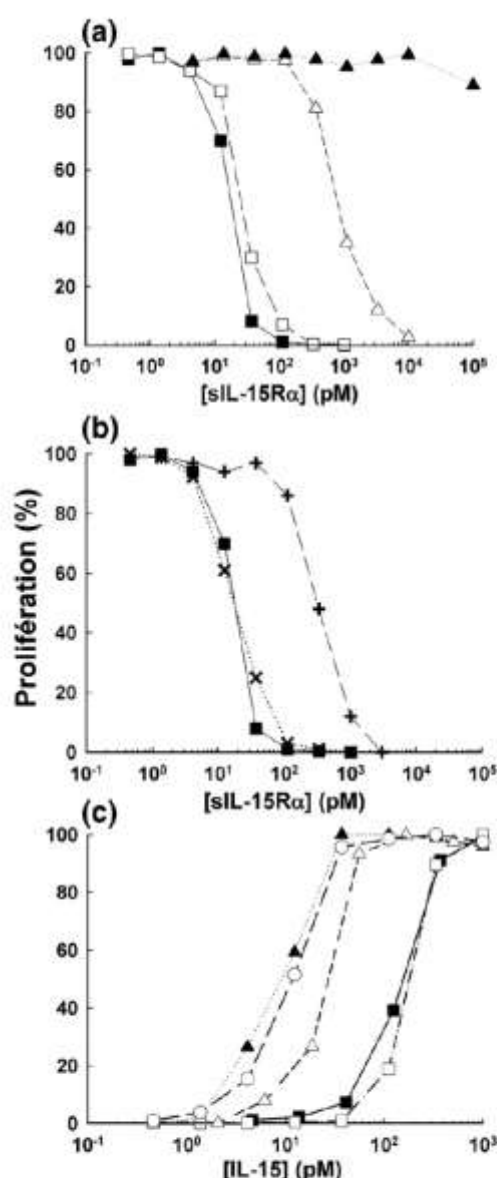
As shown in Fig. 4a, Kit225 proliferation induced by 10 pM human recombinant IL-15 (rIL-15) was inhibited in a dose-dependent manner by sIL-15R $\alpha$  with an IC<sub>50</sub> of 18 pM. In contrast, the sIL-15R $\alpha$ -sushi protein was unable to affect this proliferation, even at concentrations as high as 100 nM. Remarkably, addition to sIL-15R $\alpha$ -sushi of the 13-aa peptide (sushi<sup>+</sup>) completely restored inhibitory capacity. Furthermore, absence in sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3 of the exon-3-encoded sequence strongly reduced (30-fold) inhibitory potency (IC<sub>50</sub> of 745 pM) (Table 2A). In Fig. 4c are shown the effects of low and fixed (15 pM) concentrations of the different sIL-15R $\alpha$  forms on the IL-15 dose-response curve of Kit225 cells. Again, sIL-15R $\alpha$  and sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> markedly shifted the dose-response curve towards higher IL-15 concentrations; sIL-15R $\alpha$ -sushi had no effect, while sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3 was less potent than sIL-15R $\alpha$ . Similar results were obtained with the CTLL-2 murine cell line that expresses endogenous murine IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$ , and IL-15R $\gamma$  chains, and with the 32D $\beta$ R cell line that expresses endogenous murine IL-15R $\gamma$  chain and transfected human IL-15R $\alpha$  and IL-15R $\beta$  chains (data not shown).

The X-ray structure of the complex of IL-15 with a recombinant sIL-15R $\alpha$  that contains the sushi domain and a 20-aa extension has been recently established.<sup>19</sup> 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 $\alpha$  and tested the activity of the mutants on IL-15-induced proliferation of Kit225 (Fig. 4b). While sIL-15R $\alpha$ H71A showed an inhibitory activity similar to wild-type sIL-15R $\alpha$ , sIL-15R $\alpha$ P67A had a strongly reduced inhibitory potency (IC<sub>50</sub>=300 pM), and its effect was similar to that of sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 3 (Fig. 4a). The P67A mutation was also introduced in the context of the full-length sIL-15R $\alpha$ . In the IL-15 competition assay in TF-1 cells (Fig. 2), the P67A mutation markedly reduced the inhibitory potency of sIL-15R $\alpha$ . Its effect was similar to the deletion of exon 3, in correlation with the proliferation data.

#### **All sIL-15R $\alpha$ species increase IL-15 induction of cell proliferation through the low-affinity IL-15R $\beta$ / $\gamma$ receptor with respective efficiencies that correlate with enhancement of IL-15 binding to IL-15R $\beta$ / $\gamma$**

We next compared the effects of the different sIL-15R $\alpha$  forms on IL-15-driven proliferation through the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  by using the Mo7e cell line that expresses human IL-15R $\beta$  and IL-15R $\gamma$ , but not IL-15R $\alpha$ . Mo7e cells proliferated in response to IL-15 with an EC<sub>50</sub> of 4 nM (Fig. 5b)—a value in agreement with the activation of intermediate-affinity IL-15R $\beta$ / $\gamma$  receptors. Addition of a fixed concentration (10 nM) of any of the four sIL-15R $\alpha$  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 $\alpha$  variants on IL-15-induced cell proliferation through the cell surface high-affinity IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ . Cell proliferation was evaluated by incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine. (a) Kit225 cells were incubated with a fixed concentration of IL-15 (10 pM) and increasing concentrations of sIL-15R $\alpha$  (■), sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> (□), sIL-15R $\alpha$ -sushi (▲), or sIL-15R $\alpha$ Δ3 (△). 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 $\alpha$  (■), sIL-15R $\alpha$ H71A (×), or sIL-15R $\alpha$ 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 $\alpha$  (■), sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> (□), sIL-15R $\alpha$ -sushi (▲), or sIL-15R $\alpha$ Δ3 (△).

Full-length sIL-15R $\alpha$  and sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> were the most potent, with similar effects (about 100-fold shifts), whereas sIL-15R $\alpha$ -sushi and sIL-15R $\alpha$ Δ3

had lower effects (4- to 12-fold shifts). The IL-15 dose-response curves observed in the presence of sIL-15R $\alpha$  or sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> are very close to the ones depicting IL-15 action on IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  cells (Fig. 4c). When comparing the dose-response curves of each sIL-15R $\alpha$  form at a fixed nonsaturating concentration of IL-15 (1 nM) (Fig. 5a), a similar order of potencies was observed, with sIL-15R $\alpha$  and sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> being the most potent (IC<sub>50</sub> of 12 pM and 21 pM), and with sIL-15R $\alpha$ -sushi and sIL-15R $\alpha$ Δ3 displaying lower potencies (IC<sub>50</sub> of 170 pM and 70 pM) (Table 2B).

We also analyzed the effects of the sIL-15R $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  and sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> (used at saturating concentrations of 50 nM) increased IL-15 affinity by 10-fold, whereas sIL-15R $\alpha$ -sushi and sIL-15R $\alpha$ Δ3 increased this affinity by only 2-fold. Together, these experiments indicate that the IL-15-potentiating (agonistic) effects of the different sIL-15R $\alpha$  species on cell proliferation correlate with their enhancing effects on IL-15 binding to IL-15R $\beta$ / $\gamma$ .

**Unlike the complex of sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> and IL-15, the sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>-IL-15 fusion protein is able to bind with high affinity and to activate the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor**

We previously engineered a fusion protein [soluble IL-15R $\alpha$  sushi domain-IL-15 fusion protein (RLI)] between sIL-15R $\alpha$  and IL-15.<sup>16</sup> This protein contains the exon-3-encoded 13-aa peptide adjacent to the C-terminus of sIL-15R $\alpha$ -sushi and thus corresponds to sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> linked to IL-15. We therefore anticipated that this fusion protein would behave like the complex sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>-IL-15. In Fig. 6 are compared the properties of an equimolar association of sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> and IL-15 (sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>-IL-15 complex) with those of RLI. On IL-15R $\beta$ / $\gamma$  expressed by Mo7e cells (Fig. 6a), RLI and the sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>-IL-15 complex, as expected, displayed similar efficiencies (EC<sub>50</sub> of 20 pM and 70 pM, respectively) in enhancing proliferative activity and were far more efficient than IL-15 alone (EC<sub>50</sub> = 4000 pM). They were further compared in the context of activation of the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor (Kit225 in the presence of the A41 monoclonal antibody) (Fig. 6b). The sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>-IL-15 complex had a 10-fold reduced activity compared to IL-15 alone, in agreement with the inhibitory effect of sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> on IL-15 activity (Fig. 4a). In contrast and unexpectedly, the RLI fusion protein, despite the fact that it contains sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> covalently attached to IL-15, was as efficient as IL-15 in inducing cell proliferation through IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  (EC<sub>50</sub> = 20 pM).



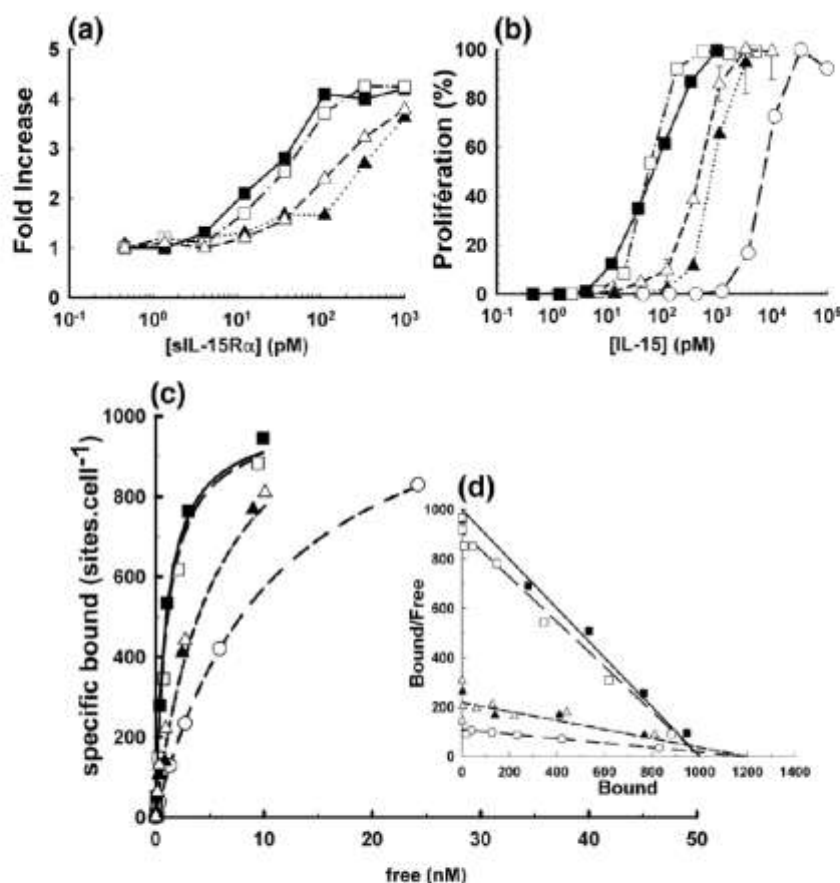
**Table 2.** Biological properties of the sIL-15R $\alpha$  variants on cell proliferation

| IL-15 | Receptor                    | A. Inhibitory effect IC <sub>50</sub> (pM) <sup>a</sup> | B. Enhancing effect EC <sub>50</sub> (pM) <sup>b</sup> |
|-------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| +     | —                           |                                                         |                                                        |
| +     | sIL-15R $\alpha$            | 18                                                      | 12                                                     |
| +     | sushi <sup>+</sup>          | 24                                                      | 21                                                     |
| +     | sushi                       | >100,000                                                | 170                                                    |
| +     | sIL-15R $\alpha$ $\Delta$ 3 | 745                                                     | 70                                                     |

<sup>a</sup> The inhibitory effect on the cell (Kit225) bearing the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor was measured at a concentration of 10 pM IL-15.  
<sup>b</sup> The enhancing effect on the cell (Mo7e) bearing the  $\beta$ / $\gamma$  receptor was measured at a concentration of 1 nM IL-15.

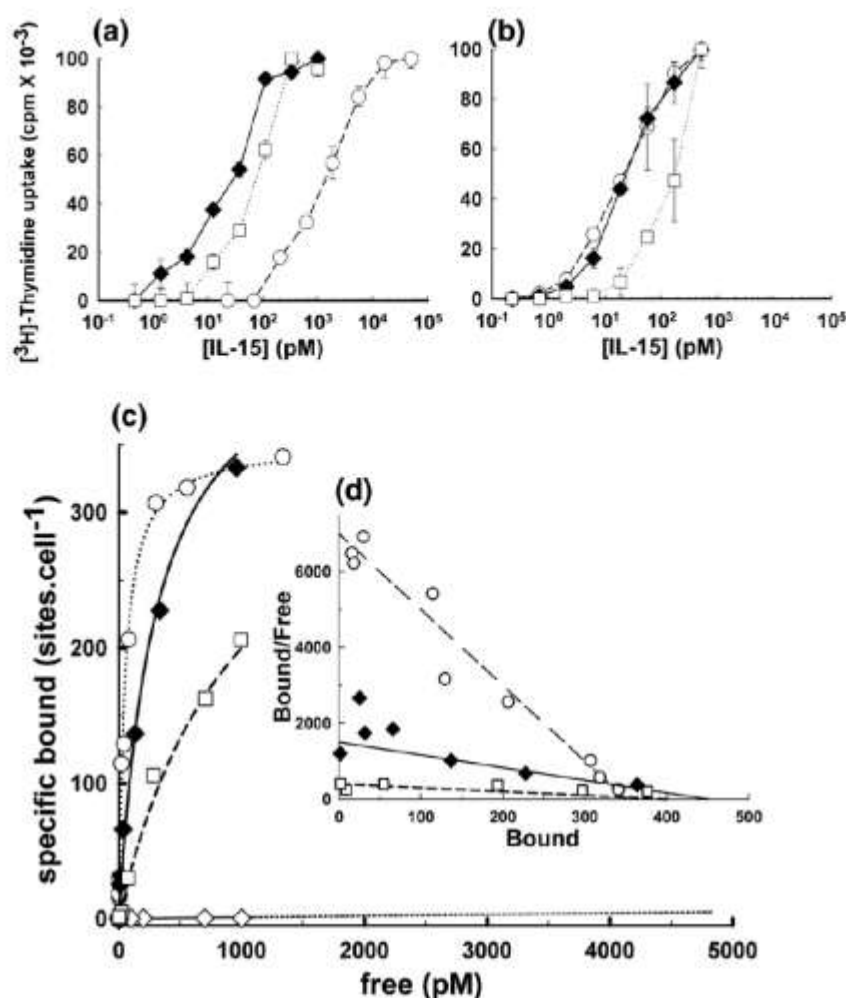
We further compared the binding of IL-15, RLI, and the sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>-IL-15 complex to the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor on Kit225 (Fig. 6c). IL-15 alone bound with high affinity ( $K_d$ =30 pM;  $B_{max}$ =

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



**Fig. 5.** Effects of sIL-15R $\alpha$  variants on binding and cell proliferation through the cell surface low-affinity IL-15R $\beta$ / $\gamma$ . Cell proliferation was evaluated by incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine. (a) Mo7e cells were cultured with increasing concentrations of sIL-15R $\alpha$  (■), sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> (□), sIL-15R $\alpha$ -sushi (▲), or sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 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 $\alpha$  (■), sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> (□), sIL-15R $\alpha$ -sushi (▲), or sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 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 $\alpha$  (■), sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> (□), sIL-15R $\alpha$ -sushi (▲), or sIL-15R $\alpha$  $\Delta$ 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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> on binding and cell proliferation through cell surface IL-15R $\beta/\gamma$  and IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ . Cell proliferation was evaluated by incorporation of  $[^3\text{H}]$  thymidine. (a) Mo7e or (b) Kit225 cells were incubated with increasing concentrations of IL-15 (O), RLI ( $\blacklozenge$ ), or IL-15-sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> 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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> ( $\square$ ), or equimolar mixture of IL-15 and radioiodinated sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> ( $\diamond$ ). 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;  $B_{\text{max}}=450$  sites/cell).

## Discussion

Former studies showed the indispensable role of the exon-2-encoded sushi domain of IL-15R $\alpha$  for IL-15 binding.<sup>16,17</sup> 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 $\alpha$  that were all produced in the same expression system (baculovirus in insect cells) and purified

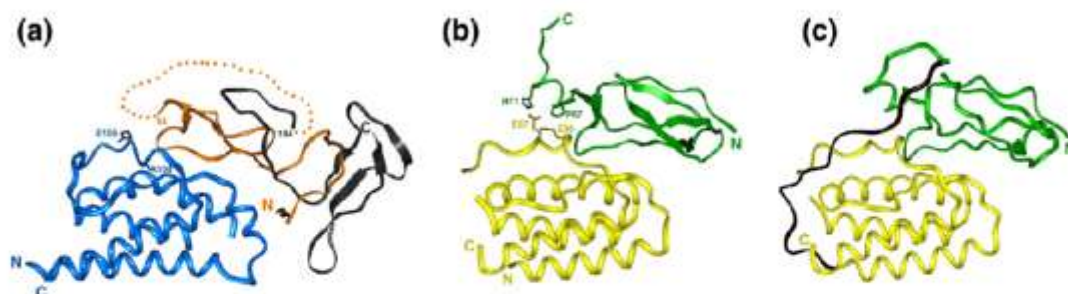
with the same procedure, therefore ruling out any differences that could be generated from the origin of the proteins or their purification procedures, as suggested in our previous study.<sup>16</sup> As judged by direct binding to IL-15 (SPR experiments), as well as by competition with IL-15 binding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

IL-15R $\alpha$  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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> participates in the bottom interface, mainly by a hydrogen bond between His71 of IL-15R $\alpha$  and Glu87 of IL-15, and by van der Waals contacts between Pro67 of IL-15R $\alpha$  and Glu87, Glu89, and Glu90 of IL-15.<sup>19</sup> 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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> 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 $\alpha$ -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 $\alpha$  and IL-15.

In IL-2R $\alpha$ , the homolog of the exon-3-encoded region of IL-15R $\alpha$  that contains the 13-aa peptide is the segment linking the two sushi domains of IL-2R $\alpha$ . Resolution of the IL-2-IL-2R $\alpha$  complex structure revealed that the folding topology of IL-2R $\alpha$  exhibits swapping of  $\beta$  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 $\alpha$  adjacent to the C-terminal of the second sushi domain does not contribute to IL-2 binding.<sup>21</sup> Therefore, the contribution of the 13-aa peptide of IL-15R $\alpha$  in the IL-15 binding shown here is unlikely to have an equivalent in the context of the IL-2-IL-2R $\alpha$  interaction. This could be one element explaining the difference of affinity between IL-2R $\alpha$  binding to IL-2 ( $K_d$  = 10–30 nM) and IL-15R $\alpha$  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 $\alpha$  interactions.<sup>22</sup> Indeed, the  $k_{off}$  of the IL-2-IL-2R $\alpha$  interaction resembles that of the interaction of IL-15 with the IL-15R $\alpha$ -sushi domain, lacking the 13-aa peptide encoded by exon 3, as determined here and previously.<sup>16</sup>

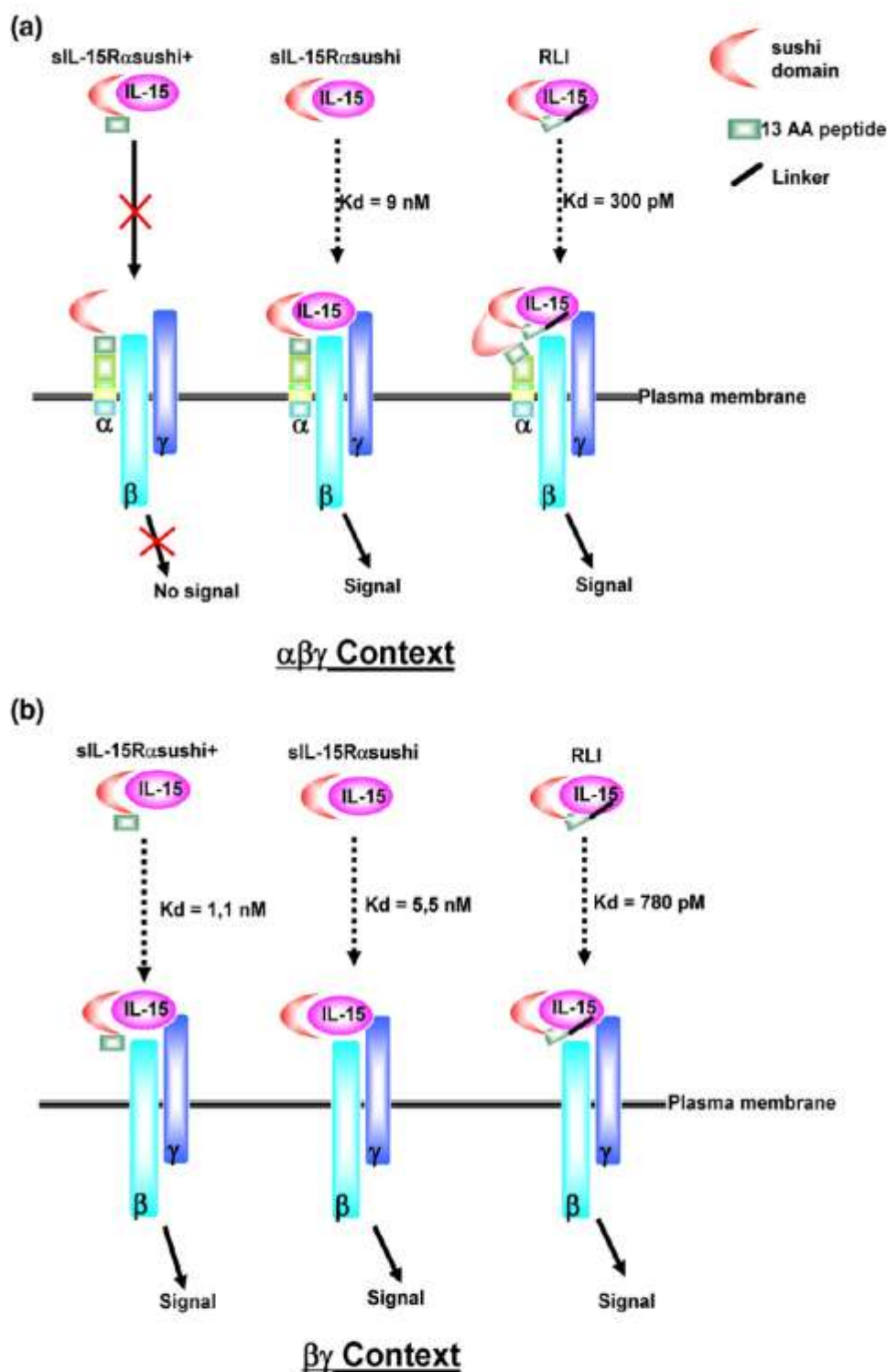
The release of sIL-15R $\alpha$  species has been shown to be a natural mechanism that might play a role in the regulation of IL-15 action either by antagonizing the action of IL-15 or, on the contrary, by enhancing the efficiency of IL-15 action.<sup>14,23</sup> In a previous study, we showed that human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

A recent study showed that a mouse sIL-15R $\alpha$  form containing the sushi domain plus five residues at its C-terminus was as effective as the corresponding mouse full-length sIL-15R $\alpha$  form in enhancing the biological activity of mouse IL-15 in the context of IL-15R $\beta/\gamma$ .<sup>23</sup> This mouse sIL-15R $\alpha$  form contains a proline residue (Pro68) equivalent to Pro67 in human sIL-15R $\alpha$  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 $\alpha$ -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 $\alpha$ , whereas the His71 residue does not.



**Fig. 7.** Structural comparison of IL-2-IL-2R $\alpha$  and IL-15-IL-15R $\alpha$  complexes and RLI. Ribbon diagram of the complex of IL-2 (a) or IL-15 (b) with their respective receptor  $\alpha$  chain (Protein Data Bank accession codes 1z92 and 2z3q, respectively), showing the side chains of Pro67 (P67) and His71 (H71) residues of IL-15R $\alpha$  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 $\alpha$ ; yellow, IL-15; green, IL-15R $\alpha$ ; 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 $\alpha$  variants. (a) In the context of IL-15R $\alpha$ /β/γ, IL-15 binding and signaling were inhibited by sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>, as well as by sIL-15R $\alpha$ , but not by sIL-15R $\alpha$ -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-15Rβ/γ, all sIL-15R $\alpha$  variants-IL-15 complexes activate the IL-15Rβ/γ receptor more efficiently than IL-15 alone. This agonistic effect is more efficient with sIL-15R $\alpha$  and sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> than with sIL-15R $\alpha$ Δ3 and sIL-15R $\alpha$ -sushi. RLI fusion protein is as efficient as IL-15-sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>.

We and others previously showed that a naturally produced sIL-15R $\alpha$  was a potent antagonist of IL-15-induced cell proliferation mediated by the IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor.<sup>14,15</sup> 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 $\alpha$ -sushi domain and, among these amino acids, that Pro67 appears to play a major role. Indeed, whereas sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> was as effective as full-length sIL-15R $\alpha$  in inhibiting IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -driven cell proliferation, sIL-15R $\alpha$ -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 $\alpha$ , 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 $\alpha$ -sushi, but not a complex of IL-15 with sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>. Thus, the 13-aa peptide adjacent to the C-terminus of IL-15R $\alpha$ -sushi appears to create a steric constraint impeding sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>-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 $\alpha$  chain, given the fact that the IL-15-sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> complex can bind to and activate the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  receptor.

Also much less active than full-length sIL-15R $\alpha$  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 steric 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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> 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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> 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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> complex<sup>24</sup> because of the nonavailability of the crystal structure at that time. Now, with the recent crystal structure,<sup>19</sup> 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 $\alpha$ -sushi<sup>+</sup> 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*<sup>16</sup>

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

Naturally produced full-length sIL-15R $\alpha$  that behaves as IL-15 antagonist has been described in mice and humans.<sup>14,15</sup> Soluble sIL-15R $\alpha$  sushi isoforms that behave as agonists are also generated in mouse.<sup>23</sup> Additional soluble isoforms can also potentially be cleaved from membrane IL-15R $\alpha$  isoforms lacking exon-3- and/or exon-4-encoded domains.<sup>14</sup> 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 $\beta$ / $\gamma$ . This finding is important for our understanding of how the balance between these different sIL-15R $\alpha$  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 line<sup>26</sup> was cultured in the same medium with 10 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. The Kit225 T lymphoma human cell line<sup>27</sup> was cultured in RPMI 1640 medium containing 6% FCS, 2 mM glutamine, and 10 ng/ml human rIL-2 (Chiron, Emeryville, CA).

### sIL-15R $\alpha$ , sIL-15R $\alpha$ -sushi<sup>+</sup>, sIL-15R $\alpha$ -sushi, and sIL-15R $\alpha$ $\Delta$ 3

Plasmids corresponding to the natural extracellular forms of IL-15R $\alpha$  (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'-CTAGAGCGGCGCTTACACAGTGGTGTGCGCTGT. A plasmid corresponding to the shorter forms of IL-15R $\alpha$  (pFB sushi and pFB sushi<sup>+</sup>) was generated by using the already mentioned sense and antisense primers (5'-CTAGAGCGGCGCTCAGTCTCTAATGCATTGAG and 5'-CTAGAGCGGCGCTCAGGGTGGCGCTGGCC-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 $\alpha$  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  $\mu$ 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 Vivaspinn (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 $\alpha$  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.<sup>16</sup> 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 $\alpha$  on these responses were measured by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation essentially as described,<sup>26</sup> in the presence of anti-IL-15R $\beta$  A41 antibody (66 nM) for Kit225.

### Binding assays

rIL-15, sIL-15R $\alpha$ -sushi\*, and RLI were radiolabeled with <sup>125</sup>I-labeled iodine (with specific radioactivity of approximately 2000 cpm/fmol) using a chloramine T method.<sup>29</sup> To measure IL-15 binding to IL-15R $\beta$ / $\gamma$  on Mo7e, and RLI binding to IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  on Kit225, or to IL-15R $\alpha$  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 10<sup>6</sup> cells/well in 50  $\mu$ 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 $\beta$  A41 antibody (66 nM) for Kit225 cells, supplemented with or without a fixed concentration of sIL-15R $\alpha$  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 $\alpha$ , TF-1 cells were incubated with a fixed concentration of iodinated rIL-15 and increasing concentrations of different forms of sIL-15R $\alpha$ .

### Molecular modeling of RLI

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

Data Bank code 1z92) and using the Biopolymer module of InsightII to insert the linker peptide (NH<sub>2</sub>-GGSGGGGSGGGSGGGSLQ-COOH) between the C-terminus of IL-15R $\alpha$ -sushi\* and the N-terminus of IL-15. The fused molecule was then energy-minimized using Discover module, Cif91 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.<sup>30</sup> 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 15Ralpha signals are required for bystander proliferation. *J. Exp. Med.* **194**, 1187–1194.
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-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  alpha 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 alpha expression on CD8<sup>+</sup> 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., Saffig, P. *et al.* (2004). Natural soluble interleukin-15R  alpha 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 alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15  IL-15R alpha fusion proteins. *J. Biol. Chem.* **281**, 1612-1619.
17. Dubois, S., Magrangeas, F., Lehours, P., Raher, 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., Raher, 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  alpha 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  alpha 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.

## II. Le système IL-15 dans la maladie de Crohn

### A. Résumé

Les anti-TNFs comme l'infliximab (Rémicade®) utilisés en thérapie dans la maladie de Crohn se fixent sur le TNF $\alpha$  membranaire avec une forte affinité et de façon spécifique. Cette fixation initie une voie de signalisation menant, selon les anti-TNFs utilisés, à différents effets sur la sécrétion des cytokines et de leurs récepteurs, expliquant, en partie, les différences d'efficacité de ces antagonistes. Nous avons donc étudié l'effet de l'infliximab sur la sécrétion d'IL-15, de sIL-15R $\alpha$  et de complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  ainsi que l'expression d'IL-15R $\alpha$  chez des patients atteints de maladie de Crohn (40 patients et 37 sujets sains). Les taux d'IL-15, de sIL-15R $\alpha$  et de complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  sérique ont été déterminés par RIA et le TNF par essais biologiques. Après traitement par l'infliximab, 32 patients ont été considérés comme répondeurs au traitement et 8 comme non répondeurs. La classification s'est faite selon une diminution du CDAI (Crohn Disease Activity Index) de plus de 150 points et une fermeture des fistules. Chez les patients répondeurs, avant tout traitement, le taux d'IL-15 sérique est beaucoup plus élevé que chez les non répondeurs ou les sujets sains et diminue au cours du traitement. En revanche, chez les non répondeurs le taux d'IL-15 sérique est très faible et ne varie pas au cours du traitement. Les taux de sIL-15R $\alpha$  et de complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  sérique sont plus élevés chez les patients que chez les sujets sains et augmentent après traitement par l'infliximab chez les répondeurs. Le dosage du TNF dans le sérum de ces patients nous révèle que celui-ci est plus élevé chez les patients que chez les sujets sains. Mais il n'y a pas de différences entre les répondeurs et les non répondeurs avant infusion d'infliximab et on observe une diminution du TNF uniquement chez les répondeurs. *In situ*, les patients atteints de maladie de Crohn surexpriment l'IL-15R $\alpha$  au niveau de la membrane des cellules épithéliales intestinales. *In vitro*, l'infliximab induit la libération de sIL-15R $\alpha$  dans le surnageant de culture des lignées HT-29 et Caco2. Cet effet est augmenté après stimulation des cellules par l'IL-1 $\beta$  ou d'IFN $\gamma$ . Aucune sécrétion n'est observée après stimulation par l'ethanercept (Enbrel®).

## B. Introduction

Les thérapies basées sur la neutralisation de cytokines pro inflammatoires sont généralement utilisées pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin. Les anticorps monoclonaux anti-TNF $\alpha$  sont les plus efficaces et les plus utilisés. L'infliximab (IFX) fait partie de ces anticorps et lie le TNF $\alpha$  soluble et membranaire avec une forte affinité et de façon spécifique. Bien qu'il soit efficace dans le traitement de la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, son action anti-inflammatoire n'est pas complètement élucidée. Les anti-TNFs neutralisent le TNF $\alpha$  soluble et l'interaction avec ses récepteurs mais la différence d'efficacité des anticorps suggère que cette neutralisation n'est pas le mécanisme majeur impliqué dans l'activité anti-inflammatoire. L'infliximab lie également le TNF $\alpha$  transmembranaire et bloque l'interaction avec ses récepteurs ou joue le rôle d'agoniste en initiant une signalisation inverse induisant une activation cellulaire. Les voies de signalisation activées par le TNF $\alpha$  transmembranaire restent inconnues mais la liaison d'un anti-TNF $\alpha$  sur le TNF $\alpha$  transmembranaire peut induire l'activation de protéases impliquées dans la sécrétion de cytokines ou le clivage de récepteur membranaire. D'ailleurs, plusieurs études ont montré que tous les anti-TNFs lient le TNF $\alpha$  transmembranaire et induisent différents effets sur la production de cytokines par une signalisation inverse (Nesbitt *et al.* 2007 ; Kirchner *et al.* 2004 ; Mitoma *et al.* 2005).

L'IL-15 joue un rôle clé dans l'activation de l'immunité innée et dans la réponse adaptative, et sa modulation par un anti-TNF $\alpha$  peut réguler le processus inflammatoire dans la maladie de Crohn. L'IL-15 est produite par les macrophages activés, les cellules dendritiques et les cellules non hématopoïétiques telles que les cellules stromales, les fibroblastes et les entérocytes. L'IL-15 possède des propriétés anti-apoptotiques sur ces différents types cellulaires : elle inhibe l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  en bloquant le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF par le TNFR1 dans les fibroblastes ou en bloquant l'apoptose dépendante du ligand Fas (Bulfone-Paus *et al.* 1997 ; Bulfone-Paus *et al.* 1999).

L'IL-15R $\alpha$  existe également sous forme soluble générée par un mécanisme de clivage protéolytique de la forme membranaire par une ou plusieurs métalloprotéases. La forme soluble de l'IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ) est capable d'inhiber l'activité biologique de l'IL-15 à de faibles doses sur les cellules exprimant son récepteur de forte affinité IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ c (Mortier *et al.* 2004). Une des métalloprotéases impliquées dans le clivage constitutif et



inductible de l'IL-15R $\alpha$  est la TACE responsable du clivage du TNF $\alpha$  membranaire (Budagian *et al.* 2004).

Les rôles de l'IL-15 et du sIL-15R $\alpha$  dans les maladies chroniques de l'intestin ne sont pas clairement définis mais l'IL-15 est fortement exprimée par les cellules de la muqueuse intestinale (Nishiwaki *et al.* 2005). De plus, les cellules productrices d'IL-15 sont plus nombreuses dans la lamina propria des patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique que dans celle des sujets sains (Liu *et al.* 2000). La liaison de l'IL-15 par le sIL-15R $\alpha$  aggrave les dommages épithéliaux et augmente l'inflammation dans un modèle murin de colite induite par le DSS alors qu'elle réduit l'inflammation et l'infiltrat cellulaire de la muqueuse dans un modèle de souris SCID (Obermeier *et al.* 2006).

Le but de cette étude est d'évaluer la sécrétion d'IL-15 et de sIL-15R $\alpha$  chez des patients atteints d'une maladie de Crohn active et d'évaluer la modulation de cette sécrétion par l'infliximab au cours du traitement. Nous évaluerons également *ex vivo* l'effet de l'infliximab sur l'expression cellulaire de l'IL-15R $\alpha$  et de la TACE et *in vitro*, l'effet de deux anti-TNFs (infliximab et etanercept) sur la sécrétion du sIL-15R $\alpha$ .

## C. Résultats

Dans cette étude, nous avons inclus 40 patients atteints d'une maladie de Crohn active et tous traités par l'infliximab et 37 sujets sains. Sur les 40 patients, 32 ont répondu au traitement, ce qui se traduit par une diminution de leur CDAI ( $<150$ ) et une fermeture des fistules, 8 n'ont pas répondu au traitement. La valeur du CDAI avant traitement par l'infliximab n'est pas différente entre les répondeurs et les non répondeurs ( $245.1 \pm 108.2$  *versus*  $245.4 \pm 143.2$ ). En revanche, après trois infusions d'infliximab (5mg/Kg) à la semaine 0, la semaine 2 et la semaine 6, la valeur du CDAI a fortement diminué chez les répondeurs alors qu'elle est restée constante chez les non répondeurs ( $58.9 \pm 35.0$  *versus*  $245.1 \pm 108.2$ ;  $P < 0.001$ ). Pour évaluer l'inflammation chez ces patients, nous avons dosé la CRP (C-reactive protein) qui est un marqueur de l'inflammation ainsi que le TNF. Comme pour le CDAI, avant infliximab, les taux de CRP et de TNF ne sont pas différents entre les répondeurs et les non répondeurs ( $41.6 \pm 55.9$  *versus*  $32.1 \pm 32.0$  mg/dL) et ( $20.8 \pm 15.8$  pM *versus*  $22.1 \pm 5.2$  pM) respectivement. Après le traitement, le niveau de la CRP

et du TNF décroît fortement chez les répondeurs ( $10.5 \pm 13.4$  *versus*  $41.6 \pm 55.9$  mg/dL;  $P < 0.001$ ) et ( $7.5 \pm 10.9$  *versus*  $20.8 \pm 15.8$  pM;  $P < 0.001$ ) alors qu'il n'y a aucune différence avant et après traitement chez les non répondeurs.

Fort de ces observations, nous avons évalué le taux d'IL-15, de sIL-15R $\alpha$  et de complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  avant traitement dans les séra des patients et des sujets sains. Nous avons mis en évidence que le taux sérique d'IL-15 est plus élevé chez les patients avant traitement que chez les sujets sains ( $9.2 \pm 15.4$  *versus*  $1.3 \pm 2.4$  pM;  $P < 0.02$ ). Nous avons également observé une différence significative du taux d'IL-15 entre les non répondeurs et les répondeurs ( $11.7 \pm 16.8$  *versus*  $0.6 \pm 1.4$  pM;  $P = 0.01$ ). Nous avons également détecté le sIL-15R $\alpha$  dans les séra de patients. De façon analogue à l'IL-15, le taux sérique de sIL-15R $\alpha$  est significativement plus élevé chez les patients que chez les sujets sains avant infusion d'infliximab ( $10.9 \pm 20.8$  *versus*  $0.4 \pm 1.7$  pM;  $P < 0.001$ ) et chez les répondeurs par rapport aux non répondeurs ( $12.5 \pm 23.4$  *versus*  $6.0 \pm 7.2$  pM). Le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  est également plus élevé chez les répondeurs ( $20.6 \pm 23.4$  pM) que chez les sujets sains ( $1.3 \pm 7$  pM) ou les non répondeurs ( $1.7 \pm 2.9$  pM).

Au cours du traitement par l'infliximab, les patients qui répondent au traitement montrent une diminution de leur taux d'IL-15 sérique ( $1.9$  pM *versus*  $0.7$  pM) en association avec une élévation de leur taux de sIL-15R $\alpha$  ( $3.0$  pM *versus*  $10.5$  pM). En revanche, chez les non répondeurs, le taux d'IL-15 reste inchangé après traitement comme leur taux de sIL-15R $\alpha$ . De plus, le taux de complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  a tendance à augmenter au cours du traitement chez les répondeurs ( $20.6 \pm 23.4$  pM *versus*  $26 \pm 12$  pM). Individuellement, cette évolution (diminution de l'IL-15 associée à une augmentation du sIL-15R $\alpha$  et du complexe) est observée dans 59% des cas (19/32). Les autres cas (13) présentent une évolution similaire pendant les 2 premières semaines de traitement (9/13) ou une absence des composants du système IL-15 (4/13).

Nous avons par la suite analysé l'expression de l'IL-15R $\alpha$  par immunohistochimie pour localiser *in situ* sur des biopsies intestinales quels types de cellules expriment l'IL-15R $\alpha$ . Nous avons mis en évidence une surexpression de l'IL-15R $\alpha$  dans les biopsies issues de patients atteints de la maladie de Crohn par rapport aux sujets sains. De plus, l'IL-15R $\alpha$  est co-localisé avec la cytokératine exprimée par les cellules épithéliales suggérant que l'IL-15R $\alpha$  est majoritairement exprimé par ces cellules. Enfin, nous avons également observé une surexpression d'ADAM17 chez les patients atteints de maladie de Crohn. ADAM17 est également co-localisé avec l'IL-15R $\alpha$  chez ces patients. Tous ces

résultats permettent de supposer que les cellules épithéliales libèrent le sIL-15R $\alpha$  après clivage protéolytique de la forme membranaire par ADAM17.

Ayant identifié les cellules épithéliales comme principales sources d'IL-15R $\alpha$ , nous avons étudié l'influence de l'infliximab sur la libération du sIL-15R $\alpha$  par des lignées humaine épithéliales (HT-29 et Caco2). Nos résultats montrent que ces lignées ne sécrètent pas ou trop peu de sIL-15R $\alpha$  pour être détecté constitutivement. La libération de sIL-15R $\alpha$  est augmentée après 24h d'incubation en présence d'IFX (0.1 $\mu$ g/ml) mais pas en présence d'éthanercept. De plus, cette augmentation est accentuée lorsque les cellules sont préincubées pendant 6h en présence d'IL-1 $\beta$  ou d'IFN $\gamma$ . Ainsi, l'infliximab semble, en partie, influencer sur le système IL-15 en augmentant la libération du sIL-15R $\alpha$  par les cellules épithéliales. Cette libération semble impliquer la métalloprotéase ADAM17.

## D.Article II

### **Interleukin-15 and its soluble receptor sIL-15R $\alpha$ are implicated in the response to infliximab in Crohn's disease**

**(BOUCHAUD G. *et al.*, soumis à *American Journal of Gastroenterology*)**

**Author Contributions** : Project planning was performed by G.B., E.M., A.B., and Y.J., experimental work by G.B for assay and *in vitro* analysis, M.F. for biopsie and serum collection, I.B. for IHC, data analysis by G.B and A.B., manuscript composition by G.B., E.M., A.B., and Y.J.

[Gastroenterology](#). 2010 Feb 23. [Epub ahead of print]

### **Interleukin-15 and its Soluble Receptor Mediate the Response to Infliximab in Patients With Crohn's Disease.**

[Bouchaud G](#), [Mortier E](#), [Flamant M](#), [Barbieux I](#), [Plet A](#), [Galmiche JP](#), [Jacques Y](#), [Bourreille A](#).

INSERM, U892, Equipe Cytokine/Récepteur, Nantes, France; Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, Nantes, France.

## Abstract

**BACKGROUND & AIMS:** Infliximab is a monoclonal antibody against tumor necrosis factor that is used to treat patients with inflammatory bowel disease. We investigated serum levels and cellular expression of interleukin (IL)-15 and a secreted form of its receptor (sIL-15Ralpha) in patients with Crohn's disease (CD) treated with infliximab; we also investigated the effect on sIL-15Ralpha secretion by epithelial cells. **METHODS:** CD patients were given infliximab (n = 40; 3 infusions); 37 healthy controls were studied. Serum levels of IL-15, sIL-15Ralpha, and complex were determined by radioimmunoassay and cytokine levels by enzyme-linked immunosorbent assay. IL-15Ralpha and ADAM17 levels were assessed by immunohistochemistry. Epithelial cell lines (HT-29 and Caco-2) were cultured with infliximab, adalimumab, or etanercept. Patients were classified as responders and nonresponders according to their Crohn's Disease Activity Index and clinical observations. **RESULTS:** Before infliximab, IL-15 was higher in responders than in controls and nonresponders. After infliximab, IL-15 decreased in responders while remaining stable in nonresponders. sIL-15Ralpha and IL-15/sIL-15Ralpha complex levels were higher in CD than in controls and increased only in responders after infliximab. IL-15Ralpha and ADAM17 colocalized in epithelial cells and were higher in CD patients. In vitro, infliximab but not adalimumab and etanercept induced sIL-15Ralpha secretion by epithelial cells. **CONCLUSIONS:** Serum level of sIL-15Ralpha and the IL-15/sIL-15Ralpha complex increased in responder patients and the response was associated with a decrease of IL-15. Infliximab induced the release of the IL-15 receptor alpha, suggesting a specific modulation of IL-15 and its soluble receptor by reverse signaling through transmembrane tumor necrosis factor alpha. Copyright © 2010 AGA Institute. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

PMID: 20188102

## **Interleukin-15 and its soluble receptor sIL-15R $\alpha$ are implicated in the response to infliximab in Crohn's disease**

Gregory Bouchaud<sup>&,2,4</sup>, Arnaud Bourreille<sup>&,1,2,3</sup>, Mathurin Flamant<sup>1,2,3</sup>, Ariane Plet<sup>2,4</sup>, Isabelle Barbieux<sup>4</sup>, Jean-Paul Galmiche<sup>1,2,3</sup>, Erwan Mortier<sup>2,4</sup> and Yannick Jacques<sup>2,4</sup>

<sup>&</sup> these authors contributed equally to the work.

<sup>1</sup>INSERM, U913, Nantes, F-44093, France.

<sup>2</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44093, France.

<sup>3</sup>CHU Nantes, Hôtel Dieu, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, F-44093, France.

<sup>4</sup>INSERM, U892, équipe cytokine/récepteur, Nantes, F-44093, France.

### **Corresponding author:**

Grégory BOUCHAUD

Address: INSERM, U892  
Equipe cytokine/récepteur  
8, quai Moncoussu  
F-44093 Nantes  
FRANCE  
Tel: +33 (0) 240 08 75 42  
Fax: +33 (0) 240 08 75  
E-mail: [bouchaud-g@univ-nantes.fr](mailto:bouchaud-g@univ-nantes.fr)

Keywords: Interleukin-15, Interleukin-15 receptor alpha subunit, soluble Interleukin-15 receptor alpha subunit, Crohn Disease, Inflammatory Bowel diseases, infliximab, monoclonal antibody cA2

## Abstract

**Infliximab (IFX) leads to cytokine suppression by a reverse signalling pathway. Here, we investigated serum levels and cellular expression of IL-15 and sIL-15R $\alpha$  in Crohn's disease (CD) patients during treatment by IFX, and the effect of IFX on sIL-15R $\alpha$  secretion by epithelial cells.**

**Forty patients were studied receiving a single IFX course (3 infusions). Thirty seven healthy controls were also included. Serum levels of IL-15, sIL-15R $\alpha$  and complex were determined by specific RIA and TNF by a bio-assay. Cellular expressions of IL-15R $\alpha$  and ADAM17 were assessed by immunohistochemistry (IHC). For *in vitro* studies, HT-29 epithelial cell line was cultured with IFX or etanercept (inefficient in CD) with or without IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$ .**

**Patients were classified as responders and non-responders to IFX according to CDAI values lower than 150 points. Before IFX, IL-15 was higher in responders than in controls and non-responders. After IFX, IL-15 decreased in responders while remaining stable in non-responders. sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex levels were higher in CD than in controls and increased only in responders after IFX.**

**IL-15R $\alpha$  and ADAM17 co-localized in epithelial cells and were higher in CD patients. *In vitro*, IFX but not etanercept induced sIL-15R $\alpha$  secretion by epithelial cells.**

**In summary, sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex are increased in responder patients and the response is associated with a decrease of IL-15. IFX but not etanercept induced the release of the IL-15 receptor  $\alpha$ , suggesting a specific modulation of IL-15 and its soluble receptor by reverse signalling through tmTNF.**

## Introduction

Therapies targeted against cytokines are commonly used in inflammatory bowel disease (IBD). Among them, anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibodies are effective and used in clinical routine. Infliximab (IFX) is an anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody which binds soluble and cell-surface TNF $\alpha$  with high affinity and specificity. However, despite its efficacy for the treatment of active Crohn's disease (CD), its anti-inflammatory action is not fully understood.

Anti-TNF $\alpha$  agents could reduce inflammation by neutralizing soluble TNF $\alpha$  and its subsequent interaction with its receptors. However, differences in efficacy profiles despite similar affinities for soluble TNF $\alpha$  suggest that neutralization of soluble TNF $\alpha$  may not be the major mechanism of action. Interestingly, IFX binds to trans-membrane TNF $\alpha$  (tmTNF), and thereby acts either as an antagonist by blocking tmTNF interaction with its receptors or as an agonist by initiating tmTNF mediated reverse signaling leading to cell activation or cytokine suppression [1]. Among the molecular partners involved in reverse signaling are the proteases SPPL2a and SPPL2b that participate to tmTNF-mediated induction of interleukin (IL)-12 production [2]. Accordingly, binding of anti-TNF agents to tmTNF could induce the activation of proteases implicated in the secretion of cytokines or in the cleavage of membrane-anchored receptors. Although several studies had demonstrated that all anti-TNF $\alpha$  bind to tmTNF, there are evidences for differential induction of cytokine suppression through reverse signaling [3, 4, 5]. For example, it was demonstrated that IFX but not etanercept could down-regulate IL-1 $\alpha$  and TNF $\alpha$  secretions and increase IL-10 secretion [3, 4, 5]. These differences could explain the unequal efficacy of these agents and in particular the poor efficacy of etanercept in CD.

Among pro-inflammatory cytokines, IL-15 plays a key role in the activation of

innate and adaptative immune responses and its modulation by anti-TNF agents could deeply regulate the inflammatory process in CD. IL-15 was identified for its IL-2 like ability to stimulate the growth of T cells but experiments have shown that the two cytokines exert complementary effects within the immune system. IL-15 is produced by macrophages and also by non-hematopoietic cell types such as enterocytes [6, 7].

IL-15 binds a trimolecular IL-15 receptor (IL-15R) complex formed by the  $\beta$  and  $\gamma$  chains of the IL-2R and a specific receptor chain (IL-15R $\alpha$ ). Soluble forms of IL-15R $\alpha$  retains a high affinity for IL-15 and can act either as a powerful antagonist of IL-15 action or as an agonist of IL-15 action through the IL-15R $\beta/\gamma$  complex [8]. Natural shedding of such soluble IL-15R $\alpha$  has been shown to result from the cleavage of tmIL-15R $\alpha$  by metalloproteinase-dependent proteolytic mechanisms and one of this metalloproteinase is ADAM17 also known as TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme) [8, 9, 10].

The role of IL-15 and its soluble receptor in IBD is not clearly understood. IL-15 expression has been shown in intestinal epithelial cells as well as in the intestinal mucosa [11, 12, 13]. Moreover, IL-15 positive cells are more numerous in the lamina propria of CD and UC patients compared to uninfamed control patients [14]. Neutralization of IL-15 had various effects in animal models of IBD. It was shown that IL-15 neutralization by sIL-15R $\alpha$  could aggravate epithelial damage and increase inflammation in the DSS-induced colitis mice model, whereas IL-15 neutralization reduced inflammation and the mucosal cell infiltrate in the SCID transfer model [15].

The effect of TNF $\alpha$  antagonists on the regulation of IL-15 and its soluble receptor has never been explored in CD patients. Therefore, the aims of our study were to evaluate secretion of IL-15 and its soluble receptor in active CD patients and to evaluate their modulation after IFX treatment according to the clinical response. We also analyzed, *ex vivo*, the cellular expression of the tmIL-15R $\alpha$  and *in vitro*, the effect of the two anti-TNF $\alpha$

molecules IFX and etanercept (one active, one ineffective in CD) on the secretion of sIL-15R $\alpha$ .

## Patients and methods

Patients with active CD were treated by 3 infusions of IFX (5 mg/Kg) at week 0, 2 and 6. A clinical remission to IFX was defined by a Crohn's Disease Activity Index (CDAI) under 150 points after treatment. When the patients were treated for a perineal disease, the clinical response was assessed by the disappearance of draining fistulas at week 6 after the first infusion of IFX. Blood samples were taken before the first infusion of IFX (week 0 or before IFX) and after the third infusion of IFX (week 6 or after IFX) and were centrifuged and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Blood samples were also collected in 37 healthy volunteers. Each patient gave his informed and written consent and the bio-collection was declared to the local ethical committee and the "Fédération des biothèques, University Hospital, Nantes, France".

Forty patients with an active CD were included in the study (12 males, 28 females, mean age 37.8 years). After IFX, 32 patients were in remission and 8 had no benefit of the treatment and remained in an active phase of their disease. According to the Montreal classification, the disease was predominantly located into the colon (L2) or the ileocolon (L3) in 62.5 and 32.5 % respectively and the disease was mostly non-stricturing and non-penetrating (B1). Only 11 patients (27.5 %) had a perineal disease (p), 7 were treated for fistulas alone, the others for a combination of fistulas and a non-stricturing and non-penetrating disease (B1, p). Six patients were treated by a combination of steroids and immunosuppressors, 3 patients received only steroids, 30 only immunosuppressors. Treatment was not modified except steroids which were always stopped between the first and the third infusion. Clinical and demographic data are summarized in table 1. There were no clinical and demographic differences between patients who experienced a response or not to IFX.



### Radioimmunoassay for quantification of sIL-15R $\alpha$ and IL-15.

The quantification of sIL-15R $\alpha$ , IL-15 and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex was determined as previously described [8]. Sandwich RIAs were set up in which the goat anti-human IL-15R $\alpha$  Ab AF247 or the mouse anti-human IL-15 Mab247 (R&D) was used as capture Ab and radio-iodinated neutralizing anti-human IL-15R $\alpha$  Ab M161 (GenMab; Copenhagen, Denmark) or radio-iodinated mouse anti human IL-15 BE-29 (Diaclone; Besançon, France) was used as tracer. Both RIA was specific for sIL-15R $\alpha$  or IL-15 non complexed or IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex. A purified recombinant sIL-15R $\alpha$  protein [16] and recombinant IL-15 (Peprotech) were used as standards. Capture Abs were coated (5  $\mu$ g/mL; 50  $\mu$ L/well) to high-adsorption Nunc maxisorp plates (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Wells were saturated with PBS-BSA 0.5% for 15 min and samples (50  $\mu$ L/well) were incubated for 1 h at 4°C. The M161 or BE-29 mAbs were iodinated using the iodogen method and then added (1 nM, 50  $\mu$ L/well) for 1 h at 4°C. Supernatants of each well were collected and the wells washed twice with PBS. The radioactivity associated to the wells (bound fraction) and contained in the supernatants and washes (unbound fraction) were determined. The upper normal value of IL-15 (6.1 pM) was calculated by the mean + 2 SD of the values measured in healthy volunteers.

### Quantification assay of TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  concentrations were measured in the serum of 40 patients (32 responder patients, 8 non-responders). Quantification TNF $\alpha$  was performed by the XTT method using the murine cell line WEHI 164 (ATCC N°CRL1751) [17]. Cells were seeded in 96-well plates ( $3 \times 10^4$  cells/50  $\mu$ L/well) and grown at 37°C in RPMI 1640 supplemented with 0.1 nmol/L of glutamine, 10% heat-inactivated FCS, LiCl and actinomycin D. Sera from CD patients and healthy volunteers were

serially diluted, added to wells and a purified recombinant TNF $\alpha$  (R&D) was used as standard. After 20 h of culture, 50  $\mu$ L/well of XTT and electron coupling reagent was added and cell survival was determined by measuring the optical density at 450 nm. The sensitivity of the assay was 0.10 pg/mL. The TNF $\alpha$  upper normal limit was calculated by the mean + 2 SD of the values obtained in the healthy volunteers.

### *In vitro* studies

The colonic epithelial cell line HT-29 was cultured in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) supplemented with 2mM glutamine. Cells were seeded into 24-well plates and grown until formation of confluent monolayers (3 days). Monolayers were then incubated for 24 h in fresh medium containing a fixed concentration (0.1  $\mu$ g/mL) of IFX, etanercept (0.1  $\mu$ g/mL). For induction, Monolayers were incubated for 6h with IL-1 $\beta$  (1 nM) and after 3 washes with PBS incubated for the next 24h with in fresh medium containing a fixed concentration (0.1  $\mu$ g/mL) of IFX, etanercept (0.1  $\mu$ g/mL). After incubation, supernatants were collected, cleared by centrifugation and use for RIA.

### Immuno-fluorescence staining

Colonic biopsies were obtained from three CD patients before the first and the third IFX infusion and two healthy control patients. All CD patients were in clinical remission after the treatment and moreover, a mucosal healing was obtained in two patients.

Colonic biopsies were immediately frozen and stored at -80°C. Specimens were sectioned at 4 to 6  $\mu$ m with a cryostat, placed on slides, air dried, and fixed for 10 min with 100% acetone. Before incubation with primary antibodies, the slides were saturated with PBS/BSA 0.5%. Primary antibodies were goat anti-IL-15R $\alpha$  and rabbit anti-ADAM17 (R&D, Abingdom, UK) or anti cytokeratin (Santa-Cruz Biotechnology) used at concentrations of 15

µg/mL and 10 µg/mL respectively. Secondary antibodies were rabbit anti-goat IgG Alexa 488 and chicken anti-rabbit IgG FITC used at a concentration of 2 µg/mL. Isotype-matched antibodies were used as negative controls. In the double immunofluorescence experiments, we checked that each secondary antibody did not cross-react with the primary antibody of the other immunoglobulin species. Fluorescent images were analyzed with an epifluorescent microscope DMR (Leica Microsystems).

### Statistical analysis

Quantitative data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median (IQ 25 – 75). The normality of the distribution was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between quantitative data were assessed by the paired or unpaired t-test and the Mann-Whitney U test or the Wilcoxon signed rank test for non-normally distributed data. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Clinical and biological markers of activity

During IFX treatment, sera were collected and clinical and biological markers were analysed to classified patients in two subsets: responder and non-responder. The mean  $\pm$  SD of the CDAI was not different between responder and non-responder patients before IFX ( $245.1 \pm 108.2$  versus  $245.4 \pm 143.2$ ). After IFX, the mean of the CDAI decreased significantly in responder patients ( $58.9 \pm 35.0$  versus  $245.1 \pm 108.2$ ;  $P < 0.001$ ), whereas no difference was found in non-responder patients ( $198.3 \pm 41.1$  versus  $245.4 \pm 143.2$ ;  $P = 0.8$ ) (figure 1A and 1B).

Circulating TNF $\alpha$  was above the normal value in 87% (35/40) patients before the first infusion of IFX. Its mean level was significantly higher in non-responder patients ( $22.1 \pm 5.2$  pM) and in responder patients ( $20.8$

$\pm 15.8$  pM) than in control ( $1.6 \pm 2.3$  pM) ( $P < 0.001$ ) but no significant difference was found between the two groups of patients (Figure 1C and 1D). At week 6 after IFX, TNF $\alpha$  decreased in 84 % (27/32) of responder patients with individual values dropping to control ranges in 59 % of patients (19/32). At the opposite, TNF remained above the control value in 87 % (7/8) of non-responder patients. The mean of TNF levels significantly decreased in responder patients ( $7.5 \pm 10.9$  versus  $20.8 \pm 15.8$  pM;  $P < 0.001$ ) whereas no difference was found in non-responder patients ( $22.1 \pm 5.2$  versus  $20.1 \pm 8.6$ ).

The mean of the CRP levels was not significantly different between responder and non-responder patients before IFX ( $41.6 \pm 55.9$  versus  $32.1 \pm 32.0$  mg/dL;  $P = 0.9$ ). After IFX, CRP decreased significantly in responder patients ( $10.5 \pm 13.4$  versus  $41.6 \pm 55.9$  mg/dL;  $P < 0.001$ ), whereas no difference was found in non-responder patients ( $16.7 \pm 12.8$  versus  $32.1 \pm 32.0$  mg/dL;  $P = 0.2$ ) (figure 1E and 1F).

### IL-15, sIL-15R $\alpha$ and IL-15/sIL-15R $\alpha$ in CD patients during IFX

Then, based on previous studies showing IL-15 over expression in Crohn disease we decided to measure IL-15, sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex in the serum of patients. IL-15 was detectable in the serum of 25 % (2/8) of non-responder patients and in 81 % (26/32) of responder patients. On average for the 40 patients before treatment, IL-15 levels (mean  $\pm$  SD) were significantly higher in CD patients than in healthy subjects ( $9.2 \pm 15.4$  versus  $1.3 \pm 2.4$  pM;  $P < 0.02$ ) (data not shown). IL-15 levels was also significantly higher in responder than in non-responder patients ( $11.7 \pm 16.8$  versus  $0.6 \pm 1.4$ ;  $P = 0.01$ ) and than in healthy controls ( $11.1 \pm 16.7$  versus  $1.3 \pm 2.4$  pM  $P = 0.002$ ). To the opposite, IL-15 levels were not different between non-responder patients and healthy subjects (Figure 2A). Soluble IL-15R $\alpha$  was also detected in the serum of CD patients. sIL-15R $\alpha$  was significantly higher in CD patients

before treatment than in healthy subjects ( $10.9 \pm 20.8$  versus  $0.4 \pm 1.7$  pM;  $P < 0.001$ ) (Data not shown). When patients responded to IFX, the median (IQ) of the IL-15 levels significantly decreased from 2.7 pM (0.1 – 16.0) to 0.6 pM (0.0 – 2.4) ( $P = 0.02$ ) (figure 2B). The number of patients in whom IL-15 was undetectable increased from 22 % (7/32) before to 47 % (15/32) after IFX and IL-15 dropped below the control value in 93% (30/32). In contrast, in non-responder patients, the median of the IL-15 levels was not modified after IFX (figure 2C). Although sIL-15R $\alpha$  levels were higher in responder than in non-responder patients, the difference was not significant ( $12.5 \pm 23.4$  versus  $6.0 \pm 7.2$  pM). Moreover, sIL-15R $\alpha$  in responder and non-responder patients were both significantly higher than in healthy subject ( $P < 0.001$  and  $P = 0.003$ , respectively) (Figure 2D). In responder patients, the median (IQ) of the sIL-15R $\alpha$  levels significantly increased after IFX from 2.2 pM (3.0 – 12.8) to 12 pM (0.5 – 34.6) ( $P = 0.002$ ) and the proportion of patients with detectable sIL-15R $\alpha$  increased by 34 % after IFX (figure 2E). To the opposite, in non-responder patients, sIL-15R $\alpha$  levels did not change significantly ( $5.99 \pm 7.3$  versus  $3.5 \pm 6.4$  pM;  $P = 0.3$ ) (figure 2F). In the same frame, IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex level was measured and shown significantly higher in responder than in non-responder patients ( $20.6 \pm 78$  versus  $1.7 \pm 2.9$  pM ;  $P = 0.03$ ). Moreover, IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex in responder patients was significantly higher than in healthy subject ( $20.6 \pm 78$  versus  $1.3 \pm 7$  pM  $P = 0.002$ ) (Figure 2E). The IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex level significantly increased after IFX in 90% (36/40) of responder patients and the median (IQ) increased from 20 pM (0 – 99) to 26 pM (0.5 – 102) ( $P = 0.04$ ) (figure 2G). To the opposite, in non-responder patients, IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex level decreased significantly ( $1.7 \pm 2.9$  versus  $0 \pm 0$  pM;  $P = 0.02$ ) (figure 2G).

### Cellular expression of IL-15R $\alpha$ and the metalloproteinase ADAM17 in colonic mucosa

We next analyzed the expression of IL-15R $\alpha$  by immunochemistry to localize which cell type expresses IL-15R $\alpha$ . Immunofluorescence showed that before IFX, the cellular expression of IL-15R $\alpha$  was higher in CD patients (figure 3B) compared to healthy controls (figure 3A). Minor changes were observed after IFX (not shown). To identify the cell expressing IL-15R $\alpha$ , we co-stained IL-15R $\alpha$  with cytokeratin which marked exclusively epithelial cells. The results showed that IL-15R $\alpha$  is co-localized with cytokeratin in CD patients, suggesting that IL-15R $\alpha$  is mainly expressed by epithelial cells (figure 3E). No co-localization was observed in healthy control (figure 3D). To investigate whether sIL-15R $\alpha$  is generated by proteolytic cleavage from membrane bound IL-15R $\alpha$ , we looked for the presence of the TNF $\alpha$  converting enzyme (ADAM17) which has been shown to be involved in the shedding [10]. We demonstrate that ADAM17 is over expressed in CD patients (figure 3H) compared to healthy subject (figure 3G). IL-15R $\alpha$  and ADAM17 were co-localized in colonic epithelial cells in CD patients (figure 3K, 3N and 3E) but not in healthy controls (figure 3J and 3M). However, the cellular expression of ADAM17 and IL-15R $\alpha$  before IFX were higher for the two patients in whom IFX induced a mucosal healing and a histological improvement compared to the patient who had only a clinical response without mucosal healing (not shown).

### IFX induced sIL-15R $\alpha$ secretion

We identified epithelial cell as the major source of sIL-15R $\alpha$ , so we investigated whether IFX can modulate sIL-15R $\alpha$  secretion by human colonic epithelial cell line. Epithelial cell line HT-29 expresses low level of IL-15R $\alpha$  but do not secrete detectable amount of sIL-15R $\alpha$ . sIL-15R $\alpha$  secretion was markedly increased upon addition of IFX ( $10.9 \pm 3$  pM versus  $0.5 \pm 1.5$  pM ;  $P < 0.0001$ ). The

inducing effect of IFX on sIL-15R $\alpha$  secretion was increased when epithelial cells were preincubated with IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$ . sIL-15R $\alpha$  release measured in the presence of IFX and IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$  was significantly higher than that measured in the presence of IFX alone ( $10.9 \pm 3$  versus  $34 \pm 18$  pM ;  $P = 0.0001$ ) or IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$  alone ( $3.8 \pm 0.8$  or versus  $34 \pm 18$ ;  $P > 0.0001$ ) showing a synergic effect of the two components (figure 4A).

In contrast, addition of Etanercept did not significantly affect sIL-15R $\alpha$  secretion ( $1.025 \pm 2$  versus  $0.5 \pm 1.5$  pM;  $P = 0.1$ ) suggesting a specific action of IFX on sIL-15R $\alpha$  release, excluding an effect of the Fc fragment. Moreover, addition of IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$  before Etanercept did not affect the sIL-15R $\alpha$  secretion ( $2.3 \pm 2.1$  or versus  $0.5 \pm 1.5$  pM;  $P = 0.4$ ) (figure 4B). Same results were obtained with another epithelial cell line Caco2 (not shown).

## Discussion

This study demonstrates for the first time the *in vivo* expression of a naturally soluble form of the human IL-15R $\alpha$  and its complex with IL-15 in CD and its modulation according to the inflammatory status of the patients. The serum levels of sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex were significantly higher in active CD patients than in controls and, after IFX treatment, sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex increased in responder patients while it remained stable or decreased in non-responders. sIL-15R $\alpha$  secretion was also associated with a decreased of IL-15 and an increased of IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex in responder patients after IFX and remained stable in non-responders. The *in vitro* results suggest that the increase in sIL-15R $\alpha$  could be due to a direct effect of IFX on cellular tmTNF and not only a consequence of the decreased inflammation. The down-stream mechanisms seemed to be specific of IFX, as etanercept, did not induce the release of sIL-15R $\alpha$  by activated epithelial cells.

Our *in vivo* data demonstrated that IL-15 significantly decreased in patients who experienced a clinical response after IFX. This could be due, in part, to a general benefice on the inflammation, but also could be due to the release of sIL-15R $\alpha$  from IL-15R $\alpha$  bearing cells. sIL-15R $\alpha$  retains a high affinity for IL-15 and could subsequently decrease circulating IL-15 levels by forming IL-15/sIL-15R $\alpha$  complexes present in the serum of patients. Indeed, our *in vitro* data showed that IFX induced the secretion of sIL-15R $\alpha$  by activated epithelial cells suggesting that IFX could induce, *via* its binding on tmTNF, the downstream activation of one or several metalloproteases leading to the cleavage of tmIL-15R $\alpha$ . Cleavage of tmIL-15R $\alpha$  by metalloproteinases is supported by our IHC data showing that i) IL-15R $\alpha$  and ADAM17 are co-localized at the level of epithelial cell membranes and ii) both proteins have increased expression levels after IFX. Such IFX-induced release of sIL-15R $\alpha$  could explain the increase of sIL-15R $\alpha$  in the sera of responder patients and the parallel decrease of IL-15. To the opposite, in non responder patients, IFX was unable to modulate sIL-15R $\alpha$  or IL-15, suggesting a default in the downstream pathways leading to the cleavage of tm IL-15R $\alpha$ . Among one protein potentially involved in these pathways, ADAM17 cleaves many membrane proteins including tmIL-15R $\alpha$ . In a genetic analysis of a cohort of CD, it was demonstrated that one haplotype of the ADAM17 gene was associated with a good response to IFX suggesting that the ADAM17 gene is involved in the response to IFX as part of a multigenetic mechanism [18]. In our patients, no-response to the treatment could be due in part to a default of the ADAM17 activation by IFX preventing the cleavage of the tmIL-15R $\alpha$ .

In non responder patients, IL-15 levels were comparable to those obtained in controls and lower than in responder patients. One could suggest that our population of non-responder patients included non-inflamed patients with irritable bowel symptoms. This is however very unlikely because the TNF and CRP levels before IFX were comparable to

those exhibited by responder patients, therefore allowing to consider them as real non-responders to IFX. The inefficacy of IFX was not explained by an imbalance between TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  as their proportions were similar in the sera of responder and non-responder patients (data not shown). The discrepancy between the IL-15 levels could neither be explained by differences in the demographic, clinical or therapeutic characteristics of the responder *versus* non-responder patients.

One explanation could be linked to the mechanisms involved in cell secretion of IL-15. Indeed, it has recently been shown that IL-15 secretion is highly dependent on its intracellular pre-association with IL-15R $\alpha$ . IL-15R $\alpha$  binds tightly to IL-15 and stabilizes the protein in the endoplasmic reticulum/golgi apparatus. The IL-15/IL-15R $\alpha$  complexes and excess uncomplexed IL-15R $\alpha$  are translocated to the plasma membrane [19, 20] where they can be cleaved by matrix metalloproteinases, resulting in the shedding of sIL-15R $\alpha$  and soluble IL-15/sIL-15R $\alpha$  complexes [19]. The differences in IL-15 concentrations between responder and non-responder patients could be explained by a defect either in the mechanisms leading to the translocation of the complex to the membrane or, as it was suggested above, in the cleavage of the tmIL-15R $\alpha$  by matrix-metalloproteinases. The latter mechanism could also explain the primary low levels of IL-15 and sIL-15R $\alpha$  observed in non-responder patients even in the presence of sustained intestinal inflammation as assessed by elevated CRP and TNF levels which has been shown to upregulate IL-15 secretion.

A same observation was done in rheumatoid arthritis treated with IFX where the IL-15 level in these patients decreased after treatment [21] and it is possible that in these patients sIL-15R $\alpha$  level was increased in correlation with IL-15 decrease after treatment.

Modulation of IL-15 and sIL-15R $\alpha$  secretions by anti-TNF agents may be of particular interest to control the inflammatory response during IBD. As demonstrated from data obtained in IL-15-transgenic and IL-15 deficient mice, IL-15 plays a significant role in the inflammatory joint destruction in which the

inflammatory response is quite similar to CD [22, 23]. In murine collagen-induced arthritis, IL-15 induced IL-17 production and IL-23R expression in T cells and IL-15 synergized with IL-23 to induce production of IL-17 [23]. Similar mechanisms implicating IL-15 overexpression could therefore operate in other inflammatory diseases in which Th17 responses have been described. Moreover, the IFX-induced release of sIL-15R $\alpha$  could also participate to the restoration of cell apoptosis which was described in patients with active CD treated by IFX [24, 25]. IL-15 is a well known potent inhibitor of apoptosis by blocking adaptor protein recruitment to the TNF receptor (TNFR1). Intracellular domains of ligand stimulated TNFR1 and tmIL-15R $\alpha$  compete for binding TRAF2 with tmIL-15R $\alpha$  showing a higher affinity for TRAF2 than TNFR1. Then, upon activation with IL-15, tmIL-15R $\alpha$  rapidly depletes TRAF2 which becomes unavailable for assembly with the TNF-TNFR1 complex [6, 26]. We could speculate that in responder patients, the IFX-induced shedding of sIL-15R $\alpha$  could release TRAF2 and restore its availability for the TNF-TNFR1 complex which in turn induces cell apoptosis.

In conclusion, our results demonstrate that, in CD patients IL-15 and its soluble receptor are implicated in part in the inflammatory cascade. The therapeutic effect is in part related to its regulatory effects on IL-15 system. They also suggest that patients resistant to IFX exhibit a defect in the mechanisms leading to the secretion of the IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex. This defect remains unexplained but could implicate the metalloproteinase pathways responsible for the shedding of sIL-15R $\alpha$ .

### Competing interests

The authors have no conflicting financial interests.

### Acknowledgment

This work was supported, in part, by INSERM, The Ligue contre le cancer, the CNRS, the Association de la Recherche Contre le Cancer for G.B and E.M.

## References

- 1 Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**:353-66.
- 2 Friedmann E, Hauben E, Maylandt K, *et al.* SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol* 2006;**8**:843-8.
- 3 Kirchner S, Holler E, Haffner S, *et al.* Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes. *Cytokine* 2004;**28**:67-74.
- 4 Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, *et al.* Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. *Gastroenterology* 2005;**128**:376-92.
- 5 Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, *et al.* Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis* 2007;**13**:1323-32.
- 6 Bulfone-Pau SS, Bulanova E, Pohl T, *et al.* Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain. *FASEB J* 1999;**13**:1575-85.
- 7 Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, *et al.* Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med* 1997;**3**:1124-8.
- 8 Mortier E, Bernard J, Plet A, *et al.* 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**:1681-8.
- 9 Mullberg J, Durie FH, Otten-Evans C, *et al.* A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J Immunol* 1995;**155**:5198-205.
- 10 Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, *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**:40368-75.
- 11 Kirman I, Nielsen OH. Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1996;**91**:1789-94.
- 12 Nishiwaki T, Ina K, Goto H, *et al.* Possible involvement of the interleukin-15 and interleukin-15 receptor system in a heightened state of lamina propria B cell activation and differentiation in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005;**40**:128-36.
- 13 Sakai T, Kusugami K, Nishimura H, *et al.* Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;**114**:1237-43.
- 14 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, *et al.* IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 2000;**164**:3608-15.
- 15 Obermeier F, Hausmann M, Kellermeier S, *et al.* IL-15 protects intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 2006;**36**:2691-9.
- 16 Bernard J, Harb C, Mortier E, *et al.* Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *J Biol Chem* 2004;**279**:24313-22.
- 17 Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986;**95**:99-105.
- 18 Dideberg V, Theatre E, Farnir F, *et al.* The TNF/ADAM 17 system: implication of an ADAM 17 haplotype in the clinical response to infliximab in Crohn's disease. *Pharmacogenet Genomics* 2006;**16**:727-34.
- 19 Duitman EH, Orinska Z, Bulanova E, *et al.* 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* 2008;**28**:4851-61.
- 20 Mortier E, Woo T, Advincula R, *et al.* IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 2008;**205**:1213-25.
- 21 Kageyama Y, Takahashi M, Torikai, *et al.* Treatment with anti-TNF-alpha antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2007;**4**:505-9.
- 23 Yoshihara K, Yamada H, Hori A, *et al.* IL-15 exacerbates collagen-induced arthritis with an enhanced CD4+ T cell response to produce IL-17. *Eur J Immunol* 2007;**37**:2744-52.
- 24 Boirivant M, Marini M, Di Felice G, *et al.* Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999;**116**:557-65.
- 25 Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cinque B, *et al.* Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 2004;**53**:70-7.
- 26 Pereno R, Gaggero A, Scudeletti M, *et al.* IL-15/IL-15R alpha intracellular trafficking in human cells and protection from apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**876**:236-45.

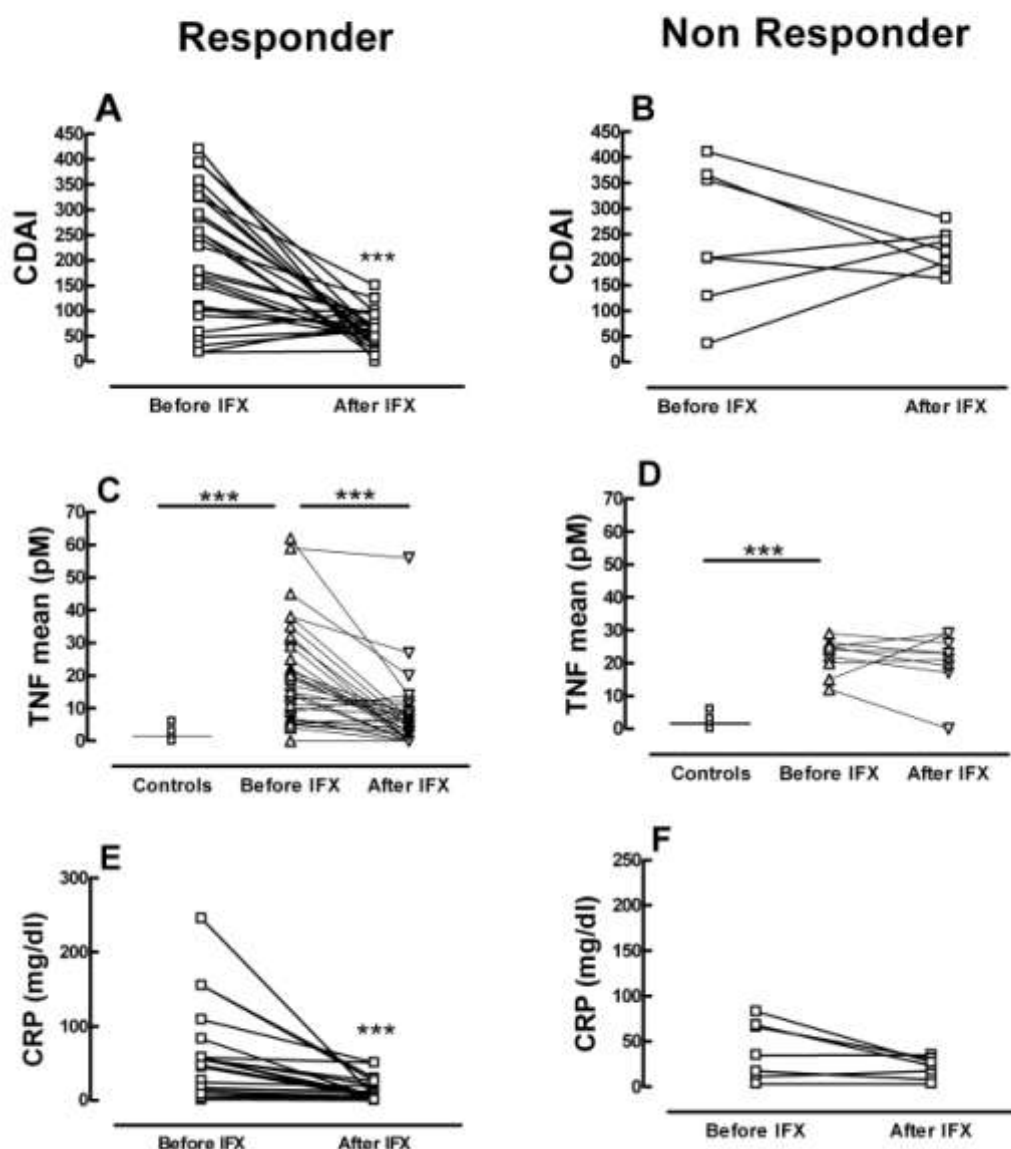
## Figures and legends

**Table 1:** clinical and demographic characteristics of the patients at baseline.

|                                           |             |
|-------------------------------------------|-------------|
| <b>Patients (n)</b>                       | <b>40</b>   |
| Sex ratio (male/female)                   | 12/28       |
| Mean age - years (SD)                     | 37.8 (14.1) |
| Mean duration of the disease - years (SD) | 8.7 (7.4)   |
| Tobacco use (%)                           | 52          |
| Location of the disease – n (%)           |             |
| Ileum                                     | 2 (5.0)     |
| Colonic                                   | 25 (62.5)   |
| Ileo-colonic                              | 13 (32.5)   |
| Perineal <sup>a</sup>                     | 11 (27.5)   |
| Type of the disease – n (%)               |             |
| Non-stricturing and non-penetrating       | 34 (85)     |
| Stricturing                               | 6 (15)      |
| penetrating                               | 0 (0)       |
| Resection – n (%)                         | 12 (30)     |
| Treatment – n (%)                         |             |
| Corticosteroids alone                     | 3 (7.5)     |
| Immunosuppressors alone                   | 30 (75.0)   |
| Corticosteroids and immunosuppressors     | 6 (15)      |

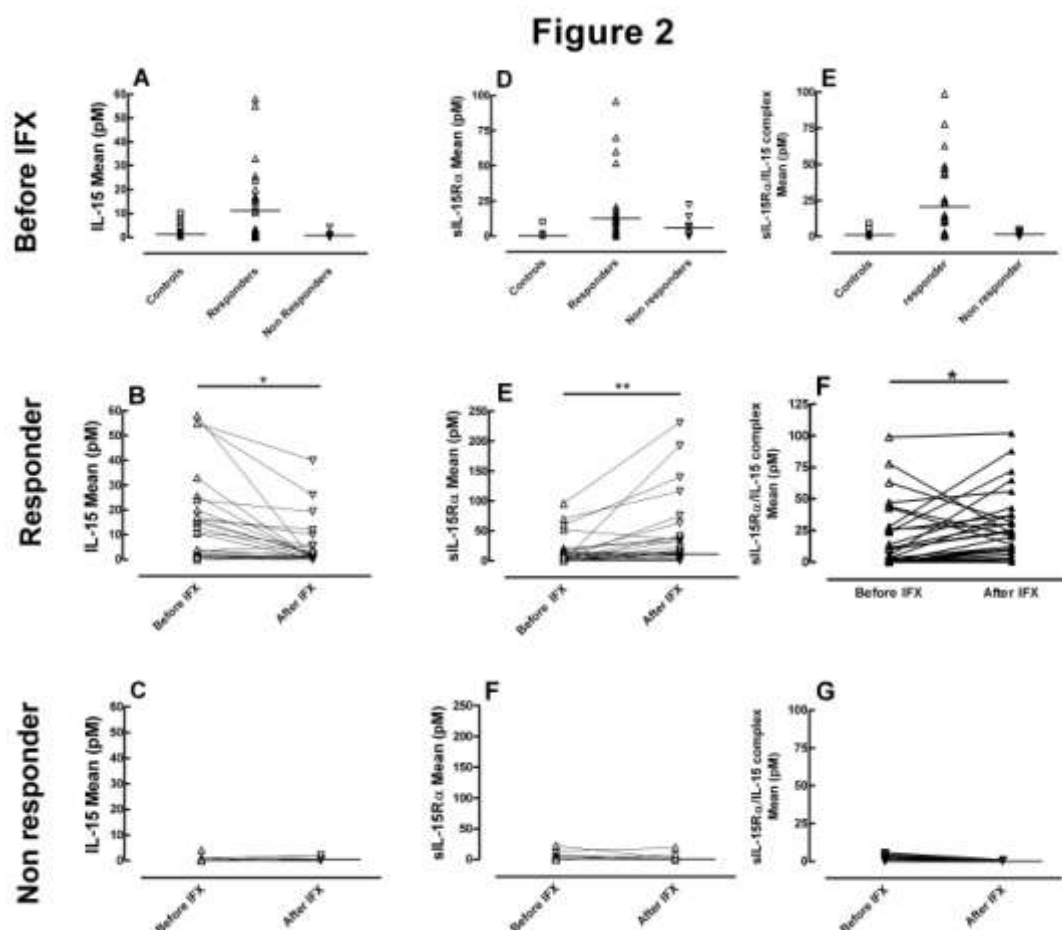
<sup>a</sup> perineal disease is not exclusive and can be associated with other locations.

Figure 1



**Figure 1:** Clinical and biological markers of activity. The CDAI scores were calculated before and after IFX in CD patients. Total TNF $\alpha$  and CRP levels were measured in the sera of 40 CD patients before and after 3 infusions of IFX and in 37 healthy controls. In responder patients (A,C,E panels), CDAI scores (A), TNF (C) and CRP (E) levels were significantly higher compared to controls and decreased after 3 infusions of IFX. To the opposite, in non-responder patients (B, D, F panels), the CDAI scores (B), TNF levels (D) and CRP (F) which were significantly higher before the treatment compared to controls remained elevated after the treatment. \*\*\*  $P < 0.001$ .

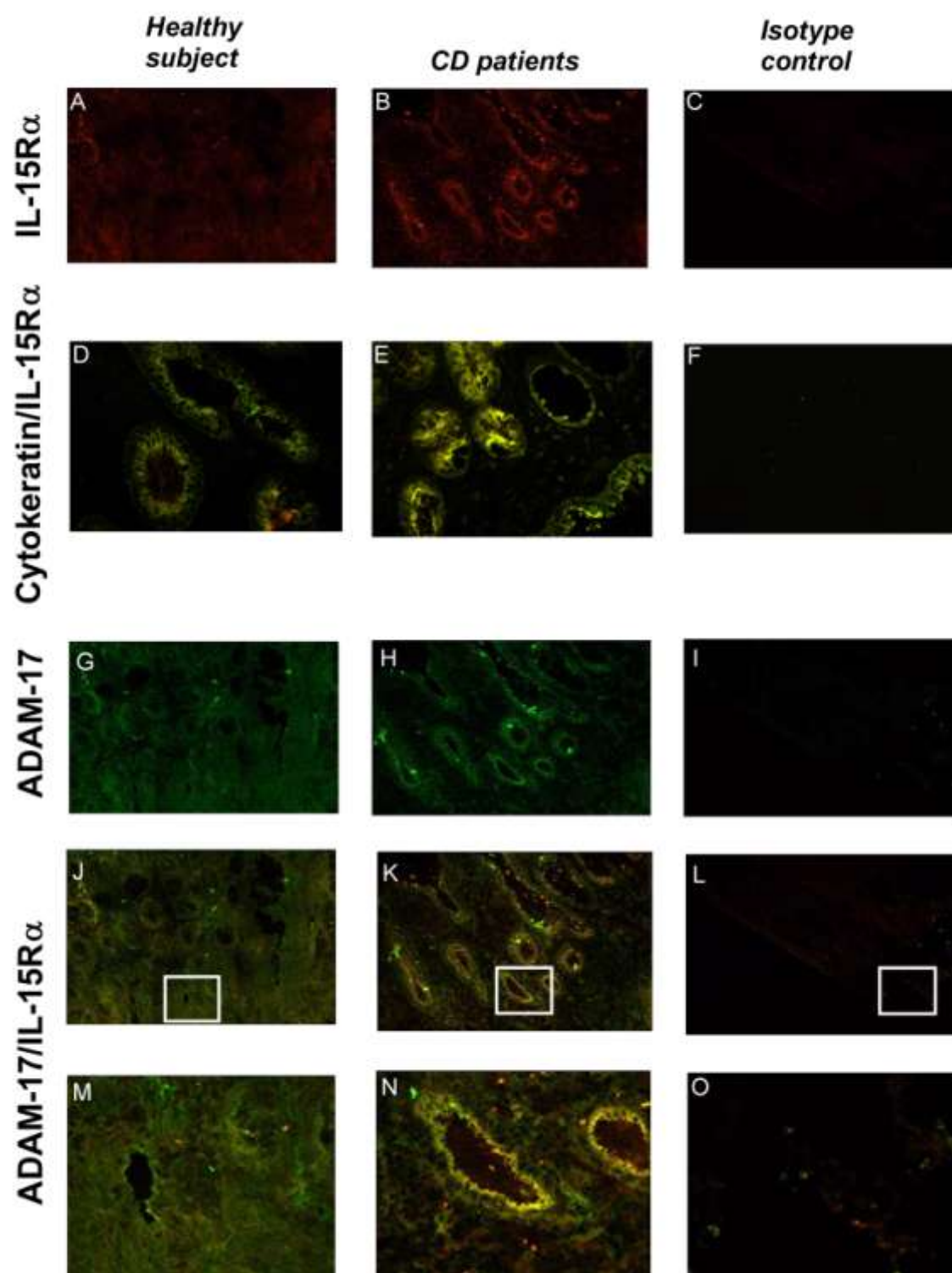




**Figure 2:** IL-15, sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex levels in the serum of CD patients before and after 3 infusions of IFX. Before IFX, IL-15 levels were significantly higher than in healthy controls in responder patients. To the opposite, in non-responder patients, IL-15 levels were comparable to those of the controls (A). During IFX treatment, IL-15 level increase in responder patients (B) but remained stable in non responder patients (C). sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex levels in the serum of CD patients before IFX (D and E) were significantly higher than in healthy controls in responder patients and comparable to those of the controls in non responder patients (D and E). sIL-15R $\alpha$  and IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex levels increased significantly after 3 infusions of IFX in responder patients (E and F). To the opposite, in non-responder patients (F and G), sIL-15R $\alpha$  and complex levels were not modified after IFX.

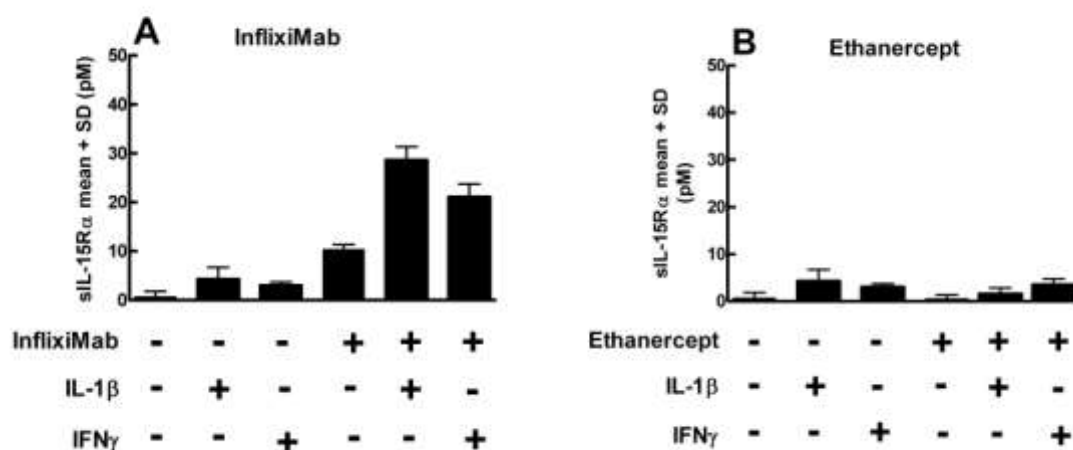
\* P < 0.05

Figure 3



**Figure 3:** Cellular expression of IL-15R $\alpha$  (in red) in healthy controls (A) and on colonic biopsies obtained from CD patients before IFX (B). The cellular expression of IL-15R $\alpha$  was higher in CD patients compared to healthy controls (A and B). IL-15R $\alpha$  is also co-localized with cytokeratin (E) in CD patients and not in Healthy control (D). Cellular expression of ADAM17 (in green) in healthy controls (G) and on colonic biopsies obtained from CD patients before IFX (H). The cellular expression of ADAM17 was higher in CD patients compared to healthy controls (G and H). ADAM17 is also co-localized with IL-15R $\alpha$  (K and N) in CD patients and not in healthy control (J and M). Immunostaining was specific for IL-15R $\alpha$  and ADAM-17 as shown by Isotype-matched antibodies used as negative controls (C and I).

Figure 4



**Figure 3:** sIL-15R $\alpha$  secretion by epithelial cell line HT-29. (A) Cells were cultured in medium supplemented with IFX with or without IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$ . sIL-15R $\alpha$  secretion increased significantly when cells were cultured in the presence of IFX compared to the cells cultured in absence of IFX. The sIL-15R $\alpha$  secretion was significantly upper when cells were pre-incubated with IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$  before IFX treatment compared to cells cultured in the presence of IFX alone. (B) Cells were cultured in medium supplemented with Ethanercept with or without IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$ . sIL-15R $\alpha$  secretion was not modified when cells were cultured in the presence of IL-1 $\beta$  or IFN $\gamma$  alone compared to control cells or supplemented with ethanercept.

### III. Le sIL-15R $\alpha$ dans les cancers de la tête et du cou

#### A. Résumé.

L'interleukine-15 est une cytokine proinflammatoire capable d'induire la production d'autres cytokines inflammatoires comme l'IL-6, le TNF $\alpha$ , l'IL-15.... Il existe une corrélation entre un taux élevé d'IL-15 intratumorale et un mauvais pronostic de survie dans les cancers du poumon et de la tête et du cou. Le but de cette étude est d'évaluer le rôle de la chaîne  $\alpha$  soluble du récepteur à l'IL-15 (sIL-15R $\alpha$ ) dans les cancers tête/cou. Le sIL-15R $\alpha$  a été dosé dans le sérum de 53 patients au diagnostic du cancer. Une augmentation du taux de sIL-15R $\alpha$  chez les patients atteints de cancer tête/cou par rapport aux sujets sains est observée et corrélée avec un mauvais pronostic de survie que se soit en terme de survie ou au niveau locorégional et cela même en analyse multivariée. Nous avons également montré une corrélation entre les concentrations sériques de sIL-15R $\alpha$  et l'expression d'ADAM-17 suggérant que le sIL-15R $\alpha$  est majoritairement produit par les cellules tumorales après clivage de la forme membranaire par ADAM-17. De manière surprenante, le sIL-15R $\alpha$  n'agit pas *in vitro* comme antagoniste de l'activité de l'IL-15 mais plutôt comme agoniste en augmentant l'induction de cytokines proinflammatoire par l'IL-15 comme l'IL-6, le TNF $\alpha$  ou l'IL-17 permettant ainsi une progression tumorale. Ce mécanisme d'échappement basé sur l'amplification de l'environnement inflammatoire intratumorale ne semble pas être spécifique du cancer de la tête et du cou car d'autres cellules tumorales sécrètent du sIL-15R $\alpha$ .

## B. Introduction

L'IL-15 est considéré comme une cytokine proinflammatoire du fait qu'elle induit des la production d'autres cytokines comme l'IL-6, le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-17.... L'IL-15 est également importante pour la fonction et la survie des cellules T (Waldmann *et al.* 2006) ainsi que par son pouvoir anti-apoptotique sur les lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  (Bulfone-Paus *et al.* 1997 ; Yajima *et al.* 2006). L'IL-15 lie un récepteur trimérique avec une forte affinité composée d'une chaîne  $\alpha$  et de deux chaînes partagées avec l'IL-2 : IL-15R $\beta/\gamma$ c. L'IL-15R $\alpha$  peut *transprésenter* l'IL-15 aux cellules exprimant les chaînes IL-15R $\beta/\gamma$ c mais pas l'IL-15R $\alpha$  (Dubois *et al.* 2002). Dans des modèles précliniques, l'IL-15 exerce une activité anti-tumorale médié par les lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  et les NK (Kobayashi *et al.* 2005). L'IL-15 augmente également l'activité anti-tumorale des lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  transférés *in vivo* (Klebanoff *et al.* 2004). Chez l'humain, des études cliniques décrivent une corrélation entre une forte concentration d'IL-15 intra-tumorale et un mauvais pronostic de survie pour des patients atteints de cancer du poumon ou de cancer tête/cou (Nguyen *et al.* 2007 ; Seiki *et al.* 2007). Dans les cancers de la tête et du cou une augmentation des concentrations sériques des cytokines proinflammatoires et une forte infiltration de cellules immunitaires inflammatoires s'associent avec un mauvais pronostic de survie. Les molécules capables d'inhiber la production de telles molécules améliorent la progression de la maladie. Du fait de la présence de l'IL-15 dans ces tumeurs, la présence d'un régulateur spécifique de l'IL-15 pouvant moduler sa fonction semble probable. Le sIL-15R $\alpha$  peut avoir une fonction antagoniste en entrant en compétition avec le récepteur membranaire IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ c pour l'IL-15. Nos études ont mis en évidence une augmentation du sIL-15R $\alpha$  dans les séra des patients atteints de cancer tête/cou corrélée avec un mauvais pronostic de survie.

## C. Résultats

Nous avons observé une augmentation significative de la concentration de sIL-15R $\alpha$  dans les sérums de patients atteints de cancer tête/cou au diagnostic avant toute thérapie par rapport à ceux de sujets sains. En effet, la concentration en sIL-15R $\alpha$  chez ces patients est de 5,8 pM en moyenne et de 0,35 pM chez les témoins. En revanche, nous n'avons pas détecté d'IL-15 dans le sérum de ces patients.

Pour étudier la signification clinique de la dérégulation du sIL-15R $\alpha$  dans ce type de cancer, nous avons étudié la valeur pronostic du sIL-15R $\alpha$ . En effet, le taux de sIL-15R $\alpha$  est corrélé avec la survie globale et locorégionale. En effet, même en considérant le taux de sIL-15R $\alpha$  comme une variable continue, ce taux est corrélé positivement avec une survie plus courte et négativement avec le contrôle locorégional. Le taux de survie à 12 mois de ces patients est de 89% pour les patients chez lesquels le sIL-15R $\alpha$  est absent dans leur sérum et de 69% là où il est détecté. En analyse multivariée, incluant le grade de la tumeur grâce à la graduation TNM (Tumor-Node-Metastasis) et le sIL-2R $\alpha$  (Tartour *et al.* 2001), nous avons montré que le seul facteur de pronostic indépendamment relié au contrôle locorégional est le taux de sIL-15R $\alpha$  sérique ( $P = 0.0065$ ; risque 1.078). En analyse multivariée de Cox, le taux de sIL-15R $\alpha$  influence la probabilité de survie globale.

Les différences observées dans le taux de sIL-15R $\alpha$  sérique entre les patients et les sujets sains suggèrent que le sIL-15R $\alpha$  pourrait être issu des cellules tumorales. Nos résultats ont effectivement montré que les lignées cellulaires dérivées de cellules cancéreuses de carcinomes tête/cou produisent de fortes concentrations de sIL-15R $\alpha$ . Cette sécrétion est augmentée par le PMA-Ionomycine. Contrairement à d'autres tumeurs, ces cellules ne sécrètent ni n'expriment l'IL-15. L'expression de l'IL-15R $\alpha$  par ces cellules tumorales *in vitro* et *in situ* sur des biopsies de patients révèle que ces cellules expriment deux transcrits d'IL-15R $\alpha$  : un correspondant au sIL-15R $\alpha$  de 564 paires de bases et un correspondant au sIL-15R $\alpha\Delta 3$  de 464 paires de bases. Les deux mêmes isoformes ont été retrouvées dans des PBMC. La caractérisation de ces deux isoformes révèle que la forme totale du sIL-15R $\alpha$  est la forme prédominante détectée dans les PBMC et les cellules tumorales. La cytométrie en flux confirme l'expression de l'IL-15R $\alpha$  par ces cellules tumorales. L'expression de l'IL-15R $\alpha$  a ensuite été vérifiée *in vivo* sur des biopsies de

patients. Les biopsies issues de patients sont clairement marquées par les anticorps anti-IL-15R $\alpha$  alors que les épithéliums normaux, quant à eux, n'expriment pas l'IL-15R $\alpha$ .

La libération de l'IL-15R $\alpha$  sous forme soluble est réalisée par clivage protéolytique impliquant des métalloprotéases dont ADAM-17 (Budagian *et al.* 2004). Nous nous sommes alors posé la question si les cellules tumorales exprimaient cette métalloprotéase. Le marquage des cellules tumorales et des biopsies révèle la présence d'ADAM-17 colocalisé avec l'apancytokeratine utilisé pour identifier les cellules tumorales. De plus, il existe une corrélation entre le taux de sIL-15R $\alpha$  et l'expression d'ADAM-17 dans les tumeurs. Ces résultats suggèrent qu'ADAM-17 exprimé par la tumeur est impliqué dans la génération de sIL-15R $\alpha$  *in vivo*.

Le rôle du sIL-15R $\alpha$  sur l'activité de l'IL-15 a été testé *in vitro* dans différents modèles. Nos résultats montrent que le sIL-15R $\alpha$  n'agit pas comme un antagoniste de l'IL-15 mais plutôt comme agoniste en augmentant la prolifération induite par l'IL-15 sur les lymphocytes T CD8 $^{+}$  purifiées. En effet, de faibles doses d'IL-15 (10ng/ml) n'induisent pas de sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 ou le TNF $\alpha$  par les PBMC humains alors que l'ajout de sIL-15R $\alpha$  augmentent considérablement la sécrétion de ces cytokines.

La production d'IL-17, cytokine proinflammatoire et protumorale, par une sous-population de lymphocyte T CD4 $^{+}$  (Cellule Th17), est régulée par l'IL-15. Nous avons alors testé le rôle du sIL-15R $\alpha$  dans l'induction d'IL-17. La production d'IL-17 requiert de forte dose d'IL-15 (100ng/ml) mais, comme pour l'IL-6 ou le TNF $\alpha$ , l'ajout de sIL-15R $\alpha$  augmente la sécrétion d'IL-17. Ces résultats semblent être transposable *in vivo*, du fait que les ARNm codant pour l'IL-15, le sIL-15R $\alpha$ , l'IL-6 et le TNF $\alpha$  peuvent être exprimé par la même biopsie de patients cancer tête/cou.



## **D.Article III**

### **The Soluble A Chain of Interleukin-15 Receptor: A Proinflammatory Molecule Associated with Tumor Progression in Head and Neck Cancer**

**(BOUCHAUD G. *et al.*, (2008) *Cancer. Res.* 68 (10): 3907-14)**

(C. Badoual, G. Bouchaud and N.E.H. Agueznay contributed equally to this work)

## The Soluble $\alpha$ Chain of Interleukin-15 Receptor: A Proinflammatory Molecule Associated with Tumor Progression in Head and Neck Cancer

Cécile Badoual,<sup>1,2</sup> Grégory Bouchaud,<sup>3</sup> Nour El Houda Aguezny,<sup>1</sup> Erwan Mortier,<sup>4</sup> Stéphane Hans,<sup>3</sup> Alain Gey,<sup>4</sup> Fahima Fernani,<sup>1,4</sup> Séverine Peyrard,<sup>5</sup> Pierre Laurent-Puig,<sup>6</sup> Patrick Bruneval,<sup>2</sup> Xavier Sastre,<sup>7</sup> Ariane Plet,<sup>8</sup> Laure Garrigue-Antar,<sup>8</sup> Françoise Quintin-Colonna,<sup>1</sup> Wolf H. Fridman,<sup>4</sup> Daniel Brasnu,<sup>3</sup> Yannick Jacques,<sup>9</sup> and Eric Tartour<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>EA 4054 Université Paris Descartes, Faculté de Médecine; Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France; <sup>2</sup>Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Européen Georges Pompidou; <sup>3</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Hôpital Européen Georges Pompidou; <sup>4</sup>Service d'Immunologie Biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou; <sup>5</sup>Centre d'Investigations Cliniques, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris; <sup>6</sup>Université Paris Descartes, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S775; <sup>7</sup>Service d'Anatomie Pathologique, Institut Curie, Paris, France; and <sup>8</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 892, Groupe de Recherche Cytokines et Récepteurs, Institut de Biologie, Nantes, France

### Abstract

Interleukin (IL)-15 is a proinflammatory cytokine, as it induces the production of inflammatory cytokines [IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-17, etc.]. A correlation between high intratumoral IL-15 concentrations and poor clinical outcome in lung and head and neck cancer patients has been recently reported. The purpose of this study was to investigate the role of the soluble  $\alpha$  chain of IL-15 receptor (sIL-15R $\alpha$ ), a natural regulator of IL-15, in head and neck cancer. Fifty-three newly diagnosed untreated head and neck cancer patients were included in this study. Quantification of sIL-15R $\alpha$  was performed with a newly developed RIA. Increased serum sIL-15R $\alpha$  concentrations were found in head and neck cancer patients and were closely correlated with poor clinical outcome both in terms of locoregional control and survival even on multivariate analysis. sIL-15R $\alpha$  was mainly produced by tumor cells via proteolytic cleavage of IL-15R $\alpha$  mediated by ADAM-17. A correlation was observed between ADAM-17 expression in tumor cells and serum sIL-15R $\alpha$  concentrations. Surprisingly, sIL-15R $\alpha$  did not act *in vitro* as an IL-15 antagonist but rather as an enhancer of IL-15-induced proinflammatory cytokines (IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-17) that may promote tumor progression. This new tumor evasion mechanism based on amplification of the intratumoral inflammatory reaction is probably not restricted to head and neck cancer, as other tumors have been shown to release sIL-15R $\alpha$ . Overall, these results support for the first time an original protumor role of sIL-15R $\alpha$  in cancer. [Cancer Res 2008;68(10):3907–14]

### Introduction

Interleukin (IL)-15 is considered to be a proinflammatory cytokine, as it induces the production of cytokines [IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-17, etc.], which play a role in various inflammatory processes (1–3). IL-15 is also a critical cytokine for

*in vivo* T-cell survival and function (4). It promotes the survival of CD8<sup>+</sup> T cells by protecting them from apoptosis (5, 6). IL-15 binds to the IL-15 receptor (IL-15R)  $\alpha$  chain with high affinity, and this chain, together with the IL-2 receptor (IL-2R)  $\beta$  chain and the IL-2R $\gamma$  chain subunits, constitutes a trimetric receptor for IL-15. IL-15R $\alpha$  can present IL-15 *in trans* to cells that express IL-2/IL-15R $\beta$  and IL-15R $\gamma$  but not IL-15R $\alpha$  (7). In preclinical models, IL-15 displays antitumor activity mainly mediated by CD8<sup>+</sup> T cells and natural killer (NK) cells (8, 9). In mice bearing leukemia, IL-15 abrogated tolerance of endogenous CD8<sup>+</sup> T cells and the rescued cells became effective in treating leukemia (10). IL-15 can also improve the *in vivo* antitumor activity of adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cells (11). In contrast, in other murine models, chronic stimulation of the IL-15 pathway led to the development of hematologic malignancies (12, 13). In humans, recent clinical studies reported a correlation between high intratumoral IL-15 concentrations and poor clinical outcome in patients with lung or head and neck cancers (14, 15). Head and neck cancer is heavily infiltrated by inflammatory immune cells (16). Head and neck cancer patients with increased serum concentrations of proinflammatory cytokines (IL-6, etc.), some of them regulated by IL-15, during the course of the disease have a poor survival (17). Molecules with the ability to inhibit the production of these cytokines improve the natural history of head and neck cancer (18). Because IL-15 is expressed in head and neck cancer and is associated with poor prognosis in these patients, we looked for the presence of specific regulator of IL-15 that may help to better understand its activity with the aim to modulate its function. We focused on soluble IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ) receptor because of the recent description of a natural soluble form of this receptor in humans and mice (19–21). In some situations, sIL-15R $\alpha$  behaves as an antagonist of IL-15 activity (19, 22, 23). We found increased concentrations of sIL-15R $\alpha$  in the serum of head and neck cancer patients, which were highly correlated with poor clinical outcome. Interestingly, sIL-15R $\alpha$  did not act as an IL-15 antagonist but rather as an enhancer of IL-15-induced proinflammatory cytokines that may promote tumor progression. Overall, these results support, for the first time, an original role of sIL-15R $\alpha$  in inflammation and cancer.

### Materials and Methods

**Patients.** Fifty-three newly diagnosed untreated patients with primary histologically proven head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) were included in this prospective study. Patient characteristics are

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

C. Badoual, G. Bouchaud, and N.E.H. Aguezny contributed equally to this work. Requests for reprints: Eric Tartour, Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité d'Immunologie Biologique, 20 Rue Leblanc, 75008 Paris Cedex 15, France. Phone: 33-1-56-09-39-42; Fax: 33-1-56-09-20-80; E-mail: [eric.tartour@egp.aphp.fr](mailto:eric.tartour@egp.aphp.fr).

©2008 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6842

# Cancer Research

presented in Supplementary Table S1. Each patient's disease was staged according to the fifth edition of the International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer system for head and neck cancer. Treatment modalities consisted of surgery, alone or combined with radiotherapy and chemotherapy. This study was conducted in accordance with French laws and after approval by the local ethics committee.

**Cell lines and blood cells.** The Fadu, SCC9, Cal27, and A253 cell lines derived from HNSCCs were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured in DMEM-F12 medium (Invitrogen) supplemented with L-glutamine. All cells were grown in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in a water-saturated atmosphere. Blood cells were collected from anonymous healthy donors at the Etablissement Fran ais du Sang (EFS; Rungis, France) as buffy coat preparations after informed consent and following EFS guidelines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hypaque gradients (Sigma-Aldrich). CD8<sup>+</sup> T cells were purified by positive selection using CD8-conjugated MACS beads (Miltenyi Biotec). The purified cells were composed of 90% to 95% CD8<sup>+</sup> T cells.

**Recombinant proteins and chemical reagents.** IL-15 and recombinant extracellular domain of human IL-15R  lacking the domain encoded by exon 3 and linked to human Fc were purchased from R&D Systems. Recombinant sIL-15R  comprising the complete extracellular domain of IL-15R  was produced as follows. The plasmid corresponding to the extracellular form of IL-15R  (pFB R15 ) was generated by PCR using the sense primer 5'-CGGGATCCAGTCCAGCGGTGCTCTGTGG (nested restriction site underlined) and the antisense primer 5'-CTAGAGCGGC-CGCTTACACAGTGGTGTCTGCTGT. After amplification, the sequence was ligated between the *Bam*HI and *Not*I sites of the pFast Bac baculovirus expression vector (Invitrogen) and controlled (Genome Express). A sequence coding for the Flag epitope and Factor Xa binding site (DYKDDDDKIEGR) was added between the endogenous signal peptide and the coding sequence. The expression cassette was recombined in baculovirus DNA using the Bac to Bac expression system (Invitrogen). The recombinant baculoviruses were used to infect SF9 cells and sIL-15R  was expressed in the SF900 II medium and harvested 3 d after infection. For purification, the pH of the medium was increased to 8.5 with NaOH, and the medium was centrifuged at 10,000 × g for 15 min and filtered through a 0.45- m filter. The medium was concentrated and changed to 50 mmol/L Tris (pH 7.4) and 150 mmol/L NaCl in an Amicon chamber equipped with a 10,000 molecular weight cutoff membrane. The soluble receptor was purified on an anti-Flag-agarose affinity column (Sigma-Aldrich) and eluted with 0.1 mol/L glycine-HCl (pH 3.5). The purified protein was concentrated and the buffer was changed to PBS in Vivaspin (Sartorius). The purity of the protein was checked on Protein 200 Plus LabChip (Agilent Technologies) and Coomassie Blue-stained gel (Supplementary Fig. S1), and the concentration was determined by bicinchoninic acid (Pierce). Endotoxin levels determined by the limulus amoebocyte lysate method were <1.0 endotoxin unit/ g recombinant protein. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin were purchased from Sigma-Aldrich.

**RIA for quantification of sIL-15R .** Quantification of sIL-15R  was performed as previously described (19). Briefly, a sandwich RIA was set up in which the polyclonal goat anti-human IL-15R  antibody AF247 (R&D Systems) was used as capture antibody and radioiodinated monoclonal anti-human IL-15R  antibody M161, kindly provided by GenMab, was used as tracer. A purified recombinant sIL-15R  fusion protein as described above (24) was used as standard. AF247 was coated (5  g/mL; 50  L/well) onto high-adsorption Nunc MaxiSorp plates (breakable strips), distributed by Fisher Bioblock Scientific. Wells were saturated with 0.5% PBS-BSA for 15 min and sIL-15R -containing samples (50  L/well) were incubated for 1 h at 4°C. The M161 monoclonal antibody (mAb), iodinated using the lodogen method, was then added (1 nmol/L; 50  L/well) for 1 h at 4°C. Supernatants of each well were collected and wells were washed twice with PBS. The radioactivity associated with the wells (bound M161 fraction) and contained in the supernatants and washings (unbound M161 fraction) was determined. This assay measures with the same sensitivity, the sIL-15R  comprising the complete extracellular domain or deleted from the domain

encoded by exon 3 of IL-15R . The present assay measures sIL-15R  receptor not bound to IL-15 (19).

**Induction of cytokines.** Cells were incubated in 24-well sterile plates with various combinations of cytokines and/or sIL-15R . Supernatants were collected 24 or 72 h after stimulation. Cytokines were then measured by ELISA according to the manufacturer's recommendations. IL-6 and TNF  ELISA were obtained from Diaclone and IL-17 ELISA was purchased from Bioscience.

**Flow cytometry.** Cells diluted in 0.1% PBS-azide were incubated for 30 min at 4°C with 5  g/mL goat anti-IL-15R  (R&D Systems) or isotype-matched control mAb. They were then washed twice with PBS-azide (0.1%) and incubated for 30 min at 4°C with 3  g/mL biotinylated rabbit anti-goat antibodies (DakoCytomation). After washings, cells were incubated for 30 min at 4°C with phycoerythrin-labeled streptavidin (DakoCytomation) and then analyzed on a FACSCalibur fluorocytometer (BD Biosciences). Data were acquired and analyzed with CellQuest software.

**Immunofluorescence staining.** Tissue samples obtained before any treatment at initial endoscopy or surgery were immediately frozen and stored at -80°C. Frozen specimens were sectioned at 4 to 6  m with a cryostat, placed on slides, air dried, and fixed for 10 min with 100% acetone. Before incubation with primary antibodies, the slides were treated with avidin/biotin blocker (Vector Laboratories) and Fc receptor was blocked by human serum (5%). The antibodies used for the various immunofluorescence stainings are described in Supplementary Table S2.

The various antibodies were diluted in PBS. Isotype-matched antibodies were used as negative controls. In each case, we checked that the secondary antibodies did not cross-react with the isotype or species of the other primary antibody immunoglobulin in the double immunofluorescence technique. Fluorescent images of mounted sections were analyzed with an epifluorescent microscope DMR (Leica Microsystems). Two authors (C.B. and E.T.), blinded for clinical data, independently scored the slides in at least five fields using a 40× objective.

**Reverse transcription-PCR amplification.** Total cellular RNAs were extracted using the Tri-reagent kit from Ambion (Applied Biosystems). Two micrograms of total cellular RNAs were reverse transcribed with oligo(dT) primers using the first-strand cDNA synthesis kit (Roche Molecular Biochemicals). PCR was performed as previously described (25). The following oligonucleotides were used:  $\beta$ -actin, TCGTCGACACCGGCTCCGGCATGTGC (sense) and TTCTCCAGGGAGGAGCTGGAAGCAGC (antisense); ADAM-17, ACCTGAAGAGCTTGTTCATCGAG (sense) and CCATGAAGTGTCCGATAGATGTC (antisense); hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), CCTTGGTCAGGCAGTATAATCC (sense) and TTGATTTTGCTTTTCCAGTTTCAC (antisense); IL-15, GGA-TTTACCGTGGCTTTGAGTAATGAG (sense) and ACATTTGGACAATATGTACAAA (antisense); IL-6, ACGAATTCACAAACAAATTCGGTAC (sense) and CATCTAGATTCTTTCCTTTTCTGTC (antisense); TNF , GCGAATTCCTCTGGCCAAATGGCGTGG (sense) and CTAAGCTTGGGTTCGACCCCTAAGCCCC (antisense). Two couples of IL-15R  primers were selected. IL-15R  sense 1: CATGTCCGTGGACACAGCAG (hybridizing to cDNA sequence encoded by exon 2, nucleotides 189-209); IL-15R  antisense 1: AGGAGAGACACAGCGCTCAG (hybridizing to cDNA sequence encoded by exon 6, nucleotides 733-753); IL-15R  sense 2: GAGACCCTGCCCTGGTTCACCA (hybridizing to cDNA sequence encoded by exon 3, nucleotides 366-387); IL-15R  antisense 2: TCATAGGTGGTGGAGAGCAGT (hybridizing to cDNA sequences encoded by exon 7, nucleotides 867-886). This last couple of primers was designed to detect alternative splicing of transmembrane exon 6, which may encode sIL-15R  receptor as previously described for other soluble cytokine receptors.

**IL-15/IL-15R  cross-linking.** sIL-15R  was purified and concentrated from supernatants of tumor cell lines by affinity purification using the anti-IL-15R  mAb M161, as previously described (19). Samples (recombinant IL-15R  or purified sIL-15R  from supernatants) were incubated with iodinated IL-15 (2 nmol/L), cross-linked with the homobifunctional cross-linker EGS (Sigma-Aldrich), and subjected to 10% SDS-PAGE and autoradiography (PhosphorImager 445 SL Molecular Dynamics, Inc.).

**Statistical analysis.** Survival variables were estimated using the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test for categorical variables

and using the Cox model and the associated Wald  $\chi^2$  statistic for quantitative variables.

Multivariate analysis using the Cox proportional hazard model determined the influence of each variable, when adjusted to others, on locoregional control (relapse-free survival) and overall survival. The level of significance was set at  $P \leq 0.05$ .

Overall survival was defined as the time from initial diagnosis until death or until last follow-up (right censored data).

Locoregional control was calculated from the end of treatment and defined as the absence or either persistent or recurrent disease at the primary site or in the cervical lymph nodes. Patients with persistent disease at the end of treatment were considered to have experienced failure at time zero. Patients with no signs of relapse were censored at the time of last follow-up or death. The median follow-up for the whole population was 24 mo.

The Mann-Whitney  $U$  test was also used to assess whether samples of observations came from the same distribution.

## Results

**Increased serum sIL-15R $\alpha$  levels in patients with head and neck cancers.** A significant increase in the concentrations of sIL-15R $\alpha$  was observed in serum samples collected from head and neck cancer patients at diagnosis before therapy compared with those of healthy donors (Fig. 1). Mean concentrations of sIL-15R $\alpha$  were 5.8 pmol/L for head and neck cancer patients and 0.35 pmol/L for healthy donors. sIL-15R $\alpha$  was detected in serum in 35 of 53 (66%) head and neck cancer patients versus 15% (6 of 40) in healthy subjects ( $P < 0.0001$ ; Fig. 1). As expected, we did not detect IL-15 in the serum of these patients, as free IL-15 is rarely detectable in biological fluids.

**Prognostic value of serum sIL-15R $\alpha$  level on the locoregional control and overall survival rates in HNSCC patients.** To assess the clinical significance of sIL-15R $\alpha$  dysregulation in these cancer patients, the prognostic value of serum sIL-15R $\alpha$  levels was determined. Serum sIL-15R $\alpha$  levels were significantly correlated with both locoregional control and survival. The locoregional control rate at 12 months was 78% for head and neck patients with no detectable serum sIL-15R $\alpha$  versus only 48% for cancer patients with detectable sIL-15R $\alpha$  ( $P = 0.04$ ; Fig. 2A). When considered as a continuous variable, serum sIL-15R $\alpha$  levels were also negatively correlated with locoregional control ( $P = 0.01$ ; Fig. 2B). In addition,

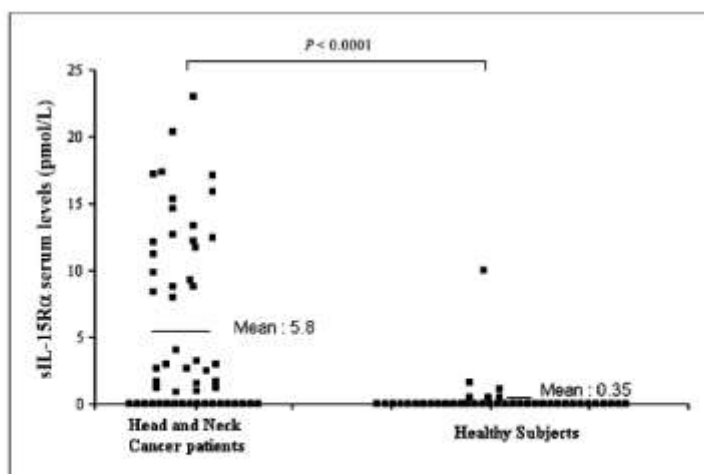
serum sIL-15R $\alpha$  levels were positively correlated with shorter survival when considered as a continuous variable ( $P = 0.003$ ; Fig. 2C). The 12-month survival rate in patients with no serum sIL-15R $\alpha$  levels was 89% versus 69% for patients with detectable sIL-15R $\alpha$  levels ( $P = 0.04$ ; Fig. 2D). Multivariate analysis, including tumor stage, tumor-node-metastasis (TNM) grading, and serum sIL-2R $\alpha$  levels considered as a powerful prognosis marker (26), showed that the only significant prognostic factor independently related to locoregional control was the serum sIL-15R $\alpha$  level ( $P = 0.0065$ ; relative risk, 1.078). On Cox multivariate analysis, only serum sIL-15R $\alpha$  levels influenced overall survival probability ( $P = 0.0059$ ; relative risk, 1.086; Supplementary Table S3).

**Head and neck tumor cells secrete sIL-15R $\alpha$  and express membrane IL-15R $\alpha$ .** The difference in sIL-15R $\alpha$  concentrations observed between cancer patients and healthy subjects led us to assess whether sIL-15R $\alpha$  may originate from tumor cells. We showed that, *in vitro*, tumor cell lines derived from HNSCC produced high levels of sIL-15R $\alpha$  (Fig. 3). This secretion is increased by PMA-ionomycin (Supplementary Fig. S2). In contrast with other tumors (27), these cells did not secrete or express membrane-bound IL-15 (data not shown). In contrast, statistically significant lower levels of sIL-15R $\alpha$  were secreted by resting PBMC from healthy donors compared with tumor cells ( $P < 0.01$ ; Fig. 3). Because it has been shown that murine sIL-15R $\alpha$  is generated by cleavage of membrane IL-15R $\alpha$  (19, 20), we analyzed expression of the IL-15R by these tumor cell lines *in vitro* and directly *in situ* in biopsies from head and neck cancer patients.

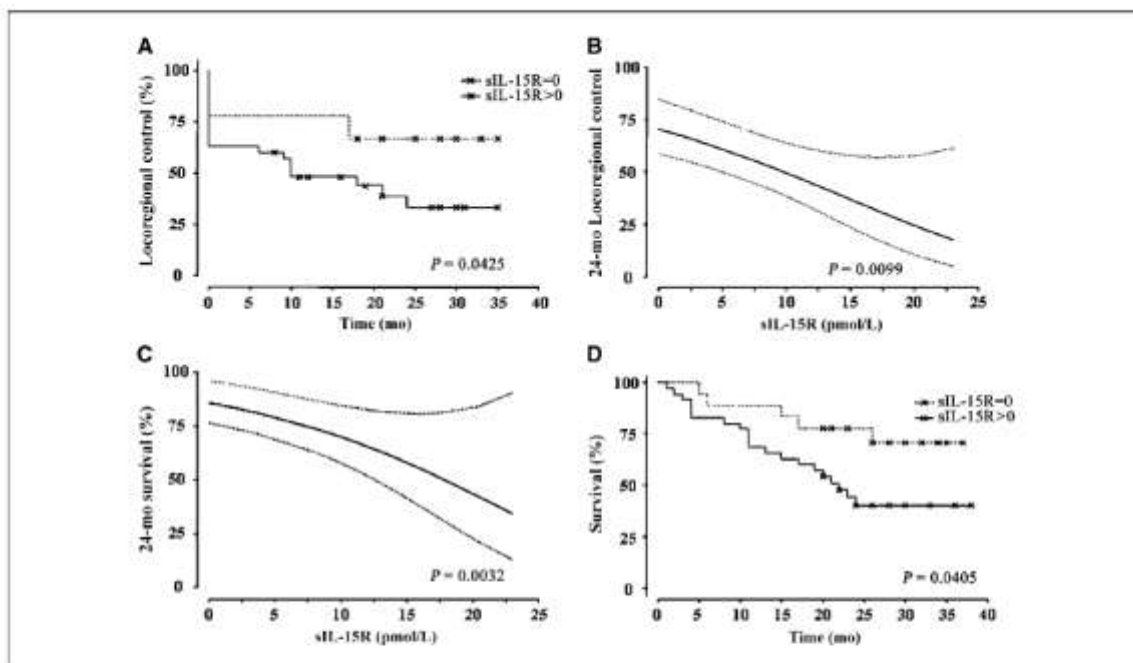
In a first series of experiments, we showed that tumor cell lines expressed two transcripts of IL-15R $\alpha$  mRNA (Fig. 4A). These PCR products were eluted and sequenced. The 564-bp PCR product corresponded to the wild-type isoform comprising the full ectodomain of IL-15R $\alpha$ . The 464-bp PCR product was derived from an isoform with deletion of the exon 3 of IL-15R $\alpha$  mRNA (Fig. 4A). The same isoforms of IL-15R $\alpha$  were present in PBMC (Fig. 4A). Characterization of the sIL-15R $\alpha$  protein showed that the wild-type isoform not deleted from domain encoded by exon 3 was the predominant form detected in the supernatant of these tumor cells (Supplementary Fig. S3A).

Fluorescence-activated cell sorting analysis confirmed the membrane expression of IL-15R $\alpha$  by these tumor cell lines

**Figure 1.** Increased serum levels of sIL-15R $\alpha$  in patients with head and neck cancers. sIL-15R $\alpha$  concentrations were determined using a RIA assay in serum samples from 53 head and neck cancer patients collected at diagnosis before the start of therapy. Forty serum samples from healthy donors were included as controls.







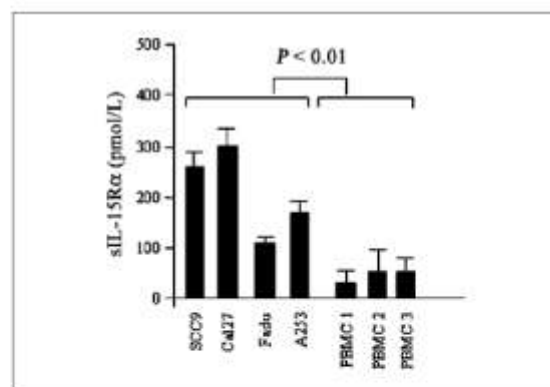
**Figure 2.** Locoregional control and survival at 24 mo for patients with HNSCC in relation to their serum sIL-15Rα levels. A and B, relationships between locoregional control and serum sIL-15Rα levels. C and D, correlation between survival and serum sIL-15Rα levels. B and C, dashed lines, upper and lower 95% confidence interval.

(Fig. 4B). To assess the *in vivo* relevance of these results, tissues from head and neck cancer patients or normal mucosae were stained with anti-IL-15Rα antibodies. Tumor cells were clearly labeled with anti-IL-15Rα antibodies (Fig. 4C, left). This expression of IL-15Rα was found in 17 of 48 tumors tested. In contrast, normal epithelium did not significantly express IL-15Rα (Fig. 4C, right). It should be noted that isolated cells with a macrophage morphology in both tumor stroma and normal mucosa also seemed to express IL-15Rα (Fig. 4C).

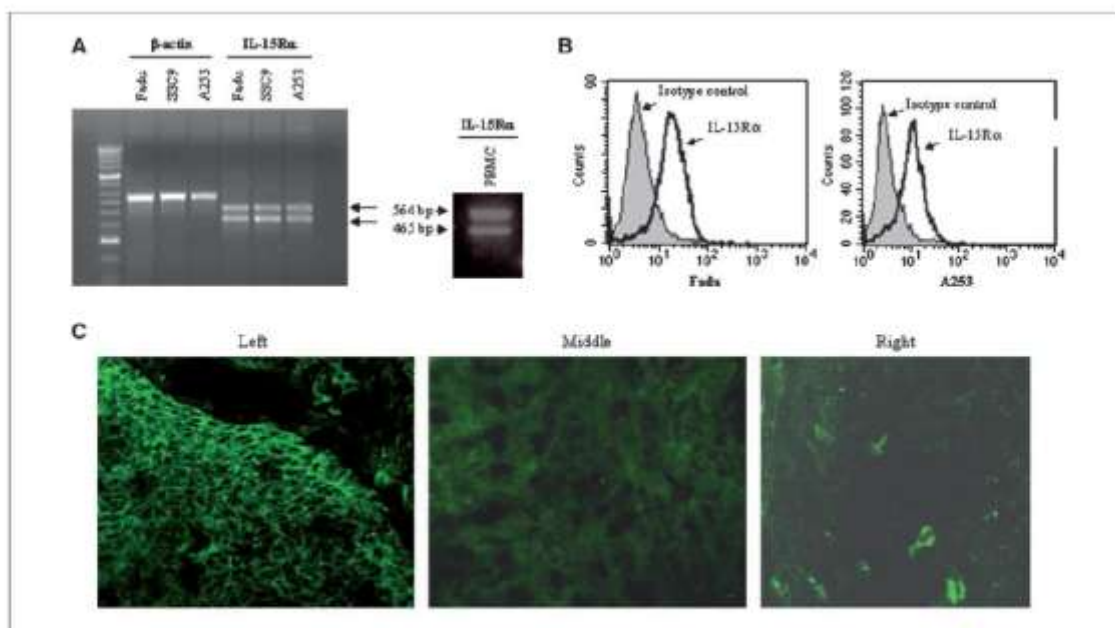
As it has been reported that ADAM-17 was responsible for the cleavage of IL-15Rα (20), we wondered whether tumor cells expressed this metalloproteinase. Reverse transcription-PCR analysis showed mRNA expression of ADAM-17 in all three head and neck tumor cell lines tested (Fig. 5A). Double immunofluorescence analysis on fresh biopsies of head and neck cancers extended this result to cancer tissues. Tumor cells were clearly costained with anti-AE1/AE3 antibodies (Fig. 5B, middle and right), a pancytokeratin marker used to identify tumor cells, and anti-ADAM-17 (Fig. 5B, left and right).

Using primers overlapping the transmembrane exon to track putative alternative splicing of this exon to generate mRNA encoding sIL-15Rα, no specific mRNA for sIL-15Rα was detected (Supplementary Fig. S2B). In addition, as previously shown in murine models (19, 20), ADAM-17 small interfering RNA (siRNA) partially inhibited the release of sIL-15Rα in supernatants of head and neck tumor cell lines (Supplementary Fig. S4). Overall, these results support previous data obtained in murine model that sIL-15Rα released by tumor cells is produced by cleavage of IL-15Rα mediated by ADAM-17 (20).

In addition, a significant correlation was found between ADAM-17 expression in tumors and serum sIL-15Rα levels, as the mean serum sIL-15Rα concentration was 1.35 pmol/L when ADAM-17 was expressed by <50% of tumor cells, whereas this concentration increased to 8.65 pmol/L in patients with high tumor expression of ADAM-17 (Supplementary Table S4). No correlation was found between serum sIL-15Rα concentration and IL-15Rα expression by



**Figure 3.** Head and neck cancer cell lines produced high levels of sIL-15Rα. Head and neck cancer cells (SCC9, Cal27, Fadu, and A253) and three PBMCs derived from healthy donors were cultured for 24 h. Supernatants were then collected and sIL-15Rα was measured by a RIA assay. All measurements were performed in duplicate and each experiment was performed twice.



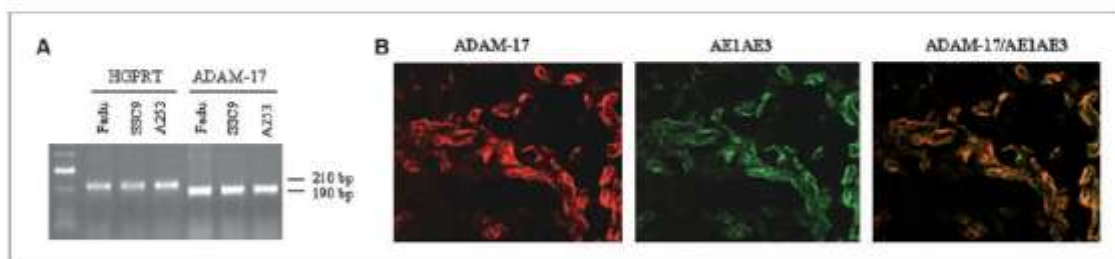
**Figure 4.** Tumor cells from head and neck patients express IL-15R $\alpha$ . **A**, three cDNA derived from mRNA extracted from three head and neck cell lines (Fadu, SCC9, and A253) or PBMC were amplified by PCR using oligonucleotide primers specific for  $\beta$ -actin and IL-15R $\alpha$ . Amplified PCR products were loaded onto a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide for UV visualization. **B**, two head and neck cancer cell lines (Fadu and A253) were stained with goat anti-IL-15R $\alpha$  polyclonal antibody. Polyclonal isotype control antibodies were included in each experiment. The labeling was analyzed by fluorescence-activated cell sorter. **C**, frozen tissues derived from head and neck cancer biopsies (left and middle) or normal head and neck mucosa (right) were stained with primary goat antibodies against IL-15R $\alpha$  (left and right) or normal isotype control (middle). The reaction was revealed with biotinylated rabbit anti-goat IgG and then CyTM2-labeled streptavidin.

tumor cells (data not shown). These results therefore suggest that ADAM-17 is a critical factor for the release of sIL-15R $\alpha$  *in vivo*.

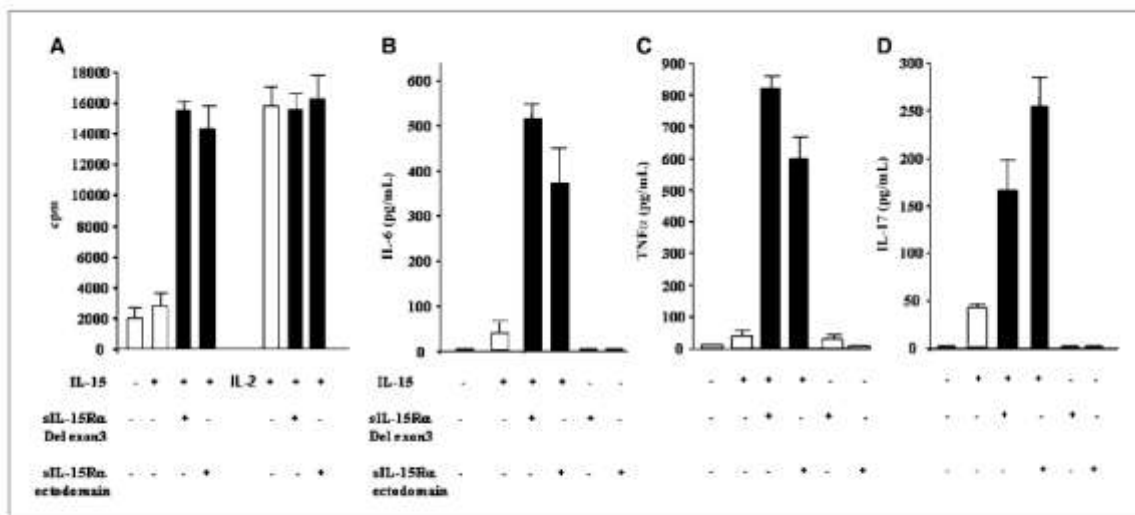
sIL-15R $\alpha$  increased IL-15 activity on the production of proinflammatory cytokines. As two sIL-15R $\alpha$  isoforms were expressed by tumor cells, although one of them was predominant at the protein level (Fig. 4; Supplementary Fig. S34), the role of these two isoforms on the modulation of IL-15 activity was tested *in vitro* in various models. IL-15 is known to play a major role on CD8 $^{+}$  T-cell survival and homeostasis, which may enhance their antitumor activity (28). Unexpectedly, both isoforms were found to increase IL-15-induced proliferation of purified CD8 $^{+}$  T cells

(Fig. 6A). This potentiation of the activity of IL-15 was seen at various doses of IL-15 ranging from 10 to 100 ng/mL (Fig. 6A; data not shown). No effect of sIL-15R $\alpha$  alone on CD8 $^{+}$  T-cell proliferation was recorded (data not shown). To check for the specificity of the action of sIL-15R $\alpha$ , these soluble IL-15Rs were shown not to have any activity on IL-2-dependent CD8 $^{+}$  T-cell proliferation (Fig. 6A).

IL-15 has been reported to increase the production of several proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF $\alpha$  (1, 2). Low doses of IL-15 up to 10 ng/mL were not efficient to induce significant levels of IL-6 and TNF $\alpha$  by human PBMC and high doses of IL-15 (100 ng/mL) were required to elicit large amounts of IL-6



**Figure 5.** Expression of ADAM-17 by head and neck cancer cells. **A**, cDNA derived from mRNA extracted from three head and neck cancer cell lines were amplified by primers specific for ADAM-17 and HGPRT. Amplified PCR products were loaded onto a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide for UV visualization. **B**, tissues derived from head and neck cancer specimens were stained with antibodies to human ADAM-17 and pancytkeratin AE1/AE3. Left and middle, results of simple immunofluorescence acquisition with each antibody; right, double immunofluorescence staining. Yellow, colocalization between the two markers recognized by the specific antibodies. Isotype control antibodies gave no staining.



**Figure 6.** sIL-15R  increased IL-15 activity on CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation and production of inflammatory cytokines. **A**, purified CD8<sup>+</sup> T cells ( $10^5$ ) were seeded on 96-well plates and cultured in medium or IL-15 (10 ng/mL) or IL-2 (1,000 IU/mL) alone (□) or in combination with sIL-15R  (350 ng/mL) comprising either the full ectodomain of sIL-15R  or deleted from the domain encoded by exon 3 (■). **B** to **D**, PBMCs ( $2 \times 10^6$ /mL) were stimulated or not with IL-15 (10 ng/mL (**B** and **C**) or 100 ng/mL (**D**)) in combination with the two kinds of sIL-15R  described in **A**. Seventy-two hours later, supernatants were collected and concentrations of IL-6 (**B**), TNF  (**C**), and IL-17 (**D**) were measured by ELISA. These results are representative from three experiments performed with three different PBMCs.

and TNF  (Fig. 6B and C; data not shown). In contrast, in combination with both sIL-15R  isoforms, low doses of IL-15 (10 ng/mL) were shown to markedly increase the production of IL-6 and TNF  by PBMC (Fig. 5B and C). The secretion of these cytokines was only observed in the presence of the IL-15/sIL-15R  complex, as addition of sIL-15R  alone had no effect (Fig. 6B and C). All recombinant molecules used were tested for the absence of significant lipopolysaccharide contamination ( $<1.0$  endotoxin unit/ $\mu$ g recombinant protein). The possible role of sIL-15R  on the induction of IL-17, a proinflammatory cytokine with protumor activity (29, 30) produced by a subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells (TH 17 cells) and previously shown to be regulated by IL-15, was also assessed. As shown in Fig. 6D, high doses of IL-15 (100 ng/mL) were required to elicit weak production of IL-17, supporting previous studies reporting that CD4<sup>+</sup> T cells are less sensitive to IL-15 than other T and NK cells. sIL-15R  synergized with IL-15 to greatly enhance the secretion of IL-17. Both isoforms of sIL-15R  therefore synergized with IL-15 to enhance the release of proinflammatory cytokines. These data seem to be relevant *in vivo* as we showed that mRNA coding for IL-15, sIL-15R , IL-6, and TNF  could be expressed in the same biopsy of head and neck cancer patients (Supplementary Fig. S5).

## Discussion

This study reports increased serum sIL-15R  levels in head and neck cancer patients compared with healthy subjects. Serum sIL-15R  levels were strongly associated with poor clinical outcome both in terms of locoregional control and survival. On multivariate analysis, this biomarker was more powerful than the conventional clinical variables (TNM) used for the initial staging of head and neck cancer patients. Surprisingly, sIL-15R  did not seem to act via inhibition of IL-15 but rather as an amplifier of IL-15 activity. We showed that sIL-15R  synergized with IL-15 to

enhance the production of proinflammatory cytokines. sIL-15R  was first described as an antagonist of IL-15 (22, 23), but recent data have shown that administration of soluble IL-15/sIL-15R  complexes markedly enhanced IL-15 half-life and bioavailability *in vivo* (31–33), which supports our results. sIL-15R  does not seem to exert any synergy with IL-15 on cells expressing the high-affinity IL-15R (19). However, it promotes IL-15 action on cells expressing intermediate- or low-affinity IL-15R (34). Thus, in addition to the ability of membrane-anchored IL-15R  to present IL-15 *in trans* to neighboring cells during cell-to-cell contact (7), IL-15/sIL-15R  heterocomplexes may also perform a similar function of IL-15 transpresentation in a soluble form. Similar observations have been reported with soluble IL-6 receptors, as shedding of sIL-6Rgp80 from colon adenocarcinoma cells allowed the formation of IL-6/sIL-6R complexes, which could lead to tumor growth of colon carcinoma cells expressing gp130 but not IL-6Rgp80 (35). It should be noted that, in the present study, IL-15 alone or combined with sIL-15R  did not exert any effect on the growth of head and neck tumor cells (data not shown).

In our study, tumor cells only secreted sIL-15R  but the formation of sIL-15R -IL-15 *in situ* is expected, as high levels of IL-15 have been reported in biopsies derived from head and neck cancers (15). Because tumor cells did not seem to produce IL-15, monocytes or dendritic cells present in tumor stroma may secrete this cytokine. We could not also exclude that membrane IL-15 expressed in monocytes is the target of sIL-15R . From preclinical studies, IL-15 was considered to be an antitumor cytokine mainly due to its role in the activation of antitumor CD8<sup>+</sup> T cells promoting the expansion of CTL with high avidity (9, 10, 36). This activity of IL-15 may be not predominant in head and neck cancer patients as antitumor function of T lymphocytes is often compromised (37, 38) and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes seem to be particularly sensitive to apoptosis in these patients (39). However, sIL-15R  amplified the IL-15-induced production of various proinflammatory cytokines,

such as IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-17, which may promote tumor progression. TNF $\alpha$  and IL-6 are known to act as growth factors for many tumor cells. They are required for the development of tumors induced by chemical carcinogens. IL-6 activates signal transducers and activators of transcription 3, which blocks apoptosis of cancer cells and contributes to the tolerant state of dendritic cells in the tumor microenvironment (40). IL-17 also promotes tumor progression partly via its proangiogenesis effect (29, 30). These *in vitro* results on the role of IL-15 amplified by sIL-15R $\alpha$  in the secretion of inflammatory cytokines seem relevant with respect to the *in vivo* inflammatory environment of these head and neck cancer patients, as mean concentrations of proinflammatory cytokines, such as IL-6, are increased in these patients (41). We detected serum IL-6 levels suggesting an ongoing inflammatory reaction in some patients included in this study (data not shown). The detrimental role of these inflammatory cytokines for the host is documented by preclinical and clinical data. In mice implanted with murine head and neck tumors, orally delivered lactoferrin, an iron-binding secretory protein, inhibited tumor growth. This effect seemed to be mediated by the ability of lactoferrin to inhibit the cellular release of proinflammatory and prometastatic cytokines (18). Increased serum concentrations of proinflammatory cytokines have been correlated with poor outcome in head and neck cancer patients (17). Other activities of IL-15 that may contribute to the protumor activity of this cytokine include its role in tumor protection from apoptosis, its action on vascular endothelial cells to induce angiogenesis, and its ability to enhance cell motility and invasiveness of cancer cells (42). This protumor role of IL-15, possibly amplified by sIL-15R $\alpha$ , has been supported by recent clinical prognostic results. Using microarray analysis, expression of IL-15 in biopsies of oral cancer was associated with the development of metastasis in these patients (15).

More generally, murine models and epidemiologic studies have established that chronic inflammation caused by infectious microorganisms or chemical irritants orchestrates a tumor-supporting microenvironment that is indispensable in the neoplastic process (43–45). Recent reports suggest that inflammatory cytokines are more likely to contribute to tumor growth and progression than to mount an effective host antitumor immune response (46, 47), as also suggested by this study, where IL-15-sIL-15R $\alpha$  complex seemed to be an important player coordinating the induction of the proinflammatory cascade.

As previously reported for other cytokines (47), IL-15 could be considered to be ambivalent cytokine in the modulation of tumor growth with a fine balance between antitumor activities mainly mediated by CD8 $^{+}$  T and NK cells and protumor activities mediated by amplification of inflammatory reactions.

The increased concentrations of sIL-15R $\alpha$  in head and neck cancer patients could be explained by the release of sIL-15R $\alpha$  by tumor cells. Tumor cells express IL-15R $\alpha$  *in vitro* and *in vivo*.

Expression of this receptor was not found in normal corresponding mucosa, suggesting dysregulation of the expression of this receptor with malignant transformation. An increased expression of IL-15R $\alpha$  by epithelial cells in benign prostatic hyperplasia compared with normal prostate has also been previously observed (48).

With respect to the mechanisms of sIL-15R $\alpha$  production, its release seems to be dependent on proteolytic cleavage, as no mRNA was detected with alternative splicing of transmembrane exon encoding sIL-15R $\alpha$ . Recently, sIL-15R $\alpha$  only comprising the Sushi domains of the receptor was shown to be generated by alternative splicing mechanism within intron 2 of IL-15R $\alpha$  in mice (21). The predicted molecular mass of this isoform was 12 kDa. We could not completely exclude the presence of a similar soluble Sushi isoform in human, although this study and others found that the human sIL-15R $\alpha$  had a molecular mass of about 42 to 45 kDa (Supplementary Fig. S3; ref. 19).

In addition, as previously described (20), various arguments converge to support the role of ADAM-17 in the shedding of sIL-15R $\alpha$ : (a) head and neck tumor cell lines and tumor cells *in situ* expressed ADAM-17, (b) ADAM-17 inhibitors decreased the *in vitro* release of sIL-15R $\alpha$  by head and neck tumor cell lines, and (c) a correlation was shown between ADAM-17 expression by tumor cells *in situ* and serum sIL-15R $\alpha$  levels. ADAM-17 has been postulated as a tumor promoter. Targeting this protease with small molecular inhibitors or siRNAs reverted the malignant phenotype in a breast cancer cell line by preventing mobilization of two crucial growth factors, transforming growth factor- $\alpha$  and amphiregulin, which bind to erbB (49). Oral administration of a small-molecule inhibitor of ADAM-17 to tumor-bearing mice resulted in a significant decrease of tumor proliferation (50). Inhibition of cleavage of sIL-15R $\alpha$  by these ADAM-17 inhibitors may counteract this new tumor evasion mechanism and improve the prognosis of these cancer patients. This new tumor evasion mechanism, possibly dependent on amplification of the intratumoral inflammatory reaction, reported in this study for head and neck cancers could also be potentially extended to leukemia and other solid tumors, which have been shown to express and release sIL-15R.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

Received 12/26/2007; revised 3/3/2008; accepted 3/12/2008.

**Grant support:** European Community under the Sixth Framework Programme (grant N $^{\circ}$  LSHC-2005-518234, "Cancerimmunotherapy"), Institut National du Cancer, Canc  ropole, Ligue contre le Cancer (comit   du Val de Marne), P  le de Comp  tivit   M  dicine (Immucan project), and CIBIT AP-HP/Institut National de la Sant   et de la Recherche M  dicale (E. Turtour) and R  gion Pays de Loire (grant CIMATH) and Canc  ropole Grand-Ouest (grant Mabilpart; Y. Jacques).

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 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

## References

- Mehnes BL, Leung BP, Starrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1997;3:189–95.
- Ohteki T, Tada H, Ishida K, et al. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses *in vivo*. *J Exp Med* 2006;203:329–38.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczykiewicz G, et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers *in vitro* IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000;164:2832–8.
- Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2006;6:595–601.
- Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, et al. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis *in vivo*. *Nat Med* 1997;3:1124–8.
- Yajima T, Yoshimura K, Nakazato K, et al. IL-15 regulates CD8 $^{+}$  T cell contraction during primary infection. *J Immunol* 2006;176:307–15.
- Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 *in trans* to neighboring cells. *Immunity* 2002;17:537–47.
- Yajima T, Nishimura H, Wajuhwalu W, et al. Overexpression of interleukin-15 *in vivo* enhances antitumor activity against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented



# Cancer Research

- NK activity and cytotoxic T-cell response. *Int J Cancer* 2002;99:573-8.
9. Kobayashi H, Dubois S, Sato N, et al. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* 2005;105:721-7.
10. Teague RM, Sather BD, Sacks JA, et al. Interleukin-15 rescues tolerant CD8<sup>+</sup> T cells for use in adoptive immunotherapy of established tumors. *Nat Med* 2006;12:335-41.
11. Klebanoff CA, Finkelstein SE, Sarman DR, et al. IL-15 enhances the *in vivo* antitumor activity of tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1969-74.
12. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 2001;193:219-31.
13. Baldassare G, Fedde M, Battista S, et al. Onset of natural killer cell lymphomas in transgenic mice carrying a truncated HMGI-C gene by the chronic stimulation of the IL-2 and IL-15 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7970-5.
14. Selke M, Yanahara N, Bowman ED, et al. Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1257-69.
15. Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, et al. Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2007;98:740-6.
16. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006;12:465-72.
17. Allen C, Duffy S, Teknos T, et al. Nuclear factor- B-related serum factors as longitudinal biomarkers of response and survival in advanced oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:3182-90.
18. Wolf JS, Li G, Varadhachary A, et al. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2007;13:1601-10.
19. Mortier E, Bernard J, Piet A, Jacques Y. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor  -chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol* 2004;173:1681-8.
20. Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, et al. Natural soluble interleukin-15R  is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-  converting enzyme (TACE/ADAM17). *J Biol Chem* 2004;279:80368-75.
21. Bulanova E, Budagian V, Dultman E, et al. Soluble interleukin IL-15R  is generated by alternative splicing or proteolytic cleavage and forms functional complexes with IL-15. *J Biol Chem* 2007;282:13167-79.
22. Buckert B, Brandt K, Braun A, et al. Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation *in vivo*. *J Immunol* 2005;174:5307-15.
23. Smith XG, Bolton EM, Ruchatz H, et al. Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor  -chain enhances cardiac allograft survival. *J Immunol* 2000;165:344-450.
24. Mortier E, Quemener A, Vusto P, et al. Soluble interleukin-15 receptor   (IL-15R )-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R / . Hyperagonist IL-15   IL-15R  fusion proteins. *J Biol Chem* 2006;281:1612-9.
25. Benchetrit E, Cline A, Vives V, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2002;99:2114-21.
26. Tartour E, Moisset V, Jouffroy T, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor concentrations as an independent prognostic marker in head and neck cancer. *Lancet* 2001;357:1263-4.
27. Wittebel S, Da Rocha S, Giron-Michel J, et al. Membrane-bound interleukin (IL)-15 on renal tumor cells rescues natural killer cells from IL-2 starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* 2007;67:5594-9.
28. Anichini A, Scario A, Molla A, Pammiani G, Mortarini B. Differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells from tumor-infiltrated and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common  -chain cytokines. *J Immunol* 2003;171:2134-41.
29. Tartour E, Fossiez F, Joyeux L, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999;59:3698-704.
30. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003;101:2620-7.
31. Stoklasek TA, Schluns KS, LeFrancis L. Combined IL-13/IL-15R  immunotherapy maximizes IL-15 activity *in vivo*. *J Immunol* 2006;177:6072-80.
32. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9166-71.
33. Bernard J, Harb C, Mortier E, et al. Identification of an interleukin-15 receptor-binding site on human interleukin-15. *J Biol Chem* 2004;279:8313-22.
34. Giron-Michel J, Giuliani M, Fogli M, et al. Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15R  complexes display differential signaling and functions on human hematopoietic progenitors. *Blood* 2005;106:2302-10.
35. Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. TGF-  suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004;21:491-501.
36. Oh S, Perem LR, Burke DS, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15/IL-15R -mediated avidity maturation of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15134-9.
37. Young MB. Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault. *Head Neck* 2006;28:462-70.
38. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3137-45.
39. Hoffmann TK, Dwomecki G, Tsakikis T, et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002;8:2553-62.
40. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007;7:41-51.
41. Druzgal CH, Chen Z, Yeh NT, et al. A pilot study of longitudinal serum cytokine and angiogenesis factor levels as markers of therapeutic response and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2005;27:771-84.
42. Kunyashu H, Ohtsuki H, Sasaki T, et al. Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis. *Clin Cancer Res* 2003;9:4802-10.
43. Colombo MP, Mantovani A. Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion. *Cancer Res* 2005;65:9113-6.
44. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006;6:24-37.
45. Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF- B is the lynchpin. *Trends Immunol* 2005;26:318-25.
46. Lawrence T, Hageman T, Balkwill F. Cancer, sex, cytokines, and cancer. *Science* 2007;317:51-2.
47. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007;117:1175-83.
48. Handisurya A, Steiner GE, Stix U, et al. Differential expression of interleukin-15, a pro-inflammatory cytokine and T-cell growth factor, and its receptor in human prostate. *Prostate* 2001;49:251-62.
49. Kenny PA, Bissell MJ. Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest* 2007;117:337-45.
50. Fridman JS, Caudler E, Hansbury M, et al. Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:1892-902.

## **IV. Le sIL-15R $\alpha$ dans le cancer de la prostate**

### **A. Introduction**

L'expression de l'IL-15 est finement régulée dans des conditions physiologiques et un certain nombre de maladies ont été décrites en association avec une activation ou un défaut du système IL-15. Parmi ces maladies, on peut citer les cancers, les maladies autoimmunes, inflammatoires ou infectieuses, les rejets de greffes, ou encore les immunodéficiences. Les transcrits de l'IL-15R $\alpha$  étant exprimés dans de nombreux types cellulaires et tissus, et le sIL-15R $\alpha$  possédant une forte affinité et efficacité de blocage pour l'IL-15, ce récepteur soluble peut exercer un rôle important dans un contexte physiologique comme pathologique. Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu mettre en évidence l'importance de l'IL-15 et de son récepteur soluble sIL-15R $\alpha$  dans des pathologies comme la maladie de Crohn et dans les cancers de la tête et du cou. Pour aller plus loin dans le rôle du sIL-15R $\alpha$  d'amplificateur de l'inflammation dans les cancers, nous avons décidé d'étudier le rôle du sIL-15R $\alpha$  dans le cancer de la prostate. En effet, nous avons montré que le sIL-15R $\alpha$  est un excellent marqueur de mauvais pronostic dans le cancer tête/cou. L'objectif de cette étude est d'évaluer si le pouvoir pronostic du sIL-15R $\alpha$  peut s'étendre aux autres cancers exprimant le sIL-15R $\alpha$ . Pour cela nous avons dosé le sIL-15R $\alpha$  et le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  dans le sérum de 80 patients atteints de cancer de la prostate au diagnostic.

## B. Mise en évidence du sIL-15R $\alpha$

Le cancer de la prostate est le plus fréquent des cancers chez l'homme de plus de 50 ans et la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme dans le monde développé, après le cancer du poumon. L'augmentation de 23 % de la mortalité liée au cancer prostatique, dans les vingt dernières années, reflète l'augmentation de l'espérance de vie et la reconnaissance plus fréquente du cancer de la prostate comme cause principale du décès. La prostate est le siège de trois affections principales : le cancer de la prostate, l'adénome de la prostate et l'infection de la prostate ou prostatite. Le cancer de la prostate est, comme tous les cancers glandulaires, un "adénocarcinome" et, dans la grande majorité des cas, il est influencé par les hormones. Le cancer de la prostate se développe à partir de cellules de la prostate. Il se développe souvent très lentement, et reste localisé au début. Quand le cancer évolue, il peut s'étendre en dehors de la prostate par envahissement direct des tissus et des organes situés près de la prostate et il peut essaimer dans d'autres organes à distance de la prostate (os, ganglions...). Si des cellules cancéreuses pénètrent dans les vaisseaux lymphatiques de la prostate, elles sont transportées vers les ganglions du petit bassin où elles continuent à se développer en formant des métastases ganglionnaires (adénopathies).

Les propriétés anti apoptotique de l'IL-15 suggèrent un rôle de cette cytokine dans la propagation des tumeurs, de leur expansion et les métastases. L'IL-15 inhibe l'AICD et favorise la survie des cellules CD8 mémoire et est donc dédié à la persistance de la mémoire immunitaire à l'invasion d'agents pathogènes. Comme dans le cancer de la tête et du cou, le sIL-15R $\alpha$  pourrait être généré par les cellules tumorales et permettre le maintien d'un environnement pro inflammatoire en augmentant la durée et la capacité d'action de l'IL-15. C'est pourquoi, de manière analogue à l'étude réalisée dans le cancer de la tête/cou, nous avons dosé le sIL-15R $\alpha$  dans le sérum de 80 patients atteints de cancer de la prostate au diagnostic (**Figure 24**). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le sérum de patients atteints de cancer de la prostate montrait une concentration en sIL-15R $\alpha$  significativement plus importante que les contrôles avec une moyenne de 8.21 pM contre 0.33 pM.

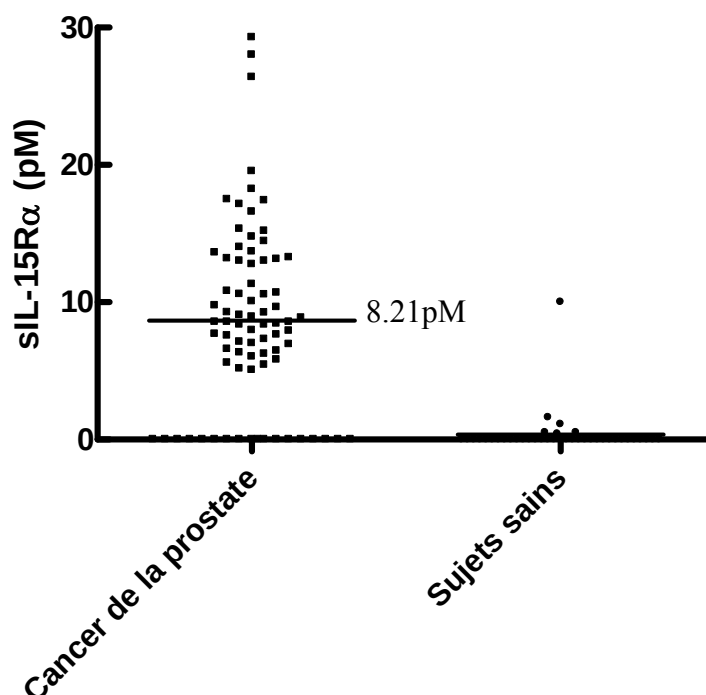
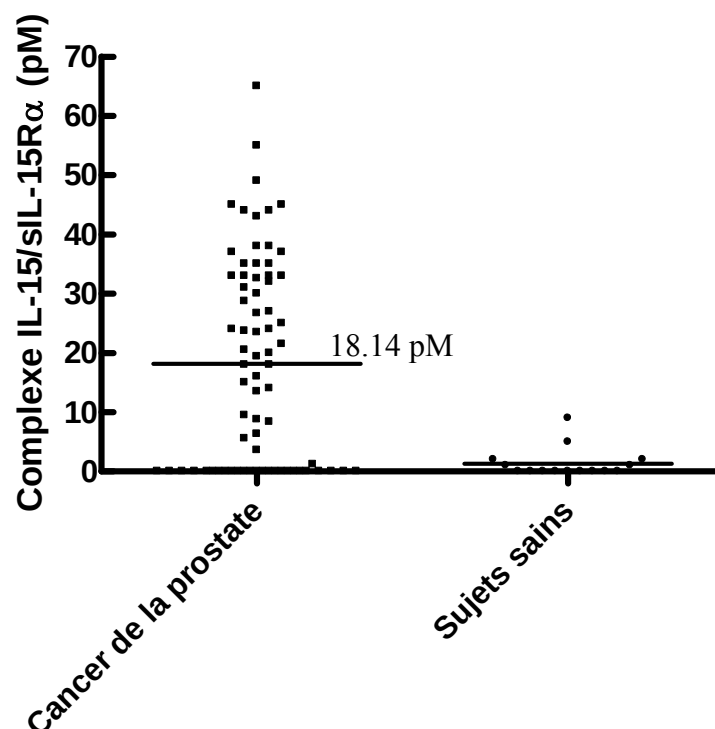


Figure 24 : Dosage du sIL-15R $\alpha$  dans le sérum de cancer de la prostate

### C.Mise en évidence du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$

Le sIL-15R $\alpha$  fournit de nouvelles contributions aux fonctions de l'IL-15. L'IL-15 et le sIL-15R $\alpha$  forment un complexe stable. Le sIL-15R $\alpha$  permet d'augmenter la durée de vie de l'IL-15 et ainsi d'augmenter la persistance du signal sur les NK et les CD8<sup>+</sup>. C'est pourquoi nous avons dosé le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  dans le sérum de 80 patients atteints de cancer de la prostate au diagnostic (**Figure 25**). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le sérum de patients atteints de cancer de la prostate montrait une concentration en complexe significativement plus importante que les contrôles avec un moyenne de 18.14 pM contre 1.9 pM.



**Figure 25 : Dosage du complexe dans le sérum de cancer de la prostate**

Il semble donc que le récepteur soluble jouerait un rôle dans la maladie mais des analyses plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer l'implication du sIL-15R $\alpha$  dans l'évolution de la maladie. En effet, aucune corrélation entre le statut clinique des patients et le taux sérique de sIL-15R $\alpha$  n'a été mis en évidence. De plus, la forme membranaire de l'IL-15 semble être exprimée par les lignées cellulaires dérivées de cancer de la prostate (Buadagian *et al.* 2004). Cette IL-15 pourrait être activée par le sIL-15R $\alpha$  ou un anti IL-15 et induire une signalisation reverse permettant la migration des cellules et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires. Enfin, le sérum de patients atteints de cancer de la prostate montre un taux élevé de ce complexe qui pourrait également jouer un rôle important dans le contexte inflammatoire et la progression tumorale.

# ***DISCUSSION***

De nombreux récepteurs de cytokines ont été mis en évidence. Ils agissent à la fois en tant que transmetteurs et modulateurs de l'activité des cytokines. L'IL-15 et l'IL-2 présentent une certaine redondance fonctionnelle *in vitro*. Cette redondance s'explique en partie par le fait qu'elles partagent les sous-unités transductrices IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ . Leur spécificité est conférée par une chaîne privée, la chaîne réceptrice  $\alpha$ . Une forme soluble de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-15, sIL-15R $\alpha$ , a été découverte. Elle agit en tant qu'antagoniste de l'action de l'IL-15 à de faibles concentrations et présente également des activités agonistes. Au cours de cette étude nous avons recherché à savoir quels étaient les déterminants moléculaires régissant la formation du complexe entre l'IL-15 et le sIL-15R $\alpha$  ainsi que les paramètres influant les activités antagonistes et agonistes de ce sIL-15R $\alpha$ . Nous avons voulu également comprendre le rôle du sIL-15R $\alpha$  dans des contextes pathologiques comme les maladies inflammatoires et les cancers.

***Le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  : un complexe antagoniste de forte affinité.***

Le sIL-15R $\alpha$  lie l'IL-15 avec une forte affinité équivalente à celle de la chaîne IL-15R $\alpha$  membranaire isolée ou associée aux deux chaînes réceptrices transductrices IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ . Le sIL-15R $\alpha$ , comme le sIL-4R $\alpha$  et le sTNF-R $\alpha$  qui lient leurs ligands respectifs avec une affinité comparable à leur analogue membranaire, est un puissant antagoniste de l'action de l'IL-15. Le sIL-15R $\alpha$  entre en compétition avec la chaîne IL-15R $\alpha$  membranaire et est capable d'inhiber à faibles concentrations la fixation de l'IL-15 sur l'IL-15R $\alpha$  présent à la surface des cellules. De plus le sIL-15R $\alpha$  inhibe fortement et spécifiquement la prolifération des cellules dépendantes de l'IL-15 mais est sans effet sur la prolifération dépendante de l'IL-2. Le sIL-15R $\alpha$  possède aussi un rôle protecteur de l'IL-15 en augmentant sa  $\frac{1}{2}$  vie sérique et en la protégeant des protéases.

La délétion de l'exon 2 codant pour le domaine sushi de la chaîne IL-15R $\alpha$  humaine abroge totalement la fixation de l'IL-15 (Dubois *et al.* 1999). Nous avons observé que la délétion du domaine 3 entraîne une diminution d'affinité du complexe IL-15/IL-15R $\alpha$  de 10 fois (BiAcore et inhibition de fixation de l'IL-15 sur la chaîne IL-15R $\alpha$  membranaire). En terme de thermodynamique, cette diminution correspond à une perte de 10% à 20% (5.6-11.4 kJ/mol) de l'énergie libre d'interaction entre l'IL-15 et l'IL-15R $\alpha$ . Ainsi, le domaine sushi est responsable d'environ 90% de la liaison. Nous avons montré que le

domaine codé par l'exon 3 et plus particulièrement les 13 premiers résidus situés en C-terminal du domaine sushi ont un rôle majeur dans la stabilisation du complexe. En effet, le sIL-15R $\alpha$  et le domaine sushi rallongé des 13 premiers résidus codés par l'exon 3 possèdent des constantes d'affinité et des paramètres thermodynamiques très proches. Cette forte affinité s'explique par des interactions électrostatiques entre le domaine sushi et l'IL-15 (Chirifu *et al.* 2007) et une excellente complémentarité géométrique apportée par les premiers résidus codés par l'exon 3 et en particulier la proline en position 67 permettant une réduction de la constante de dissociation du complexe IL-15/récepteurs.

Ce domaine 3 est également indispensable à la fonction antagoniste du sIL-15R $\alpha$  sur le complexe membranaire  $\alpha\beta\gamma$  du fait que d'une part, il permet la forte affinité entre le domaine sushi et l'IL-15 et d'autre part, il crée un encombrement stérique empêchant le complexe IL-15/sushi+ de se fixer sur le récepteur membranaire IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ . Le domaine 3 pourrait gêner l'association du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  avec le complexe IL-2R $\beta/\gamma_c$  ou engendrer une conformation inadéquate pour le fonctionnement de l'IL-2R $\beta/\gamma_c$ . Un tel mécanisme a été déjà mis en évidence dans le cas de la forme soluble de la chaîne  $\gamma_c$  (Meissner *et al.* 2001). L'activité inhibitrice la chaîne  $\gamma_c$  soluble (qui correspond à la totalité de la partie extracellulaire de la forme membranaire) est abolie en délétant l'extrémité C-terminal ou en mutant le motif WSXWS, deux régions non impliquées dans la liaison avec la cytokine.

Le domaine sushi seul n'a, quant à lui, aucun effet inhibiteur sur la prolifération induite par l'IL-15 dans le contexte  $\alpha\beta\gamma$ , du fait i) d'une constante de dissociation plus élevée du complexe IL-15/sushi permettant à l'IL-15 d'être plus facilement transférée au récepteur membranaire et ii) de la capacité du complexe IL-15/sushi à se fixer aux récepteurs membranaires et à induire un signal.

Cette boucle flexible codée par l'exon 3 dans l'IL-15R $\alpha$  est une singularité expliquant la forte affinité de la chaîne  $\alpha$  pour la cytokine. En effet, le domaine liant les deux domaines sushi dans l'IL-2R $\alpha$  est similaire au domaine 3 de l'IL-15R $\alpha$ . Néanmoins le segment liant les deux sushi de l'IL-2R $\alpha$  ne participe pas à la formation du complexe expliquant les différences d'affinité observées entre les deux complexes principalement dus à une constante de dissociation plus élevée dans le cas de l'IL-2.



### ***Effet agoniste du sIL-15R $\alpha$ : Transprésentation.***

Le sIL-15R $\alpha$  exerce un effet agoniste en amplifiant l'action de l'IL-15 sur le complexe IL-2R $\beta/\gamma$ c. Les études sur les cellules présentant exclusivement le récepteur d'affinité intermédiaire IL-2R $\beta/\gamma$ c (MO-7e et 32D $\beta$ ) et sur les cellules exprimant le récepteur de forte affinité IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$ c (Kit 225) montrent que l'effet agoniste du sIL-15R $\alpha$  est spécifique du complexe IL-2R $\beta/\gamma$ c. Sur les MO-7e, le sIL-15R $\alpha$  augmente l'affinité de l'IL-15 pour le complexe IL-2R $\beta/\gamma$ c. Le sIL-15R $\alpha$  augmente également l'efficacité de l'action biologique de l'IL-15 (prolifération) passant par le récepteur IL-2R $\beta/\gamma$ c des MO-7. Le sIL-15R $\alpha$  et l'IL-15 forment un complexe qui accroît l'affinité de liaison de l'IL-15 pour son récepteur IL-2R $\beta/\gamma$ c. Le domaine sushi du sIL-15R $\alpha$  possède également cette capacité à augmenter la liaison et l'activité biologique de l'IL-15 sur ces cellules. Néanmoins, le domaine sushi est 15 fois moins efficace que le sIL-15R $\alpha$ . De façon analogue à ce qui a été observé pour l'effet antagoniste, l'ajout des 13 premiers résidus codés par l'exon 3, situés en C-terminal du domaine sushi, conduit à un récepteur soluble possédant les mêmes caractéristiques agonistes que le sIL-15R $\alpha$ . En revanche le sIL-15R $\alpha$  délétée de l'exon 3 possède une capacité agoniste similaire à celle du domaine sushi seul. La boucle flexible du sIL-15R $\alpha$  codée par l'exon 3 augmente l'effet agoniste du récepteur soluble en élevant la constante d'affinité du complexe.

Les effets agonistes du sIL-15R $\alpha$  sont semblables aux effets agonistes décrits pour les récepteurs solubles de la famille de l'IL-6/IL-12 (sIL-6R $\alpha$ , sIL-11R $\alpha$ , sCNTFR, IL-12p40, EBI-3) (Jones *et al.* 2002). Un tel effet agoniste du récepteur soluble de la chaîne  $\alpha$  n'a jamais été décrit pour les récepteurs solubles de la famille de l'IL-2 (sIL-2R $\alpha$  ou sIL-4R $\alpha$ ), d'autant que le sIL-15R $\alpha$ , lui-même, agit en tant qu'antagoniste.

Le concept de *transprésentation* a été décrit dans le système IL-6, où le sIL-6R augmente la sensibilité des cellules répondant à l'IL-6 et rend les cellules n'exprimant que la chaîne réceptrice gp130, sans la chaîne IL-6R, capables de répondre à l'IL-6 (Rose-John *et al.* 1994). Ce concept a été étendu aux autres membres de la famille de l'IL-6 (IL-11R, CNTFR, CLC) (Davis *et al.* 1993 ; Pflanz *et al.* 1999 ; Elson *et al.* 2000). Dans le cas de l'IL-15, un mécanisme de *transprésentation* a été décrit dans lequel l'IL-15, produite par les monocytes et les cellules dendritiques, est associée sur ces mêmes cellules à l'IL-15R $\alpha$  membranaire et ainsi, peut stimuler la prolifération des cellules voisines exprimant à leur surface l'IL-2R $\beta/\gamma$ c (Dubois *et al.* 2002). La *transprésentation* est le mécanisme principal

utilisé *in vivo*, et nécessite que l'IL-15 et l'IL-15R $\alpha$  soient exprimés par les mêmes cellules (Burkett *et al.* 2003 ; Koka *et al.* 2003 ; Sandau *et al.* 2004 ; Schluns *et al.* 2004). Le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  est *transprésenté* et sensibilise les cellules exprimant les chaînes IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$  à des concentrations physiologiques d'IL-15. Le domaine sushi du sIL-15R $\alpha$  est indispensable pour la liaison à la cytokine, le domaine codé par l'exon 3 est, quant à lui, indispensable pour une *transprésentation* efficace de l'IL-15 par le sIL-15R $\alpha$ .

Nous avons montré que le sIL-15R $\alpha$  produit par les cellules exprimant la forme membranaire et composée de la partie extra-cellulaire dans sa totalité, peut être dans certains cas, inhibiteur de l'action de l'IL-15. De ce fait, il participe à un mécanisme de contrôle négatif qui limite les effets biologiques de l'IL-15. Au contraire, ce sIL-15R $\alpha$  peut également jouer un rôle agoniste de l'effet de l'IL-15 sur des cellules portant le récepteur dimérique  $\beta\gamma$ . L'absence du domaine codé par l'exon 3, comme dans le cas du sushi seul, résulte en un récepteur soluble n'ayant pas ou peu d'effet antagoniste mais conservant des propriétés agonistes. Si de telles formes de sIL-15R $\alpha$  sont générées par les cellules exprimant l'IL-15R $\alpha$ , elles pourraient augmenter l'effet de l'IL-15 par la *transprésentation* sans pour autant inhiber l'action de l'IL-15 sur les cellules exprimant le récepteur IL-15R $\alpha/\beta/\gamma_c$ . L'existence de telles formes solubles de sushi-IL-15R $\alpha$  a été mise en évidence chez la souris (Bulfone-Paus *et al.* 2007). D'autres isoformes dans lesquelles l'exon 3 est délété (IL-15R $\alpha\Delta 3$ , IL-15R $\alpha\Delta 3,4$  et IL-15R $\alpha\Delta 3,4,5$ ) ont également été décrites (Anderson *et al.* 1995 ; Dubois *et al.* 1999 ; Bulanova *et al.* 2003). Ces différentes isoformes exprimées à la membrane peuvent générer par coupure protéolytique les formes solubles correspondantes (Mortier *et al.* 2004).

### ***Protéine de fusion IL-15/sIL-15R $\alpha$***

La fusion d'une cytokine avec son récepteur soluble permet de rendre le complexe cytokine/récepteur plus stable et plus actif que la combinaison non covalente des deux molécules. Une approche similaire a été adoptée dans le cas l'IL-11 (Pflanz *et al.* 1999) ou de l'IL-6 (Fischer *et al.* 1997). La protéine de fusion RLI a été générée en reliant par un lien flexible l'extrémité N-terminale de l'IL-15 à l'extrémité C-terminale du domaine sushi rallongée des 13 premiers résidus codés par l'exon 3. Le modèle moléculaire de cette protéine de fusion indique que le « linker » ne masque pas les zones de l'IL-15 impliquées dans la fixation des chaînes IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ . Le RLI est plus efficace que l'IL-15 et même que la combinaison de l'IL-15 avec le sushi rallongé dans l'activation des MO-7. Le RLI se

fixe sur les chaînes IL-2R $\beta$ / $\gamma$ c avec une affinité 20 fois supérieure à l'IL-15 isolée. Sur des cellules exprimant le récepteur de forte affinité, la protéine de fusion est aussi active que l'IL-15. Le complexe IL-15/sushi rallongé est incapable de lier le récepteur trimérique IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ c du fait de la présence de la boucle codée par l'exon 3 qui crée un encombrement stérique avec la chaîne  $\alpha$  présente à la membrane des cellules. En revanche, dans le RLI, le « linker » utilisé pour lier les deux molécules est tendu et, de ce fait, entraîne un changement de conformation de la boucle codée par l'exon 3, permettant ainsi au RLI de lier le récepteur de forte affinité IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ c et d'induire un signal de la même manière que l'IL-15 seul. Il serait intéressant d'élaborer une molécule de fusion entre l'IL-15 et le domaine sushi relié par un « linker » pour comprendre l'importance de la boucle codée par l'exon 3 dans le cadre d'une molécule de fusion. Enfin, la résolution par cristallographie de la structure du RLI permettrait de comprendre comment le RLI peut lier le récepteur  $\alpha\beta\gamma$ . Cela montre également que les différents isoformes du sIL-15R $\alpha$  pouvant être générés auront des activités agonistes mais l'expression du domaine codé par l'exon 3 sera un élément important dans l'activité de ces récepteurs.

Du fait de sa forte activité, cette protéine de fusion hyper-IL-15 est un puissant outil pour l'expansion de certaines populations de lymphocytes (CD8 mémoires et cellules NK) pour lesquelles la *trans*présentation est décrite comme le principal processus d'activation physiologique (Burkett *et al.* 2003). Le RLI constitue également une molécule adjuvante efficace dans des stratégies thérapeutiques pour des patients atteints de cancers ou d'immunodéficiences.

### ***sIL-15R $\alpha$ et cancer.***

Du fait de son pouvoir régulateur, le sIL-15R $\alpha$  représente une molécule importante notamment dans les pathologies inflammatoires ou cancéreuses où l'IL-15 est impliquée. Nous avons montré chez les patients atteints de cancer de la tête et du cou que le taux sérique de sIL-15R $\alpha$  était un facteur de mauvais pronostic autant en terme de survie globale que locorégionale, et ce y compris en analyse multi variée. Le sIL-15R $\alpha$  représente ainsi un bio marqueur plus efficace que les marqueurs conventionnels cliniques (TNM). Comme cela a été observé pour le sIL-6R $\alpha$  dans les adénocarcinome du côlon (Becker *et al.* 2004), le sIL-15R $\alpha$  agit comme agoniste de l'effet de l'IL-15, produite à la fois par les cellules dendritiques et les monocytes, en augmentant la production de cytokine pro

inflammatoire par les CD8+, entretenant ainsi le contexte inflammatoire et pouvant favoriser la croissance tumorale.

Deux mécanismes physiologiques principaux ont été décrits pour la génération de récepteur soluble: le clivage protéolytique de la forme membranaire et la synthèse à partir d'un ARN messager issu d'un épissage alternatif (Fernandez-Botran *et al.* 1996). Le sIL-15R $\alpha$  mis en évidence est issu d'un clivage protéolytique de l'IL-15R $\alpha$  exprimé par les cellules tumorales par une métalloprotéase: ADAM-17. Ce phénomène de coupure protéolytique induite par les MMPs a déjà été décrit pour d'autres récepteurs solubles, notamment pour le sIL-2R $\alpha$  (MMP-2 et MMP-9) (Sheu *et al.* 2001). Cependant, la plupart des protéases impliquées dans les processus de protéolyse ne sont pas identifiées. Pour un récepteur membranaire, différentes protéases peuvent être impliquées dans le clivage, et inversement, une protéase peut couper différents substrats. L'administration orale d'inhibiteur d'ADAM-17 chez des souris possédant une tumeur réduit considérablement la croissance tumorale (Fridamn *et al.* 2007). L'inhibition du clivage de l'IL-15R $\alpha$  par ADAM-17 pourrait contribuer à cet effet et améliorer le pronostic de ces patients.

Ce nouveau mécanisme d'action pro-tumoral repose sur l'amplification de la réaction inflammatoire intra tumorale et semble être transposable à d'autres formes de cancer comme la leucémie, le cancer du rein, le cancer de prostate où l'IL-15R $\alpha$  est exprimé ainsi que le sIL-15R $\alpha$  dans le cas de la prostate et du rein. En effet, nous avons également constaté une élévation du taux sérique de sIL-15R $\alpha$  dans le sérum de patients atteints de cancer de la prostate avant traitement et que les lignées tumorales de cancer de la prostate exprimaient l'IL-15R $\alpha$ . Néanmoins, ce taux ne corrèle pas avec la progression du cancer. De plus, nous avons détecté un taux élevé de complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  dans ces séra alors que le complexe est absent des séra de patients atteints de cancer tête/cou. Il serait intéressant d'analyser cette différence.

### ***sIL-15R $\alpha$ et inflammation.***

Les maladies inflammatoires ou auto-immunes sont caractérisées par une réaction de défense immunitaire de l'organisme à une agression. Dans nombre de ces maladies, l'IL-15 est impliquée dans cette réaction. Comme dans les cancers, le sIL-15R $\alpha$  joue également un rôle clef dans le processus inflammatoire induit par l'IL-15. Dans la maladie de Crohn, l'IL-15, le sIL-15R $\alpha$  et le complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  sont plus élevés que chez des sujets sains. L'IL-15R $\alpha$  est exprimée par les macrophages et les cellules de

l'épithélium intestinal de ces patients. Au cours du traitement par l'infliximab, le taux sérique de sIL-15R $\alpha$  des patients répondeurs à ce traitement augmente en association avec une diminution du taux sérique d'IL-15 libre et une augmentation du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$ . A l'opposé, les taux d'IL-15 et de sIL-15R $\alpha$  restent stables au cours du traitement chez les patients non répondeurs. L'IL-15R $\alpha$  est surexprimé par les cellules épithéliales intestinales chez les patients atteints de la maladie de Crohn ainsi que ADAM17. De plus, *in vitro*, les lignées issues de cellules épithéliales intestinales libèrent du sIL-15R $\alpha$  après incubation avec l'IFX mais pas avec l'etanercept. Cette libération est augmentée après préincubation avec l'IL-1 $\beta$  ou l'IFN $\gamma$ . Il est possible que cette libération soit dû à un clivage de l'IL-15R $\alpha$  membranaire par ADAM-17 induit par l'IFX. Cela suggère que chez les non répondeurs, il existe un défaut dans la signalisation permettant le clivage de l'IL-15R $\alpha$ . Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'un haplotype du gène d'ADAM-17 est associé à la réponse à l'IFX des patients atteints de la maladie de Crohn (Dideberg *et al.* 2006). En effet, dans certains cas, la sécrétion d'IL-15 est dépendante de sa pré association intracellulaire avec l'IL-15R $\alpha$  et le complexe est ensuite transloqué à la membrane plasmique où il peut être clivé pour produire sous forme soluble du complexe, du sIL-15R $\alpha$  ou de l'IL-15 (Mortier *et al.* 2008). Ce défaut de clivage de l'IL-15R $\alpha$  pourrait également expliquer les faibles taux d'IL-15 et de sIL-15R $\alpha$  mesurés chez les non répondeurs même en présence d'une inflammation de l'intestin confirmée par une CRP et un taux de TNF élevés. De ce fait, les taux d'IL-15 et de sIL-15R $\alpha$  représentent de bons marqueurs pronostics pour la réponse au traitement par l'IFX.

# ***CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence l'importance de la boucle flexible codée par l'exon 3 du sIL-15R $\alpha$  dans la fonction antagoniste de ce récepteur soluble ainsi que dans la forte affinité du sIL-15R $\alpha$  pour l'IL-15. Il reste cependant à déterminer le rôle potentiel des différentes isoformes du sIL-15R $\alpha$  contenant ou pas le domaine codé par l'exon 3 dans les fonctions régulatrices de l'IL-15. D'une part, il serait intéressant de comprendre dans quels contextes ces différentes isoformes pourraient être traduites ou clivées et dans quelles mesures elles seraient capables de réguler les fonctions de l'IL-15. Dans le cas du récepteur de l'IL-17, 6 isoformes différentes ont été décrites et dans certaines pathologies, comme le psoriasis, l'expression de certaines isoformes est diminuée alors que pour d'autres, cette expression est augmentée. Un système similaire pourrait être transposé à l'IL-15R $\alpha$ . D'autre part, il serait intéressant d'identifier la ou les protéases impliquée(s) dans la coupure des différentes isoformes de la chaîne IL-15R $\alpha$  contenant ou non le domaine codé par l'exon 3. En effet, la délétion des exons 4 ou 5 n'empêche ni ne diminue la libération du sIL-15R $\alpha$  alors que la délétion de l'exon 3 diminue cette libération suggérant la présence de plusieurs sites de coupure ou l'implication de plusieurs métalloprotéases.

Nous avons également mis en évidence un rôle clé du sIL-15R $\alpha$  dans la pathogenèse de maladies inflammatoires ou cancéreuses. En effet, nous avons montré que la libération du sIL-15R $\alpha$  par les cellules épithéliales est induite par l'infliximab et intervient dans la réponse au traitement par l'infliximab dans la maladie de Crohn. De plus, le taux d'IL-15 sérique des patients atteints de la maladie de Crohn est un bon marqueur de réponse au traitement par l'infliximab. Il reste cependant à élucider par quels mécanismes l'infliximab est capable d'induire la libération du sIL-15R $\alpha$  chez les répondeurs au traitement alors que chez les non répondeurs, il semble y avoir un défaut empêchant cette sécrétion. Il est également possible que l'effet observé ne soit pas restreint qu'à l'infliximab et il serait nécessaire de tester plusieurs anticorps comme l'adalumimab, le rituximab, l'enercept... même si aucun effet n'a été observé en présence d'ethanercept. De plus, une étude des taux d'IL-15 et de sIL-15R $\alpha$  sur un plus grand nombre de patients pourrait aboutir à une application pronostic quant à la réponse au traitement par l'infliximab. Cette étude pourrait également être étendue à la rectocolite hémorragique (RCH), permettant d'approfondir les connaissances sur l'implication du système IL-15 dans les processus inflammatoires. De plus, il serait intéressant de connaître les différents isoformes de l'IL-15 comme du sIL-15R $\alpha$  sécrétées au niveau intestinal. En effet, les

différents isoformes du sIL-15R $\alpha$  peuvent avoir des rôles distincts notamment en présence ou non du domaine codé par l'exon 3. Pour ce faire, il serait nécessaire de développer des anticorps capables de distinguer les différentes isoformes et de les détecter par des tests de type Elisa ou RIA. De plus, il serait intéressant d'améliorer nos test RIA pour i) améliorer la limite de détection car l'IL-15 est une cytokine sécrétée en très faible quantité et extrêmement instable avec un temps de demi-vie court et ii) remplacer par des tests de type Elisa plus faciles à mettre en œuvre car ne nécessitant pas de locaux spéciaux pour la radioactivité et transposable à haut débit.

Nous avons aussi pu montrer que le taux de sIL-15R $\alpha$  sérique était un marqueur de mauvais pronostic en terme de survie globale ou locorégionale chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou, y compris en analyse multivariée. Le sIL-15R $\alpha$  représente un biomarqueur plus efficace que les marqueurs conventionnels cliniques (TNM). Ce sIL-15R $\alpha$  est généré par clivage protéolytique par ADAM-17 de la forme membranaire exprimée par les cellules tumorales elles-mêmes. Le sIL-15R $\alpha$  agit alors comme agoniste de l'action de l'IL-15 sur la prolifération des CD8 $^{+}$  ainsi que sur la production de cytokines proinflammatoires, perpétuant ainsi un environnement inflammatoire favorisant la croissance tumorale. De plus, nous avons également pu montrer que les taux de sIL-15R $\alpha$  et de complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  sont plus élevés dans le sérum de patients atteints de cancer de la prostate par rapport aux sujets sains. Il serait intéressant d'évaluer si comme dans le cancer tête/cou, le sIL-15R $\alpha$  possède un effet protumoral dans le cancer de la prostate. Enfin, le développement de RIA spécifiques pour les différentes isoformes du sIL-15R $\alpha$  serait intéressant pour évaluer leur présence et leur rôle dans les différents types de cancer.



***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

1. Adorini, L. (1999). "Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases." Cell Mol Life Sci **55**(12): 1610-25.
2. Agostini, C., L. Trentin, et al. (1996). "Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis." J Immunol **157**(2): 910-8.
3. Agostini, C., L. Trentin, et al. (1999). "Regulation of alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammatory process." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): L240-50.
4. Ahmed, N. N., H. L. Grimes, et al. (1997). "Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3627-32.
5. Ajjan, R. A., P. F. Watson, et al. (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**(2): 666-9.
6. Alexander, D. R. (2002) "Kinase regulation: competing phosphatases in JAK dephosphorylation." Curr Biol. **12**, R288-290
7. Allavena, P., G. Giardina, et al. (1997). "IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium." J Leukoc Biol **61**(6): 729-35.
8. Allen C, Duffy S, Teknos T, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B-related serum factors as longitudinal biomarkers of response and survival in advanced oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:3182–90.
9. Alpdogan, O. and M. R. van den Brink (2005). "IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency." Trends Immunol **26**(1): 56-64.
10. Alpdogan, O., J. M. Eng, et al. (2005). "Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation." Blood **105**(2): 865-73.
11. Ameglio, F., L. D'Auria, et al. (1999). "Anti-intercellular substance antibody log titres are correlated with serum concentrations of interleukin-6, interleukin-15 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with Pemphigus vulgaris relationships with peripheral blood neutrophil counts, disease severity and duration and patients' age." J Biol Regul Homeost Agents **13**(4): 220-4.
12. Amicosante, M., F. Poccia, et al. (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**(5): 661-5.
13. Amlong, C. A., D. T. Nardelli, et al. (2006). "Anti-interleukin-15 prevents arthritis in *Borrelia*-vaccinated and -infected mice." *Clin Vaccine Immunol* **13**(2): 289-96.
14. Anderson, D. M., L. Johnson, et al. (1995). "Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15." Genomics **25**(3): 701-6.
15. Anderson, D. M., S. Kumaki, 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**(50): 29862-9.
16. Andreola, G., L. Rivoltini, et al. (2002). "Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles." J Exp Med **195**(10): 1303-16.
17. Angiolillo, A. L., H. Kanegane, et al. (1997). "Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo." Biochem Biophys Res Commun **233**(1): 231-7.
18. Anichini A, Scarito A, Molla A, Parmiani G, Mortarini R. Differentiation of CD8+ T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common  $\gamma$ -chain cytokines. *J Immunol* 2003;171: 2134–41.
19. Arend, W. P. (1995). "Inhibiting the effects of cytokines in human diseases." Adv Intern Med **40**: 365-94.

20. Aringer, M., G. H. Stummvoll, et al. (2001). "Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) **40**(8): 876-81.
21. Armitage, R. J., B. M. Macduff, et al. (1995). "IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation." J Immunol **154**(2): 483-90.
22. Auernhammer, C. J. and S. Melmed (2000). "Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function." Endocr Rev **21**(3): 313-45.
23. Avice, M. N., C. E. Demeure, et al. (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**(7): 3408-15.
24. Azimi, N., J. Mariner, et al. (2000). "How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis?" AIDS Res Hum Retroviruses **16**(16): 1717-22.
25. Azimi, N., K. Brown, et al. (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**(5): 2452-7.
26. Azimi, N., M. Nagai, et al. (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**(25): 14559-64.
27. Azimi, N., S. Jacobson, et al. (1999). "Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor." J Immunol **163**(7): 4064-72.
28. Baan, C. C., C. J. Knoop, et al. (1999). "Anti-CD25 therapy reveals the redundancy of the intragraft cytokine network after clinical heart transplantation." Transplantation **67**(6): 870-6.
29. Baan, C. C., H. G. Niesters, et al. (1998). "Increased intragraft IL-15 mRNA expression after liver transplantation." Clin Transplant **12**(3): 212-8.
30. Baan, C. C., I. C. van Riemsdijk-Overbeeke, et al. (2002). "Inhibition of the IL-15 pathway in anti-CD25 mAb treated renal allograft recipients." Transpl Immunol **10**(1): 81-7.
31. Baan, C. C., T. van Gelder, et al. (2000). "Functional responses of T cells blocked by anti-CD25 antibody therapy during cardiac rejection." Transplantation **69**(3): 331-6.
32. Bacchetta, R., C. Sartirana, et al. (2002). "Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines." Eur J Immunol **32**(8): 2237-45.
33. Badolatto, R., A. N. Ponzi, et al. (1997). "Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes." Blood **90**(7): 2804-9.
34. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al. (2006) Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. Clin Cancer Res **12**:465–72.
35. Balasubramanian, S., T. Chernov-Rogan, et al. (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**(11): 1839-49.
36. Baldassarre G, Fedele M, Battista S, et al. (2001) Onset of natural killer cell lymphomas in transgenic mice carrying a truncated HMGI-C gene by the chronic stimulation of the IL-2 and IL-15 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A **98**:7970–5.

37. Bamford, R. N., A. J. Grant, et al. (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**(11): 4940-4.
38. Bamford, R. N., A. P. Battista, et al. (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**(7): 2897-902.
39. Bamford, R. N., A. P. DeFilippis, et al. (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**(9): 4418-26.
40. Bani, L., D. David, et al. (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**(4): 573-80.
41. Bank, U., B. Kupper, et al. (2000). "Inactivation of interleukin-6 by neutrophil proteases at sites of inflammation. Protective effects of soluble IL-6 receptor chains." Adv Exp Med Biol **477**: 431-7.
42. Baran, D., M. Korner, et al. (1988). "Characterization of the soluble murine IL-2R and estimation of its affinity for IL-2." J Immunol **141**(2): 539-46.
43. Baranda, L., H. de la Fuente, et al. (2005). "IL-15 and IL-15R in leucocytes from patients with systemic lupus erythematosus." Rheumatology (Oxford) **44**(12): 1507-13.
44. Bargetzi, M. J., M. Lantz, et al. (1993). "Interleukin-1 beta induces interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein in humans." Cancer Res **53**(17): 4010-3.
45. Baslund B., Tvede N., et al (2005). "Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study." Arthritis Rheum. **52**(9):2686-92.
46. Barzegar, C., R. Meazza, et al. (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**(19): 2503-12.
47. Baumann, H., Y. Wang, et al. (1996). "Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells." J Immunol **157**(1): 284-90.
48. Bayer, A. L., J. Y. Lee, et al. (2008). "A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells." J Immunol **181**(1): 225-34.
49. Bazan, J. F. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 6934-8.
50. Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. (2004) "TGF-h suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity **21**: 491-501.
51. Belladonna, M. L., J. C. Renauld, et al. (2002). "IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells." J Immunol **168**(11): 5448-54.
52. Bemelmans, M. H., D. Abramowicz, et al. (1994). "In vivo T cell activation by anti-CD3 monoclonal antibody induces soluble TNF receptor release in mice. Effects of pentoxifylline, methylprednisolone, anti-TNF, and anti-IFN-gamma antibodies." J Immunol **153**(2): 499-506.
53. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. Blood 2002;99:2114-21.

54. Bergers, G., A. Reikerstorfer, et al. (1994). "Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor." Embo J **13**(5): 1176-88.
55. Bernard, J., C. Harb, et al. (2004). "Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15." J Biol Chem **279**(23): 24313-22.
56. Bismuth, G., L. Leclercq, et al. (1984). "In vitro induction and expression of interleukin 2 receptor in a clonal T helper cell differentiation model." Cell Immunol **86**(1): 90-100.
57. Bitard, J., S. Daburon, et al. (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**(18): 16253-61.
58. Black, R. A., C. T. Rauch, et al. (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-33.
59. Blobel, C. P. (2005) "ADAMs: key components in EGFR signalling and development." Nature reviews. **6**, 32-43
60. Bo, H., X. Q. Wei, et al. (2009). "Elevated expression of transmembrane IL-15 in immune cells correlates with the development of murine lupus: a potential target for immunotherapy against SLE." Scand J Immunol **69**(2): 119-29.
61. Boirivant M, Marini M, Di Felice G, et al.(1999) "Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis." Gastroenterology **116**:557-65.
62. Borbolla, J. R., M. A. Lopez-Hernandez, et al. (2001). "Use of interleukin-11 after autologous stem cell transplant: report of three cases and a very brief review of the literature." Haematologica **86**(8): 891-2.
63. Borger, P., H. F. Kauffman, et al. (1999). "Interleukin-15 differentially enhances the expression of interferon-gamma and interleukin-4 in activated human (CD4+) T lymphocytes." Immunology **96**(2): 207-14.
64. Bosco, M. C., I. Espinoza-Delgado, et al. (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**(12): 3462-7.
65. Bouchard, A., C. Ratthe, et al. (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**(5): 893-900.
66. Briard, D., D. Brouty-Boye, et al. (2002). "Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15." J Immunol **168**(9): 4326-32.
67. Budagian, V., E. Bulanova, et al. (2004). "Natural soluble interleukin-15Ralpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)." J Biol Chem **279**(39): 40368-75.
68. Budagian, V., E. Bulanova, et al. (2004). "Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15." J Biol Chem **279**(40): 42192-201.
69. Bulanova E, Budagian V, Duitman E, et al. (2007) "Soluble interleukin IL-15Ra is generated by alternative splicing or proteolytic cleavage and forms functional complexes with IL-15." J Biol Chem **282**:13167-79.
70. Bulanova, E., V. Budagian, et al. (2001). "The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells." J Immunol **167**(11): 6292-302.

71. Bulanova, E., V. Budagian, et al. (2003). « Mast cells express novel functional IL-15 receptor alpha isoforms. » J Immunol **170**(10): 5045-55.
72. Bulfone-Paus S, Bulanova E, Pohl T, et al. (1999) "Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain." FASEB J **13**:1575-85.
73. Bulfone-Paus, S. S., E. Bulanova, et al. (1999). "Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain." Faseb J **13**(12): 1575-85.
74. Bulfone-Paus, S., D. Ungureanu, et al. (1997). "Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo." Nat Med **3**(10): 1124-8.
75. Bulfone-Paus, S., E. Bulanova, et al. (2006). "The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling." Bioessays **28**(4): 362-77.
76. Bulfone-Paus, S., H. Durkop, et al. (1997). "Differential regulation of human T lymphoblast functions by IL-2 and IL-15." Cytokine **9**(7): 507-13.
77. Burkett, P. R., R. Koka, et al. (2003). "IL-15R alpha expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4724-9.
78. Burton, J. D., R. N. Bamford, et al. (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**(11): 4935-9.
79. Busquets, S., M. T. Figueras, et al. (2005). "Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: a direct effect." Int J Mol Med **16**(3): 471-6.
80. Caligiuri, M. A., A. Zmuidzinas, et al. (1990). "Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors." J Exp Med **171**(5): 1509-26.
81. Canals, A., D. R. Grimm, et al. (1997). "Molecular cloning of cDNA encoding porcine interleukin-15." Gene **195**(2): 337-9.
82. Canals, A., L. C. Gasbarre, et al. (1997). "Cloning and expression of bovine interleukin-15: analysis and modulation of transcription by exogenous stimulation." J Interferon Cytokine Res **17**(8): 473-80.
83. Cao, X., E. W. Shores, et al. (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain." Immunity **2**(3): 223-38.
84. Carbo, N., J. Lopez-Soriano, et al. (2001). "Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control." Biochim Biophys Acta **1526**(1): 17-24.
85. Carson, W. E., J. G. Giri, et al. (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**(4): 1395-403.
86. Carson, W. E., M. E. Ross, et al. (1995). "Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro." J Clin Invest **96**(6): 2578-82.
87. Carson, W. E., T. A. Fehniger, et al. (1997). "A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival." J Clin Invest **99**(5): 937-43.
88. Castagnoli, C., C. Trombotto, et al. (1999). "Expression and role of IL-15 in post-burn hypertrophic scars." J Invest Dermatol **113**(2): 238-45.
89. Catlett-Falcone, R., T. H. Landowski, et al. (1999). "Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells." Immunity **10**(1): 105-15.

90. Cheever, M. A. (2008). "Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers." Immunol Rev **222**: 357-68.
91. Chehimi, J., J. D. Marshall, et al. (1997). "IL-15 enhances immune functions during HIV infection." J Immunol **158**(12): 5978-87.
92. Chen, Q., N. Ghilardi, et al. (2000). "Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR." Nature **407**(6806): 916-20.
93. Chilton, P. M. and R. Fernandez-Botran (1993). "Production of soluble IL-4 receptors by murine spleen cells is regulated by T cell activation and IL-4." J Immunol **151**(11): 5907-17.
94. 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**, 1001-7.
95. Chu, C. L., S. S. Chen, et al. (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**(4): 1896-903.
96. Cocchi, F., A. L. DeVico, et al. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-5.
97. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. and Vignali, D. A. (2007) "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature. 450, 566-569
98. Colombo MP, Mantovani A. (2005) "Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion." Cancer Res **65**:9113-6.
99. Cope, A. P., D. Aderka, et al. (1995). "Soluble TNF receptor production by activated T lymphocytes: differential effects of acute and chronic exposure to TNF." Immunology **84**(1): 21-30.
100. Cunnion, K. M. (1999). "Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses." Mol Genet Metab **67**(4): 278-82.
101. Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E. (1997) "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell. **91**, 231-241
102. Davie, E. W., A. Ichinose, et al. (1986). "Structural features of the proteins participating in blood coagulation and fibrinolysis." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 509-14.
103. Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1991). "The receptor for ciliary neurotrophic factor." Science **253**(5015): 59-63.
104. Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1993). "Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses." Science **259**(5102): 1736-9.
105. Dayer, J. M. and D. Burger (1994). "Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors." Eur Cytokine Netw **5**(6): 563-71.
106. De Jong, J. L., N. L. Farner, et al. (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**(4): 1339-48.
107. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. (2006) "Paradoxical roles of the immune system during cancer development." Nat Rev Cancer **6**:24-37.

108. Debets, R. and H. F. Savelkoul (1994). "Cytokine antagonists and their potential therapeutic use." Immunol Today **15**(10): 455-8.
109. Demoulin, J. B. and J. C. Renauld (1998). "Interleukin 9 and its receptor: an overview of structure and function." Int Rev Immunol **16**(3-4): 345-64.
110. D'Ettorre, G., G. Forcina, et al. (2002). "Interleukin-15 in HIV infection: immunological and virological interactions in antiretroviral-naïve and -treated patients." Aids **16**(2): 181-8.
111. Devergne, O., M. Birkenbach, et al. (1997). "Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12041-6.
112. Di Sabatino, A., R. Ciccocioppo, et al. (2005). "Epithelium-derived interleukin-15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity and survival in coeliac disease." Gut.
113. Dideberg V, Theatre E, Farnir F, et al. (2006) "The TNF/ADAM 17 system: implication of an ADAM 17 haplotype in the clinical response to infliximab in Crohn's disease." Pharmacogenet Genomics **16**:727-34.
114. Dikic, I., G. Tokiwa, et al. (1996). "A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation." Nature **383**(6600): 547-50.
115. Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist." Int Rev Immunol **16**(5-6): 457-99.
116. Dobbeling, U., R. Dummer, et al. (1998). "Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells." Blood **92**(1): 252-8.
117. Doedens, J. R. and Black, R. A. (2000) "Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme." The Journal of biological chemistry, 275, 14598-14607
118. Doherty, T. M., R. A. Seder, et al. (1996). "Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages." J Immunol **156**(2): 735-41.
119. Doucet, C., R. Meazza, et al. (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.
120. Dragic, T., A. Trkola, et al. (1998). "Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry." J Virol **72**(1): 279-85.
121. Druzgal CH, Chen Z, Yeh NT, et al. (2005) "A pilot study of longitudinal serum cytokine and angiogenesis factor levels as markers of therapeutic response and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma." Head Neck **27**:771-84.
122. Dubois, S., F. Magrangeas, 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**(38): 26978-84.
123. Dubois, S., H. J. Patel, et al. (2008). "Preassociation of IL-15 with IL-15R  $\alpha$ -IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> T cells and its antitumor action." J Immunol **180**(4): 2099-106.
124. Dubois, S., J. Mariner, et al. (2002). "IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells." Immunity **17**(5): 537-47.
125. Duitman, E. H., Z. Orinska, et al. (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**(15): 4851-61.



126. Dukovich, M., Y. Wano, et al. (1987). "A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors." Nature **327**(6122): 518-22.
127. Dumoutier, L., D. Lejeune, et al. (2001). "Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22." J Immunol **166**(12): 7090-5.
128. Ebert, E. C. (1998). "Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes." Gastroenterology **115**(6): 1439-45.
129. Edelbaum, D., M. Mohamadzadeh, et al. (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**(6): 837-43.
130. Eichenauer, D. A., Simhadri, V. L., von Strandmann, E. P., Ludwig, A., Matthews, V., Reiners, K. S., von Tresckow, B., Saftig, P., Rose-John, S., Engert, A. and Hansen, H. P. (2007) "ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro." Cancer research. 67, 332-338
131. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. (2004) "Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system." Cytokine Growth Factor Rev **15**:353-66.
132. Elloso M.M., Wallace M., et al (1998). "The effects of interleukin-15 on human gammadelta T cell responses to Plasmodium falciparum in vitro." Immunol Lett. **64**(2-3):125-32.
133. Elson, G. C., E. Lelievre, et al. (2000). "CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex." Nat Neurosci **3**(9): 867-72.
134. Epardaud, M., K. G. Elpek, et al. (2008). "Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8+ T cells." Cancer Res **68**(8): 2972-83.
135. Espevik T, Nissen-Meyer J. (1986) "A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes". J Immunol Methods **95**:99-105.
136. Espinoza-Delgado, I., J. R. Ortaldo, et al. (1990). "Expression and role of p75 interleukin 2 receptor on human monocytes." J Exp Med **171**(5): 1821-6.
137. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, et al. (2001) "Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells." J Exp Med **193**:219-31.
138. Fehniger, T. A. and M. A. Caligiuri (2001). "Interleukin 15: biology and relevance to human disease." Blood **97**(1): 14-32.
139. Fehniger, T. A., G. Herbein, et al. (1998). "Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection." J Immunol **161**(11): 6433-8.
140. Fehniger, T. A., K. Suzuki, et al. (2001). "Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells." J Exp Med **193**(2): 219-31.
141. Fehniger, T. A., M. H. Shah, et al. (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**(8): 4511-20.
142. Fehniger, T. A., W. E. Carson, et al. (1999). "Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production." Transplant Proc **31**(3): 1476-8.

- 143.Fernandez-Botran, R. and E. S. Vitetta (1990). "A soluble, high-affinity, interleukin-4-binding protein is present in the biological fluids of mice." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(11): 4202-6.
- 144.Fernandez-Botran, R. and E. S. Vitetta (1991). "Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins." J Exp Med **174**(3): 673-81.
- 145.Fernandez-Botran, R., F. A. Crespo, et al. (2002). "Soluble cytokine receptors in biological therapy." Expert Opin Biol Ther **2**(6): 585-605.
- 146.Fernandez-Botran, R., P. M. Chilton, et al. (1996). "Control of the production of soluble interleukin-4 receptors: implications in immunoregulation." J Leukoc Biol **59**(4): 499-504.
- 147.Fernandez-Botran, R., P. M. Chilton, et al. (1996). "Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy." Adv Immunol **63**: 269-336.
- 148.Fernandez-Botran, R., T. A. Wynn, et al. (1995). "Linked in vivo expression of soluble interleukin-4 receptor and interleukin-4 in murine schistosomiasis." Eur J Immunol **25**(3): 649-56.
- 149.Ferrari-Lacraz, S., X. X. Zheng, et al. (2001). « An antagonist IL-15/Fc protein prevents costimulation blockade-resistant rejection. » J Immunol **167**(6): 3478-85.
- 150.Ferrari-Lacraz, S., X. X. Zheng, et al. (2002). "Addition of an IL-15 mutant/FCgamma2A antagonist protein protects islet allografts from rejection overriding costimulation blockade." Transplant Proc **34**(3): 745-7.
- 151.Ferretti, S., O. Bonneau, et al. (2003). "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger." J Immunol **170**(4): 2106-12.
- 152.Fischer, M., J. Goldschmitt, et al. (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-5.
- 153.Flamand, L., I. Stefanescu, et al. (1996). "Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15." J Clin Invest **97**(6): 1373-81.
- 154.Fridman JS, Caulder E, Hansbury M, et al. (2007) "Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer." Clin Cancer Res **13**:1892–902.
- 155.Friedmann, E., E. Hauben, et al. (2006). "SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production." Nat Cell Biol **8**(8): 843-8.
- 156.Friedmann, M. C., T. S. Migone, et al. (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**(5): 2077-82.
- 157.Fujii, H., Y. Nakagawa, 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**(12): 5482-6.
- 158.Gadina, M., C. Sudarshan, et al. (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**(4): 2081-6.
- 159.Gadina, M., C. Sudarshan, et al. (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**(35): 26959-66.
- 160.Gadina, M., D. Hilton, et al. (2001). "Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after." Curr Opin Immunol **13**(3): 363-73.

161. Gaggero, A., B. Azzarone, et al. (1999). "Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms." Eur J Immunol **29**(4): 1265-74.
162. Garton, K. J., Gough, P. J. and Raines, E. W. (2006) "Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses." Journal of leukocyte biology. 79, 1105-1116
163. Gately, M. K., B. B. Desai, et al. (1991). "Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)." J Immunol **147**(3): 874-82.
164. Gately, M. K., D. M. Carvajal, et al. (1996). "Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo." Ann N Y Acad Sci **795**: 1-12.
165. Gearing, A. J. and W. Newman (1993). "Circulating adhesion molecules in disease." Immunol Today **14**(10): 506-12.
166. Gearing, A. J., P. Beckett, et al. (1994). "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases." Nature **370**(6490): 555-7.
167. Gearing, D. P. and D. Cosman (1991). "Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor." Cell **66**(1): 9-10.
168. Gessner, A. and M. Rollinghoff (1994). "Soluble IL-4 receptor, potential for therapeutic and prophylactic intervention." Behring Inst Mitt(95): 35-41.
169. Gessner, A. and M. Rollinghoff (2000). "Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes." Immunobiology **201**(3-4): 285-307.
170. Gilboa, E. (1999). "How tumors escape immune destruction and what we can do about it." Cancer Immunol Immunother **48**(7): 382-5.
171. Giri, J. G., M. Ahdieh, et al. (1994). "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15." Embo J **13**(12): 2822-30.
172. Giri, J. G., S. Kumaki, et al. (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**(15): 3654-63.
173. Giron-Michel, J., A. Caignard, et al. (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**(1): 109-17.
174. Giron-Michel, J., M. Fogli, et al. (2003). "Detection of a functional hybrid receptor gammac/GM-CSFRbeta in human hematopoietic CD34+ cells." J Exp Med **197**(6): 763-75.
175. Giron-Michel, J., M. Giuliani, et al. (2005). "Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15R{alpha} complexes display differential signalling and functions on human haematopoietic progenitors." Blood.
176. Giron-Michel, J., F. Menard, et al. (2009). « EBV-associated mononucleosis does not induce long term global deficit in T-cell responsiveness to IL-15. » Blood
177. Goldsmith, M. A., S. Y. Lai, et al. (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**(37): 21729-37.
178. Gomez, M. I., M. O. Seaghdha, et al. (2007). « Staphylococcus aureus protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling. » Embo J **26**(3): 701-9.
179. Gomez-Lechon, M. J. (1999). « Oncostatin M: signal transduction and biological activity. » Life Sci **65**(20): 2019-30.

180. Grabstein, K. H., J. Eisenman, et al. (1994). "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor." Science **264**(5161): 965-8.
181. Gri, G., C. Chiodoni, et al. (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**(15): 4390-7.
182. Grotzinger, J., T. Kernebeck, et al. (1999). "IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?" Biol Chem **380**(7-8): 803-13.
183. Gubler, U., A. O. Chua, et al. (1991). "Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4143-7.
184. Ha, S. J., C. H. Lee, et al. (1999). "A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages." J Immunol **163**(5): 2902-8.
185. Hacker, C., R. D. Kirsch, et al. (2003). "Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development." Nat Immunol **4**(4): 380-6.
186. Handisurya A, Steiner GE, Stix U, et al. (2001) "Differential expression of interleukin-15, a pro-inflammatory cytokine and T-cell growth factor, and its receptor in human prostate." Prostate **49**:251-62.
187. Hanick, N. A., M. Rickert, et al. (2007). "Elucidation of the interleukin-15 binding site on its alpha receptor by NMR." Biochemistry **46**(33): 9453-61.
188. Hanisch, U. K., S. A. Lyons, et al. (1997). "Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity." J Biol Chem **272**(46): 28853-60.
189. Harada, S., M. Yamamura, et al. (1999). "Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **42**(7): 1508-16.
190. Harcourt, L. J., A. G. Holmes, et al. (2005). "Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice." Am J Pathol **166**(4): 1131-41.
191. Hawari, F. I., F. N. Rouhani, et al. (2004). "Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1297-302.
192. Heaney, M. L. and D. W. Golde (1998). "Soluble receptors in human disease." J Leukoc Biol **64**(2): 135-46.
193. Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem J **334** ( Pt 2): 297-314.
194. Hill, M. M. and Hemmings, B. A. (2002) "Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy." Pharmacology & therapeutics. 93, 243-251
195. Hinkle, C. L., Sunnarborg, S. W., Loiselle, D., Parker, C. E., Stevenson, M., Russell, W. E. and Lee, D. C. (2004) "Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency." The Journal of biological chemistry. 279, 24179-24188
196. Ho, T. S., Y. P. Ho, et al. (2007). "Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells." Biomed Pharmacother **61**(9): 578-87.

- 197.Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihiro T, et al. (2002) "Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance." Clin Cancer Res **8**:2553-62.
- 198.Hofmeister, R., A. R. Khaled, et al. (1999). "Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 41-60.
- 199.Honda, M., K. Kitamura, et al. (1990). "Identification of a soluble IL-2 receptor beta-chain from human lymphoid cell line cells." J Immunol **145**(12): 4131-5.
- 200.Honda, M., S. Yamamoto, et al. (1992). "Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection." J Immunol **148**(7): 2175-80.
- 201.Hoontrakoon, R., H. W. Chu, et al. (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**(4): 404-12.
- 202.Hori, T., Uchiyama, T., Tsudo, M., Umadome, H., Ohno, H., Fukuhara, S., Kita, K. & Uchino, H. (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**, 1069-72.
- 203.Houtkamp, M. A., A. C. van Der Wal, et al. (2001). "Interleukin-15 expression in atherosclerotic plaques: an alternative pathway for T-cell activation in atherosclerosis?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1208-13.
- 204.Huntington, N. D., N. Legrand, et al. (2009). "IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo." J Exp Med **206**(1): 25-34.
- 205.Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, et al. (1995). "Signaling through the hematopoietic cytokine receptors." Annu Rev Immunol **13**: 369-98.
- 206.Inagaki-Ohara, K., H. Nishimura, et al. (1997). "Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice." Eur J Immunol **27**(11): 2885-91.
- 207.Jablonska, E., L. Piotrowski, et al. (2001). "Effect of IL-15 on the secretion of IL-1beta, IL-1Ra and sIL-1RII by PMN from cancer patients." Cytokine **16**(5): 173-7.
- 208.Jackson, N. E., H. W. Wang, et al. (2005). "IL-15 induces mast cell migration via a pertussis toxin-sensitive receptor." Eur J Immunol **35**(8): 2376-85.
- 209.Jacobs, C. A., D. H. Lynch, et al. (1991). "Characterization and pharmacokinetic parameters of recombinant soluble interleukin-4 receptor." Blood **77**(11): 2396-403.
- 210.Jacques, Y., B. Le Mauff, et al. (1987). "A soluble interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds interleukin 2 with low affinity." J Immunol **139**(7): 2308-16.
- 211.Johnston, J. A., C. M. Bacon, 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**(19): 8705-9.
- 212.Johnston, J. A., M. Kawamura, et al. (1994). "Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2." Nature **370**(6485): 151-3.
- 213.Jones, S. A. and S. Rose-John (2002). "The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex." Biochim Biophys Acta **1592**(3): 251-63.
- 214.Jones, S. A., S. Horiuchi, et al. (2001). "The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease." Faseb J **15**(1): 43-58.

- 215.Jonuleit, H., K. Wiedemann, et al. (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**(6): 2610-5.
- 216.Jostock, T., J. Mullberg, et al. (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." Eur J Biochem **268**(1): 160-7.
- 217.Jullien D., Sieling PA., et al (1997) "IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection". J Immunol. **15**;158(2):800-6.
- 218.Kaibe, M., M. Ohishi, et al. (2005). "Serum interleukin-15 concentration in patients with essential hypertension." Am J Hypertens **18**(8): 1019-25.
- 219.Kajita, M., Y. Itoh, et al. (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." J Cell Biol **153**(5): 893-904.
- 220.Kakumu, S., A. Okumura, et al. (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**(3): 458-63.
- 221.Kanakura, Y., H. Sugahara, et al. (1993). "Functional expression of interleukin 2 receptor in a human factor-dependent megakaryoblastic leukemia cell line: evidence that granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits interleukin 2 binding to its receptor." Cancer Res **53**(3): 675-80.
- 222.Kanazawa, T., M. L. Keeler, et al. (1994). "Serine-rich region of the IL-2 receptor beta-chain is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase." Cell Immunol **156**(2): 378-88.
- 223.Kanegane, H. and G. Tosato (1996). "Activation of naive and memory T cells by interleukin-15." Blood **88**(1): 230-5.
- 224.Karnitz, L. M., L. A. Burns, et al. (1995). "Interleukin-2 triggers a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent MEK activation pathway." Mol Cell Biol **15**(6): 3049-57.
- 225.Karnitz, L. M., S. L. Sutor, et al. (1994). "The Src-family kinase, Fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol 3-kinase in an interleukin 2-responsive T cell line." J Exp Med **179**(6): 1799-808.
- 226.Katsanis, E., Z. Xu, et al. (1996). "IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice." Transplantation **62**(6): 872-5.
- 227.Kawaguchi, N., Horiuchi, K., Becherer, J. D., Toyama, Y., Besmer, P. and Blobel, C. P. (2007) "Different ADAMs have distinct influences on Kit ligand processing: phorbol-ester-stimulated ectodomain shedding of Kitl1 by ADAM17 is reduced by ADAM19." Journal of cell science. **120**, 943-952
- 228.Kennedy, M. K., M. Glaccum, et al. (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." J Exp Med **191**(5): 771-80.
- 229.Kenny PA, Bissell MJ. (2007) "Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer." J Clin Invest **117**:337-45.
- 230.Khan, I. A., M. Moretto, et al. (2002). "Treatment with soluble interleukin-15Ralpha exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8+ T cell response." J Exp Med **195**(11): 1463-70.
- 231.Khawam, K., J. Giron-Michel, et al. (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.
- 232.Kim, Y. S., W. Maslinski, et al. (1998). "Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc gamma2a protein blocks delayed-type hypersensitivity." J Immunol **160**(12): 5742-8.

- 233.Kirchner, S., E. Holler, et al. (2004). "Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes." Cytokine **28**(2): 67-74.
- 234.Kirman, I. and O. H. Nielsen (1996). "Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis." Am J Gastroenterol **91**(9): 1789-94.
- 235.Kishimoto, T., Taga, T. and Akira, S. (1994) "Cytokine signal transduction." Cell. 76, 253-262
- 236.Klebanoff CA, Finkelstein SE, Surman DR, et al. (2004) "IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumorreactive CD8+ T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 1969-74.
- 237.Knupfer, H. and R. Preiss (2008). "sIL-6R: more than an agonist?" Immunol Cell Biol **86**(1): 87-91.
- 238.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**, 721-7.
- 239.Koka, R., P. R. Burkett, et al. (2003). "Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice." J Exp Med **197**(8): 977-84.
- 240.Koolwijk, P., N. Sidenius, et al. (2001). "Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices." Blood **97**(10): 3123-31.
- 241.Kotake, S., N. Udagawa, et al. (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." J Clin Invest **103**(9): 1345-52.
- 242.Kotenko, S. V., L. S. Izotova, et al. (2001). "Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity." J Immunol **166**(12): 7096-103.
- 243.Kottlil, S., T. W. Chun, et al. (2003). "Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function." J Infect Dis **187**(7): 1038-45.
- 244.Kozak, M. (1992). "Regulation of translation in eukaryotic systems." Annu Rev Cell Biol **8**: 197-225.
- 245.Krause, H., B. Jandrig, et al. (1996). "Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15)." Cytokine **8**(9): 667-74.
- 246.Krutzik, S. R., B. Tan, et al. (2005). "TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells." Nat Med **11**(6): 653-60.
- 247.Kuczynski, S., H. Winiarska, et al. (2005). "IL-15 is elevated in serum patients with type 1 diabetes mellitus." Diabetes Res Clin Pract **69**(3): 231-6.
- 248.Kuhn, P. H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C. and Lichtenthaler, S. F. (2007) "Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase." The Journal of biological chemistry. 282, 11982-11995
- 249.Kuhns, D. B., W. G. Alvord, et al. (1995). "Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and E-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans." J Infect Dis **171**(1): 145-52.
- 250.Kumaki, N., D. M. Anderson, et al. (1996). "Expression of interleukin-15 and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells." Curr Eye Res **15**(8): 876-82.
- 251.Kumaki, S., H. D. Ochs, 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**(4): 1428-36.
- 252.Kumaki, S., R. Armitage, et al. (1996). "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**(6): 1235-9.

253. Kuniyasu H, Ohmori H, Sasaki T, et al. (2003) « Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis.” Clin Cancer Res **9**: 4802–10.
254. Kuniyoshi, J. S., C. J. Kuniyoshi, et al. (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**(1): 48-58.
255. Kurowska, M., W. Rudnicka, et al. (2002). “Expression of IL-15 and IL-15 receptor isoforms in select structures of human fetal brain.” Ann N Y Acad Sci **966**: 441-5.
256. Kurowska, M., W. Rudnicka, et al. (2002). “Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2.” J Immunol **169**(4): 1760-7.
257. Kurschner, C., G. Garotta, et al. (1992). “Construction, purification, and characterization of new interferon gamma (IFN gamma) inhibitor proteins. Three IFN gamma receptor-immunoglobulin hybrid molecules.” J Biol Chem **267**(13): 9354-60.
258. Kurth, I., U. Horsten, et al. (2000). “Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130.” J Immunol **164**(1): 273-82.
259. Kurys, G., Y. Tagaya, et al. (2000). “The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15.” J Biol Chem **275**(39): 30653-9.
260. Lainez, B., J. M. Fernandez-Real, et al. (2004). “Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2.” Int Immunol **16**(1): 169-77.
261. Lantz, M., S. Malik, et al. (1990). “Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans.” Cytokine **2**(6): 402-6.
262. Lawrence T, Hageman T, Balkwill F. (2007) “Cancer. Sex, cytokines, and cancer.” Science **317**:51–2.
263. Layton, J. E., N. E. Hall, et al. (2001). “Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor.” J Biol Chem **276**(39): 36779-87.
264. Leeuwenberg, J. F., M. A. Dentener, et al. (1994). “Lipopolysaccharide LPS-mediated soluble TNF receptor release and TNF receptor expression by monocytes. Role of CD14, LPS binding protein, and bactericidal/permeability-increasing protein.” J Immunol **152**(10): 5070-6.
265. Lehours, P., Raher, S., Dubois, S., Guo, J., Godard, A. & Jacques, Y. (2000). Subunit structure of the high and low affinity human interleukin-15 receptors. Eur Cytokine Netw **11**, 207-15.
266. Leonard, J. D., Lin, F. and Milla, M. E. (2005) “Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch.” The Biochemical journal. **387**, 797-805
267. Leroy, S., S. Dubois, et al. (2001). “Interleukin-15 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome).” Br J Dermatol **144**(5): 1016-23.
268. Levine, S. J. (2004). “Mechanisms of soluble cytokine receptor generation.” J Immunol **173**(9): 5343-8.
269. Li Q, Withoff S, Verma IM. (2005) “Inflammation-associated cancer: NF- $\kappa$ B is the lynchpin.” Trends Immunol **26**: 318–25.
270. Li, X. C., G. Demirci, et al. (2001). “IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo.” Nat Med **7**(1): 114-8.



- 271.Li, X. C., P. Roy-Chaudhury, et al. (1998). "IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection." J Immunol **161**(2): 890-6.
- 272.Lin WW, Karin M. (2007) "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer." J Clin Invest **117**:1175-83.
- 273.Lin, J. X., T. S. Migone, et al. (1995). "The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15." Immunity **2**(4): 331-9.
- 274.Lin, S. J., R. L. Roberts, et al. (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**(5): 335-45.
- 275.Ling, P., M. K. Gately, et al. (1995). "Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity." J Immunol **154**(1): 116-27.
- 276.Liu, Z., K. Geboes, et al. (2000). "IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production." J Immunol **164**(7): 3608-15.
- 277.Lodolce, J. P., D. L. Boone, et al. (1998). "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." Immunity **9**(5): 669-76.
- 278.Lorenzen, I., A. J. Dingley, et al. (2006). "The structure of the interleukin-15 alpha receptor and its implications for ligand binding." J Biol Chem **281**(10): 6642-7.
- 279.Lotze, M. T., M. C. Custer, et al. (1987). "In vivo administration of purified human interleukin-2 to patients with cancer: development of interleukin-2 receptor positive cells and circulating soluble interleukin-2 receptors following interleukin-2 administration." Cancer Res **47**(8): 2188-95.
- 280.Loughnan, M. S. and G. J. Nossal (1989). "Interleukins 4 and 5 control expression of IL-2 receptor on murine B cells through independent induction of its two chains." Nature **340**(6228): 76-9.
- 281.Lowenthal, J. W., C. Tougne, et al. (1985). "Antigenic stimulation regulates the expression of IL 2 receptors in a cytolytic T lymphocyte clone." J Immunol **134**(2): 931-9.
- 282.Ma, Y., H. E. Hurst, et al. (1996). "Soluble cytokine receptors as carrier proteins: effects of soluble interleukin-4 receptors on the pharmacokinetics of murine interleukin-4." J Pharmacol Exp Ther **279**(1): 340-50.
- 283.Mackiewicz, A., H. Schooltink, et al. (1992). "Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins." J Immunol **149**(6): 2021-7.
- 284.Maeda, M., N. Arima, et al. (1987). "Evidence for the interleukin-2 dependent expansion of leukemic cells in adult T cell leukemia." Blood **70**(5): 1407-11.
- 285.Maliszewski, C. R., T. A. Sato, et al. (1994). "In vivo biological effects of recombinant soluble interleukin-4 receptor." Proc Soc Exp Biol Med **206**(3): 233-7.
- 286.Mangi, M. H. and A. C. Newland (1999). "Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions." Cytokines Cell Mol Ther **5**(2): 87-95.
- 287.Mariner, J. M., V. Lantz, et al. (2001). "Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site." J Immunol **166**(4): 2602-9.
- 288.Mariner, J. M., Y. Mamane, et al. (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**(11): 5667-74.

- 289.Mastroianni, C. M., G. d'Ettorre, et al. (2000). "Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection." Blood **96**(5): 1979-84.
- 290.Mastroianni, C. M., G. d'Ettorre, et al. (2004). "Teaching tired T cells to fight HIV: time to test IL-15 for immunotherapy?" Trends Immunol **25**(3): 121-5.
- 291.Masuda, A., T. Matsuguchi, et al. (2000). "Interleukin-15 induces rapid tyrosine phosphorylation of STAT6 and the expression of interleukin-4 in mouse mast cells." J Biol Chem **275**(38): 29331-7.
- 292.Masuda, A., T. Matsuguchi, et al. (2001). "Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression." J Biol Chem **276**(28): 26107-13.
- 293.Mattei, F., G. Schiavoni, et al. (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**(3): 1179-87.
- 294.McDonald, P. P., M. P. Russo, et al. (1998). « Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. » Blood **92**(12): 4828-35.
- 295.McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. (1997) "Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in rheumatoid arthritis." Nat Med **3**:189–95.
- 296.McInnes, I. B. and F. Y. Liew (2005). "Cytokine networks—towards new therapies for rheumatoid arthritis." Nat Clin Pract Rheumatol **1**(1): 31-9.
- 297.McInnes, I. B., B. P. Leung, et al. (1997). "Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in rheumatoid arthritis." Nat Med **3**(2): 189-95.
- 298.McInnes, I. B., J. al-Mughales, et al. (1996). "The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis." Nat Med **2**(2): 175-82.
- 299.Meazza, R., A. Gaggero, et al. (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**(5): 1049-54.
- 300.Meazza, R., S. Basso, 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**(2): 189-95.
- 301.Meazza, R., S. Verdiani, et al. (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**(10): 2187-92.
- 302.Meissner, U., H. Blum, et al. (2001). "A soluble form of the murine common gamma chain is present at high concentrations in vivo and suppresses cytokine signaling." Blood **97**(1): 183-91.
- 303.Merberg, D. M., S. F. Wolf, et al. (1992). "Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family." Immunol Today **13**(2): 77-8.
- 304.Mezyk, R., M. Bzowska, et al. (2003). "Structure and functions of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme." Acta Biochim Pol **50**(3): 625-45.
- 305.Migone, T. S., S. Rodig, et al. (1998). "Functional cooperation of the interleukin-2 receptor beta chain and Jak1 in phosphatidylinositol 3-kinase recruitment and phosphorylation." Mol Cell Biol **18**(11): 6416-22.
- 306.Milla, M. E., Gonzales, P. E. and Leonard, J. D. (2006) "The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch." Cell biochemistry and biophysics. **44**, 342-348

- 307.Mingari, M. C., M. Ponte, et al. (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**(3): 1172-7.
- 308.Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, et al. (2005) "Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha." Gastroenterology **128**:376-92.
- 309.Mitoma, H., T. Horiuchi, et al. (2005). "Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha." Gastroenterology **128**(2): 376-92.
- 310.Miyazaki, T., A. Takaoka, et al. (1998). "Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-coupled Jak signaling pathway." Genes Dev **12**(6): 770-5.
- 311.Mody CH, Spurrell JC, et al (1998) "Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes." J Infect Dis. **178**(3):803-14.
- 312.Mohamadzadeh, M., A. Takashima, et al. (1995). "Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin." J Immunol **155**(9): 4492-6.
- 313.Mohamadzadeh, M., F. Berard, et al. (2001). "Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells." J Exp Med **194**(7): 1013-20.
- 314.Mohammed, F. F., Smookler, D. S., Taylor, S. E., Fingleton, B., Kassiri, Z., Sanchez, O. H., English, J. L., Matrisian, L. M., Au, B., Yeh, W. C. and Khokha, R. (2004) "Abnormal TNF activity in Timp3-/- mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration." Nature genetics. **36**, 969-977
- 315.Mohler, K. M., D. S. Torrance, et al. (1993). "Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists." J Immunol **151**(3): 1548-61.
- 316.Mok, C. C. and C. S. Lau (2003). "Pathogenesis of systemic lupus erythematosus." J Clin Pathol **56**(7): 481-90.
- 317.Monson, N. L., T. J. Fenske, et al. (2001). "A p74 common gamma receptor chain isoform facilitates IL-2 and IL-15 responses by the myelomonocytic cell line Tf-1beta2." J Leukoc Biol **69**(3): 419-25.
- 318.Montero-Julian, F. A. (2001). "The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **47**(4): 583-97.
- 319.Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- 320.Mortier, E., Bernard, J., Plet, A. and Jacques, Y. (2004) "Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist." J Immunol. **173**, 1681-1688
- 321.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**, 1612-9.
- 322.Mortier, E., T. Woo, et al. (2008). « IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. » J Exp Med **205**(5): 1213-25.
- 323.Mosley, B., M. P. Beckmann, et al. (1989). "The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms." Cell **59**(2): 335-48.
- 324.Moss, M. L. and Bartsch, J. W. (2004) "Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members." Biochemistry. **43**, 7227-7235

325. Moss, M. L., S. L. Jin, et al. (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." Nature **385**(6618): 733-6.
326. Mottonen, M., P. Isomaki, et al. (2000). "Interleukin-15 up-regulates the expression of CD154 on synovial fluid T cells." Immunology **100**(2): 238-44.
327. Mueller, Y. M., P. M. Bojczuk, et al. (2003). "IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells." Blood **101**(3): 1024-9.
328. Mueller, Y. M., V. Makar, et al. (2003). "IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells." Int Immunol **15**(1): 49-58.
329. Mullberg, J., F. H. Durie, et al. (1995). "A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor." J Immunol **155**(11): 5198-205.
330. Mullberg, J., H. Schooltink, et al. (1992). "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 794-800.
331. Muller-Newen, G., A. Kuster, et al. (1998). "Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses." J Immunol **161**(11): 6347-55.
332. Murata, T., J. Taguchi, et al. (1999). "Sharing of receptor subunits and signal transduction pathway between the IL-4 and IL-13 receptor system." Int J Hematol **69**(1): 13-20.
333. Murray, A. M., B. Simm, et al. (1998). "Cytokine gene expression in murine fetal intestine: potential for extrathymic T cell development." Cytokine **10**(5): 337-45.
334. Musso, T., L. Calosso, et al. (1999). "Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15." Blood **93**(10): 3531-9.
335. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, et al. (2001). "Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 53-72.
336. Naora, H. and M. L. Gougeon (1999). "Enhanced survival and potent expansion of the natural killer cell population of HIV-infected individuals by exogenous interleukin-15." Immunol Lett **68**(2-3): 359-67.
337. Neely, G. G., S. Epelman, et al. (2004). "Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling." J Immunol **172**(7): 4225-34.
338. Neely, G. G., S. M. Robbins, et al. (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**(9): 5011-7.
339. Nelson, B. H. and D. M. Willerford (1998). "Biology of the interleukin-2 receptor." Adv Immunol **70**: 1-81.
340. Nesbitt, A., G. Fossati, et al. (2007). "Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents." Inflamm Bowel Dis **13**(11): 1323-32.
341. Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, et al. (2007) "Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma." Cancer Sci **98**:740-6.
342. Niedbala, W., Wei, X. Q., Cai, B., Hueber, A. J., Leung, B. P., McInnes, I. B. and Liew, F. Y. (2007) "IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells." European journal of immunology. **37**, 3021-3029

343. Nieto, M., M. A. del Pozo, et al. (1996). "Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes." Eur J Immunol **26**(6): 1302-7.
344. Nilsen, E. M., F. E. Johansen, et al. (1998). "Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine." Gut **42**(5): 635-42.
345. Nishimura, H., A. Fujimoto, et al. (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**(1): 19-2
346. Nishimura H, Hiromatsu K, et al., (1996) "IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection." J Immunol. **15**;156(2):663-9.
347. Nishimura, H., T. Yajima, et al. (2000). "Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo." J Exp Med **191**(1): 157-70.
348. Nishiwaki, T., K. Ina, et al. (2005). "Possible involvement of the interleukin-15 and interleukin-15 receptor system in a heightened state of lamina propria B cell activation and differentiation in patients with inflammatory bowel disease." J Gastroenterol **40**(2): 128-36.
349. Nishiyama, R., T. Sakaguchi, et al. (2001). "Interleukin-2 receptor beta subunit-dependent and -independent regulation of intestinal epithelial tight junctions." J Biol Chem **276**(38): 35571-80.
350. Noguchi, M., S. Adelstein, et al. (1993). "Characterization of the human interleukin-2 receptor gamma chain gene." J Biol Chem **268**(18): 13601-8.
351. Noguchi, M., Y. Nakamura, et al. (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor." Science **262**(5141): 1877-80.
352. 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**, 717-25.
353. Nosaka, T., J. M. van Deursen, et al. (1995). "Defective lymphoid development in mice lacking Jak3." Science **270**(5237): 800-2.
354. Novick, D., S. H. Kim, et al. (1999). "Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response." Immunity **10**(1): 127-36.
355. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. (2003) "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth." Blood **101**:2620-7.
356. Obermeier, F., M. Hausmann, et al. (2006). « IL-15 protects intestinal epithelial cells. » Eur J Immunol **36**(10): 2691-9.
357. Ogasawara, K., S. Hida, et al. (1998). "Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells." Nature **391**(6668): 700-3.
358. Ogata, Y., A. Kukita, et al. (1999). "A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2." J Immunol **162**(5): 2754-60.
359. Oh S, Perera LP, Burke DS, Waldmann TA, Berzofsky JA. (2001) "IL-15/IL-15Ra-mediated avidity maturation of memory CD8+ T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 15154-9.
360. Ohara, J. and W. E. Paul (1988). "Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 8221-5.
361. Ohkawa, T., S. Seki, et al. (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**(3): 281-90.

- 362.Ohta, N., T. Hiroi, et al. (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**(1): 460-8.
- 363.Ohteki T, Tada H, Ishida K, et al. (2006) "Essential roles of DC derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo." J Exp Med **203**:2329-38.
- 364.Ohteki, T., H. Yoshida, et al. (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**(6): 967-72.
- 365.Ohteki, T., K. Suzue, et al. (2001). "Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response." Nat Immunol **2**(12): 1138-43.
- 366.Ohteki, T., S. Ho, et al. (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**(12): 5931-5.
- 367.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**, 37191-204.
- 368.Onu, A., T. Pohl, et al. (1997). "Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms." J Immunol **158**(1): 255-62.
- 369.Oppenheimer-Marks, N., R. I. Brezinschek, et al. (1998). "Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model In vivo." J Clin Invest **101**(6): 1261-72.
- 370.Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.
- 371.Ozaki, K. and W. J. Leonard (2002). "Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy." J Biol Chem **277**(33): 29355-8.
- 372.Parham, C., M. Chirica, et al. (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." J Immunol **168**(11): 5699-708.
- 373.Parrish-Novak, J., S. R. Dillon, et al. (2000). "Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function." Nature **408**(6808): 57-63.
- 374.Pashenkov, M., M. Mustafa, et al. (1999). "Levels of interleukin-15-expressing blood mononuclear cells are elevated in multiple sclerosis." Scand J Immunol **50**(3): 302-8.
- 375.Pavlakakis, M., J. Strehlau, et al. (1996). "Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection." Transplantation **62**(4): 543-5.
- 376.Pelletier, M., C. Ratthe, et al. (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**(1-2): 164-70.
- 377.Pennica, D., T. A. Swanson, et al. (1996). "Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization." Cytokine **8**(3): 183-9.
- 378.Pereno, R., A. Gaggero, et al. (1999). "IL-15/IL-15R alpha intracellular trafficking in human cells and protection from apoptosis." Ann N Y Acad Sci **876**: 236-45.
- 379.Pereno, R., J. Giron-Michel, et al. (2000). "IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha." Oncogene **19**(45): 5153-62.

380. Perera, L. P., C. K. Goldman, et al. (1999). "IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes." J Immunol **162**(5): 2606-12.
381. Perkins, S. J., P. I. Haris, et al. (1988). "A study of the structure of human complement component factor H by Fourier transform infrared spectroscopy and secondary structure averaging methods." Biochemistry **27**(11): 4004-12.
382. Peters, M., A. M. Muller, et al. (1998). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis." Blood **92**(10): 3495-504.
383. Peters, M., S. Jacobs, et al. (1996). "The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6." J Exp Med **183**(4): 1399-406.
384. Pettit, D. K., T. P. Bonnert, et al. (1997). "Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling." J Biol Chem **272**(4): 2312-8.
385. Pflanz, S., I. Tacke, et al. (1999). "A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130." FEBS Lett **450**(1-2): 117-22.
386. Pflanz, S., J. C. Timans, et al. (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." Immunity **16**(6): 779-90.
387. Pflanz, S., L. Hibbert, et al. (2004). "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27." J Immunol **172**(4): 2225-31.
388. Pirtskhalaishvili, G., G. V. Shurin, et al. (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**(4): 506-13.
389. Puzanov, I. J., M. Bennett, et al. (1996). "IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells." J Immunol **157**(10): 4282-5.
390. Qin, J. Z., C. L. Zhang, et al. (2001). "Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells." Blood **98**(9): 2778-83.
391. Qin, J. Z., R. Dummer, et al. (1999). "Constitutive and interleukin-7/interleukin-15 stimulated DNA binding of Myc, Jun, and novel Myc-like proteins in cutaneous T-cell lymphoma cells." Blood **93**(1): 260-7.
392. 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**, 623-36
393. Quinn, L. S., L. Strait-Bodey, et al. (2005). "Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway." Cell Biol Int **29**(6): 449-57.
394. Rafei, M., J. H. Wu, et al. (2007). "A GM-CSF and IL-15 fusokine leads to paradoxical immunosuppression in vivo via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL-15 receptor complex." Blood **109**(5): 2234-42.
395. Ravichandran, K. S. and S. J. Burakoff (1994). "The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation." J Biol Chem **269**(3): 1599-602.
396. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. (2002) "Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma." Clin Cancer Res **8**:3137-45.

- 397.Reif, K., B. M. Burgering, et al. (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase." J Biol Chem **272**(22): 14426-33.
- 398.Renne, C., K. J. Kallen, et al. (1998). "A new type of cytokine receptor antagonist directly targeting gp130." J Biol Chem **273**(42): 27213-9.
- 399.Richter, W. F., H. Gallati, et al. (1999). "Animal pharmacokinetics of the tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin fusion protein lenercept and their extrapolation to humans." Drug Metab Dispos **27**(1): 21-5.
- 400.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**, 1477-80.
- 401.Robledo, O., M. Fourcin, et al. (1997). "Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component." J Biol Chem **272**(8): 4855-63.
- 402.Rodig, S. J., M. A. Meraz, et al. (1998). "Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses." Cell **93**(3): 373-83.
- 403.Romashkova, J. A. and Makarov, S. S. (1999) "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature, 401, 86-90
- 404.Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, et al. (2001). « Type 1 T regulatory cells. » Immunol Rev **182**: 68-79.
- 405.Rose-John, S. and P. C. Heinrich (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." Biochem J **300** ( Pt 2): 281-90.
- 406.Ross, M. E. and M. A. Caligiuri (1997). "Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response." Blood **89**(3): 910-8.
- 407.Rubin, L. A. and D. L. Nelson (1990). "The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application." Ann Intern Med **113**(8): 619-27.
- 408.Rubinstein, M. P., M. Kovar, et al. (2006). "Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9166-71.
- 409.Ruchatz, H., B. P. Leung, et al. (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**(11): 5654-60.
- 410.Ruckert, R., K. Brandt, et al. (2005). "Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo." J Immunol **174**(9): 5507-15.
- 411.Ruhl, S., D. H. Pluznik, et al. (1993). "Soluble interleukin-4 receptor production by murine myeloid progenitor cells: induction by interleukin-6 and interferon-gamma." Cytokine **5**(2): 144-9.
- 412.Russell, S. M., J. A. Johnston, et al. (1994). "Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID." Science **266**(5187): 1042-5.
- 413.Saikh, K. U., A. S. Khan, et al. (2001). "IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells." Clin Exp Immunol **126**(3): 447-55.
- 414.Sakai, T., K. Kusugami, et al. (1998). "Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **114**(6): 1237-43.
- 415.Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J Mol Biol **234**, 779-815.
- 416.Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.



- 417.Sanada, S., D. Hakuno, et al. (2007). "IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system." J Clin Invest **117**(6): 1538-49.
- 418.Sancho, D., M. Yanez-Mo, et al. (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**(3): 886-96.
- 419.Sandau, M. M., K. S. Schluns, et al. (2004). "Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells." J Immunol **173**(11): 6537-41.
- 420.Schluns, K. S., E. C. Nowak, et al. (2004). "Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5616-21.
- 421.Schluns, K. S., Stoklasek, T. & Lefrancois, L. (2005). The roles of interleukin-15 receptor alpha: transpresentation, receptor component, or both? Int J Biochem Cell Biol **37**, 1567-71.
- 422.Schon, M. P. (2005). "Advances in psoriasis treatment." Lancet **366**(9494): 1333-5.
- 423.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**, 271-5.
- 424.Schuster, B., M. Kovaleva, et al. (2003). "Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF." J Biol Chem **278**(11): 9528-35.
- 425.Seder, R. A. (1996). "High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4." J Immunol **156**(7): 2413-22.
- 426.Seigel, L. J., M. E. Harper, et al. (1984). "Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1." Science **223**(4632): 175-8.
- 427.Seike M, Yanaihara N, Bowman ED, et al. (2007) "Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier." J Natl Cancer Inst **99**:1257-69.
- 428.Shanafelt, A. B., Lin, Y., Shanafelt, M. C., Forte, C. P., Dubois-Stringfellow, N., Carter, C., Gibbons, J. A., Cheng, S. L., Delaria, K. A., Fleischer, R., Greve, J. M., Gundel, R., Harris, K., Kelly, R., Koh, B., Li, Y., Lantz, L., Mak, P., Neyer, L., Plym, M. J., Rocznik, S., Serban, D., Thrift, J., Tsuchiyama, L., Wetzel, M., Wong, M. & Zolotarev, A. (2000). A T-cell-selective interleukin 2 mutein exhibits potent antitumor activity and is well tolerated in vivo. Nat Biotechnol **18**, 1197-202.
- 429.Sheu, B. C., S. M. Hsu, et al. (2001). "A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression." Cancer Res **61**(1): 237-42.
- 430.Shi, Y. F., M. Hill, et al. (1997). "Human hematopoietic cell express two forms of the cytokine receptor common gamma-chain (gamma c)." Cell Res **7**(2): 195-205.
- 431.Signore, A., A. Annovazzi, et al. (2003). "Reduced cumulative incidence of diabetes but not insulinitis following administration of chimeric human IL-15-murine IgG2b in NOD mice." Diabetes Metab Res Rev **19**(6): 464-8.
- 432.Smith, C. A., T. Davis, et al. (1990). "A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins." Science **248**(4958): 1019-23.
- 433.Smith, C. A., T. Farrah, et al. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-62.

- 434.Smith, K. A. and D. A. Cantrell (1985). "Interleukin 2 regulates its own receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 864-8.
- 435.Smith, X. G., E. M. Bolton, et al. (2000). "Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival." J Immunol **165**(6): 3444-50.
- 436.Soderberg, A., A. M. Barral, et al. (2007). "Redox-signaling transmitted in trans to neighboring cells by melanoma-derived TNF-containing exosomes." Free Radic Biol Med **43**(1): 90-9.
- 437.Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. and Murphy, G. (2005) "ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking." Journal of cell science. 118, 2371-2380
- 438.Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrancois L. (2006) "Combined IL-15/IL-15Ra immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo." J Immunol **177**:6072–80.
- 439.Strengell, M., S. Matikainen, et al. (2003). "IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells." J Immunol **170**(11): 5464-9.
- 440.Sugiura, T., M. Harigai, et al. (2002). "Increased IL-15 production of muscle cells in polymyositis and dermatomyositis." Int Immunol **14**(8): 917-24.
- 441.Sun, A., H. Wei, et al. (2006). "Human interleukin-15 improves engraftment of human T cells in NOD-SCID mice." Clin Vaccine Immunol **13**(2): 227-34.
- 442.Sun, Y., P. Marz, et al. (2002). "The effect of gp130 stimulation on glutamate-induced excitotoxicity in primary hippocampal neurons." Biochem Biophys Res Commun **295**(2): 532-9.
- 443.Symons, J. A., J. A. Eastgate, et al. (1990). "A soluble binding protein specific for interleukin 1 beta is produced by activated mononuclear cells." Cytokine **2**(3): 190-8.
- 444.Tagaya, Y., G. Kurys, et al. (1997). "Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14444-9.
- 445.Tagaya, Y., J. D. Burton, et al. (1996). "Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells." Embo J **15**(18): 4928-39.
- 446.Taichman, R., I. Merida, et al. (1993). "Evidence that protein tyrosine kinase p56-Lck regulates the activity of phosphatidylinositol-3'-kinase in interleukin-2-dependent T-cells." J Biol Chem **268**(27): 20031-6.
- 447.Takeda, K., T. Kaisho, et al. (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**(9): 4652-60.
- 448.Takemoto, S., J. C. Mulloy, et al. (1997). "Proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma cells is associated with the constitutive activation of JAK/STAT proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13897-902.
- 449.Takeshita, T., H. Asao, et al. (1992). "Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor." Science **257**(5068): 379-82.
- 450.Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, et al. (1999) « Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice." Cancer Res **59**:3698–704.
- 451.Tartour E, Mosseri V, Jouffroy T, et al. (2001) « Serum soluble interleukin-2 receptor concentrations as an independent prognostic marker in head and neck cancer." Lancet **357**:1263–4.
- 452.Teague RM, Sather BD, Sacks JA, et al. (2006) "Interleukin-15 rescues tolerant CD8+ T cells for use in adoptive immunotherapy of established tumors." Nat Med **12**:335–41.

453. Tejedor, F. & Ballesta, J. P. (1982). Iodination of biological samples without loss of functional activity. Anal Biochem **127**, 143-9.
454. Tejman-Yarden, N., M. Zlotnik, et al. (2005). "Renal cells express a functional interleukin-15 receptor." Nephrol Dial Transplant **20**(3): 516-23.
455. Tellier, E., Canault, M., Rebsomen, L., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., Nalbone, G. and Peiretti, F. (2006) "The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts." Experimental cell research. 312, 3969-3980
456. Thery, C., L. Zitvogel, et al. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-79.
457. Thomis, D. C., C. B. Gurniak, et al. (1995). "Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3." Science **270**(5237): 794-7.
458. Timmermann, A., A. Kuster, et al. (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**(11): 2716-26.
459. Tinhofer, I., I. Marschitz, et al. (2000). "Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma." Blood **95**(2): 610-8.
460. Tokiwa, G., I. Dikic, et al. (1996). "Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway." Science **273**(5276): 792-4.
461. Trentin, L., A. Cerutti, et al. (1996). "Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders." Blood **87**(8): 3327-35.
462. Tsudo, M., R. W. Kozak, et al. (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**(24): 9694-8.
463. Ullrich, E., M. Bonmort, et al. (2008). "Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions." J Immunol **180**(12): 7887-97.
464. Upton, C., J. L. Macen, et al. (1991). "Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence." Virology **184**(1): 370-82.
465. Vázquez N, Walsh TJ, et al., (1998) « Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. » Infect Immun, **66**(1):145-50.
466. Velasco-Loyden, G., J. Arribas, et al. (2004). "The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1." J Biol Chem **279**(9): 7721-33.
467. Villadsen LS, Schuurman J, et al., (2003) « Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. » J Clin Invest. **112**(10):1571-80.
468. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. Nat Immunol **9**, 503-10.
469. Von Tresckow, B., Kallen, K. J., von Strandmann, E. P., Borchmann, P., Lange, H., Engert, A. and Hansen, H. P. (2004) "Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30." J Immunol. 172, 4324-4331

- 470.Voss, S. D., J. A. Hank, et al. (1989). "Serum levels of the low-affinity interleukin-2 receptor molecule (TAC) during IL-2 therapy reflect systemic lymphoid mass activation." Cancer Immunol Immunother **29**(4): 261-9.
- 471.Wajant, H., F. Henkler, et al. (2001). "The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators." Cell Signal **13**(6): 389-400.
- 472.Waldmann TA. (2006) "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design." Nat Rev Immunol **6**:595–601.
- 473.Waldmann, T. A. (2004). "Targeting the interleukin-15/interleukin-15 receptor system in inflammatory autoimmune diseases." Arthritis Res Ther **6**(4): 174-7.
- 474.Waldmann, T. A., S. Dubois, et al. (2001). "Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy." Immunity **14**(2): 105-10.
- 475.Walzer, T., L. Chiossone, et al. (2007). "Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor." Nat Immunol **8**(12): 1337-44.
- 476.Washizu, J., H. Nishimura, et al. (1998). "The NF-kappaB binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene." Immunogenetics **48**(1): 1-7.
- 477.Wei, X., M. Orchardson, et al. (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**(1): 277-82.
- 478.Weltman, J. K. and A. S. Karim (2000). "IL-5: biology and potential therapeutic applications." Expert Opin Investig Drugs **9**(3): 491-6.
- 479.Wilkinson, P. C. and F. Y. Liew (1995). "Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15." J Exp Med **181**(3): 1255-9.
- 480.Wittnebel, S., S. Da Rocha, et al. (2007). "Membrane-bound interleukin (IL)-15 on renal tumor cells rescues natural killer cells from IL-2 starvation-induced apoptosis." Cancer Res **67**(12): 5594-9.
- 481.Wolf JS, Li G, Varadhachary A, et al. (2007) « Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo." Clin Cancer Res **13**:1601–10.
- 482.Wolf, S. F., P. A. Temple, et al. (1991). "Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells." J Immunol **146**(9): 3074-81.
- 483.Wrighton, N., L. A. Campbell, et al. (1992). "The murine interleukin-4 receptor gene: genomic structure, expression and potential for alternative splicing." Growth Factors **6**(2): 103-18.
- 484.Wu, C., R. R. Warriar, et al. (1997). "Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells." Eur J Immunol **27**(1): 147-54.
- 485.Wu, Z., H. H. Xue, et al. (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**(12): 4411-9.
- 486.Wuttge, D. M., P. Eriksson, et al. (2001). "Expression of interleukin-15 in mouse and human atherosclerotic lesions." Am J Pathol **159**(2): 417-23.
- 487.Wymann, M. P., Pirola, L., Katanaev, V. L. and Bulgarelli-Leva, G. (1999) "Phosphoinositide 3-kinase signalling: no lipids." Biochemical Society transactions. **27**, 629-634
- 488.Xu, W., S. R. Presnell, et al. (2001). "A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9511-6.

489. Xu, X., S. H. Kang, et al. (1995). "Constitutive activation of different Jak tyrosine kinases in human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax protein or virus-transformed cells." *J Clin Invest* **96**(3): 1548-55.
490. Yajima T, Nishimura H et al., (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**(3):757-66.
491. Yajima T, Nishimura H, Wajjwalku W, et al. (2002) "Overexpression of interleukin-15 in vivo enhances antitumor activity against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented NK activity and cytotoxic T-cell response." *Int J Cancer* **99**:573-8.
492. Yajima T, Yoshihara K, Nakazato K, et al. (2006) "IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection." *J Immunol* **176**:507-15.
493. Yamada, H., N. Kaibara, et al. (2007). "Interleukin-15 selectively expands CD57+ CD28- CD4+ T cells, which are increased in active rheumatoid arthritis." *Clin Immunol* **124**(3): 328-35.
494. Yamada, Y., K. Sugawara, et al. (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**(11): 4265-72.
495. Yang, L., S. Thornton, et al. (2002). "Interleukin-15 inhibits sodium nitroprusside-induced apoptosis of synovial fibroblasts and vascular endothelial cells." *Arthritis Rheum* **46**(11): 3010-4.
496. Yawata, H., K. Yasukawa, et al. (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**(4): 1705-12.
497. Yodoi, J., Y. Tagaya, et al. (1987). "Interleukin-2 receptor-inducing factor(s) in adult T cell leukemia." *Acta Haematol* **78 Suppl 1**: 56-63.
498. Yoshida, H., S. Hamano, et al. (2001). "WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection." *Immunity* **15**(4): 569-78.
499. Yoshihara, K., H. Yamada, et al. (2007). "IL-15 exacerbates collagen-induced arthritis with an enhanced CD4+ T cell response to produce IL-17." *Eur J Immunol* **37**(10): 2744-52.
500. Young MR. (2006) "Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault." *Head Neck* **28**:462-70.
501. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. (2007) "Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment." *Nat Rev Immunol* **7**:41-51.
502. Yu, H., T. A. Fehniger, et al. (1998). "Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15." *Blood* **92**(10): 3647-57.
503. Yu, Q., C. Tang, et al. (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**(10): 6180-5.
504. Zambello, R., M. Facco, et al. (1997). "Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes." *Blood* **89**(1): 201-11.
505. Zamorano, J., H. Y. Wang, et al. (1998). "Regulation of cell growth by IL-2: role of STAT5 in protection from apoptosis but not in cell cycle progression." *J Immunol* **160**(7): 3502-12.

506. Zaunders, J. J., L. Moutouh-de Parseval, et al. (2003). "Polyclonal proliferation and apoptosis of CCR5+ T lymphocytes during primary human immunodeficiency virus type 1 infection: regulation by interleukin (IL)-2, IL-15, and Bcl-2." J Infect Dis 187(11): 1735-47.
507. Zhang, Z. Y., Zhou, B. and Xie, L. (2002) "Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors." Pharmacology & therapeutics. 93, 307-317.
508. Zhu, M. H., J. A. Berry, et al. (1998). "Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1-independent functional recruitment of Jak3 to IL-2Rbeta." J Biol Chem 273(17): 10719-25.
509. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, et al. (2000) "High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporine A-sensitive mechanism." J Immunol **164**: 2832-8.
510. Ziolkowska, M., A. Koc, et al. (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(5): 2832-8.
511. Zissel, G., I. Baumer, et al. (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(1): 105-12.
512. Zurawski, S. M., F. Vega, Jr., et al. (1993). "Definition and spatial location of mouse interleukin-2 residues that interact with its heterotrimeric receptor." Embo J 12(13): 5113-9.

# ***ANNEXES***

## **ANNEXE I**

### ***ARTICLE :***

**High antitumor activity of RLI, an IL-15-IL-15Ralpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer**

**(Bessard A. *et al.* En révision à *Molecular Cancer Therapeutics*)**



## **High antitumor activity of RLI, an IL-15-IL-15Ralpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer**

Anne BESSARD<sup>1,2\*</sup>, Véronique SOLÉ<sup>1,2</sup>, Grégory BOUCHAUD<sup>1,2</sup>, Agnès QUÉMÉNER<sup>1,2\$</sup> and Yannick JACQUES<sup>1,2\$</sup>

**Running title : RLI, an IL-15-IL-15Ralpha fusion protein, in tumor therapy**

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

<sup>2</sup>Université de Nantes, IFR26, Nantes, France

<sup>\$</sup> these authors contributed equally to the work.

\* Corresponding author : Anne BESSARD, INSERM U892, Institut de Biologie  
9 quai Moncousu, 44093 NANTES Cedex 01, FRANCE  
E-mail address : [anne.bessard@univ-nantes.fr](mailto:anne.bessard@univ-nantes.fr)

Abbreviations : IL-15, interleukin-15 ; sIL-15Ra-sushi, soluble IL-15Ra sushi domain ; RLI or ILR, IL-15-sIL-15Ra-sushi fusion protein ; rIL-15, human recombinant IL-15 ; FCS, Fetal Calf Serum ; AICD, activation-induced cell death ; Tregs, T regulatory cells.

### Abstract

**Interleukin 15 (IL-15) is crucial for the development of innate immune cells (NK, NK-T,  $T\gamma\Delta$ ), cellular activation of T and NK cells, and survival of memory T CD8<sup>+</sup> cells. It has therefore an important role in tumor immunosurveillance and has a contemplated use in tumor immunotherapy as a component of vaccines, in conjunction with adoptive T-cell immunotherapy or in systemic cytokine therapy. We have previously engineered the fusion protein RLI, composed of the N-terminal (amino acids 1-77, sushi+) domain of IL-15R $\alpha$  coupled via a linker to IL-15, and shown that it displayed far better efficacy than IL-15 in vitro to drive cell proliferation through the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  receptor and in vivo to promote mobilization and expansion of NK cells. In this report, we further show that RLI has a higher efficiency than IL-15 or IL-2 to reduce lung and liver metastasis and enhance survival in the mouse B16F10 melanoma model, a result that was associated with a higher half-life in vivo. Moreover, RLI was also efficient to reduce the progression of metastasis of human colon carcinoma cells in an orthotopic nude mouse model. These findings hold significant importance for the use of RLI as a potential adjuvant/therapeutic.**

### Introduction

Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine of the four  $\alpha$ -helix bundle family, structurally related to IL-2 (1, 2). It shares with IL-2 similar in vitro biological properties, due to the common usage by the two cytokines of the IL-2/15R $\beta$  and  $\gamma$ c receptor chains (3). In addition, IL-2 and IL-15 each uses a private  $\alpha$  chain (IL-2R $\alpha$  and IL-15R $\alpha$ ) that confers cytokine specificity and enhances the affinity of cytokine binding (4, 5). Although both

cytokines play pivotal roles in innate and adaptive immunity, the major role of IL-2 is to limit continuous expansion of activated T cells, whereas IL-15 appears to be crucial for initiation of T cell division, development of NK cells and generation and maintenance of CD8<sup>+</sup> memory T cells (6-9). The antitumor roles of IL-15 have been demonstrated in several experimental models using IL-15 or IL-15 gene as an adjuvant for vaccination, in conjunction with adoptive T-cell immunotherapy or in systemic cytokine therapy. Ugen *et al.* (10) demonstrated the therapeutic antitumor potential of IL-15-expressing plasmid when delivered intratumorally into established subcutaneous B16 melanoma tumors in C57BL/6 mice. Intratumoral injection of IL-15 strongly increased efficacy of vaccines secreting IL-12, GM-CSF, TNF $\alpha$  and IL-6/sIL-6R $\alpha$ , otherwise being frequently inefficient (11, 12). IL-15 gene transfer suppressed tumor metastasis in a murine metastatic lymphoma model and the cotransfection by IL-15 and IL-21 genes was shown to protect completely from lethal intravenous challenge with the lymphoma cells, which was not achieved by administration of either cytokine gene alone (13). The antitumor effects of IL-15 gene transfer was also evidenced in the human N592 MHC class I negative small cell lung cancer cell line xenotransplanted in nude mice, with a complete rejection of N592 cells observed upon cotransfection of the IL-15 and IL-12 genes (14). Daily administration of IL-15 prolonged the period of remission induced by cyclophosphamide in mice bearing rhabdomyosarcoma (15). In a 4T1 mammary carcinoma mouse model, coadministration of intralesional IL-7 and IL-15 following radiofrequency thermal ablation of tumor, inhibited tumor development and lung metastasis (16). IL-15 protected against toxicity and potentiated the antitumor activity of 5-fluorouracil and irinotecan in rats bearing colorectal cancer (17, 18). Moreover, IL-15 improved the in vivo antitumor activity of adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cells (19). Recently, IL-15 has been ranked as the best agent with high potential for use in treating cancer (20). However, high doses of IL-15 are necessary to achieve biological response in vivo (21, 22). A number of studies have

demonstrated that the dominant mode of action of IL-15 *in vivo* is not through activation by soluble IL-15 of the trimeric IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  receptor (cis-activation) but rather through a transpresentation mode in which IL-15 bound to IL-15R $\alpha$  expressed by antigen presenting cells activates the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  complex expressed by neighbouring naive T or NK cells (23). Moreover, recent studies have shown that IL-15 secretion is highly dependent on its intracellular pre-association with IL-15R $\alpha$ , suggesting that the IL-15/IL-15R $\alpha$  complex is the biologically dominant active form (24). Accordingly, several studies revealed that the biological activity of IL-15 could be enhanced ~ 50-fold *in vivo* by coadministration with soluble IL-15R $\alpha$ -Fc (25-28). Binding of sIL-15R $\alpha$ -Fc to IL-15 also extended the half-life of IL-15 *in vivo*. Compared to IL-15, IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc complexes induced robust proliferation of memory CD8 $^{+}$  T cells, NK and NK T cells *in vitro* and *in vivo*, increased cytotoxicity of NK cells and dramatically reduced tumor burden in B16 melanoma mouse model (25-28). In an attempt to mimic the IL-15/IL-15R $\alpha$  complex, we have previously engineered a fusion protein (RLI) that consists of the N-terminal (amino acids 1-77, sushi $^{+}$ ) domain of IL-15R $\alpha$  coupled via a 20 amino-acids linker to IL-15. This fusion protein was shown to exert higher biological activities than IL-15 or even the non-covalent association of IL-15 with the soluble IL-15R $\alpha$  *in vitro* to drive cell proliferation through the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  receptor (29) and *in vivo* to promote mobilization and expansion of NK cells (30). In the present study, we further investigated the interest of RLI as an antitumoral agent in two mouse models: a syngenic model (lung and liver metastasis of the B16F10 mouse melanoma cells in C57BL/6 mice) and a xenogenic model (tumor growth and metastasis of HCT-116 human colon cancer cells in nude mice).

## **Materials and Methods**

### **Cells and Culture Conditions**

The Mo7e myeloid leukemia human cell line was cultured in RPMI-1640 medium (Sigma, St Louis, MO) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 2 mM

glutamine and 10 ng/ml granulocyte macrophage-colony stimulating factor (R&D Systems, Abington, UK). The Kit225 T lymphoma human cell line was cultured in RPMI-1640 medium containing 6% FCS, 2 mM glutamine and 10 ng/ml human rIL-2 (Chiron, Emeryville, CA). Murine B16F10 melanoma cells and human HCT-116 colorectal cancer cells were maintained in RPMI-1640 supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml) and 10% of FCS. All cells were maintained at 37°C under a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were harvested using trypsin/EDTA and for *in vivo* experiments, cells were resuspended in RPMI alone.

### **Cytokines and Reagents**

Recombinant human IL-15 was purchased from Peprotech, Inc. (Rocky Hill, NJ) or from CellGenix (Freiburg, Germany). ILR, RLI and sushi $^{+}$  were produced as described previously (29, 31). ILR and RLI are two fusion proteins linking IL-15 and the sushi $^{+}$  domain. For the two constructions, a flexible linker was introduced between the C terminus of IL-15 and the N terminus of the sushi domain (ILR) or vice versa (RLI). Proleukin (rIL-2, Aldesleukine, 18x10<sup>6</sup> I.U.) was purchased from Chiron BV (Amsterdam, Netherlands).

### **Proliferation assays**

The proliferative responses of Mo7e or Kit225 cells to IL-15, RLI or ILR were measured by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation as described (32), in the presence of anti-IL-15R $\beta$  A41 antibody (66 nM) for Kit225.

### **Mice**

Seven to eight week-old male C57BL/6 and athymic female nude mice (NMRI nu/nu) were purchased from Janvier (Le Genest-st-isle, France). Mice were maintained under pathogen-free conditions. Experiments were carried out in accordance with French laws and regulations.

### **Lung and liver metastasis B16F10 melanoma model**

C57BL/6 mice were inoculated with 1x10<sup>5</sup> B16F10 cells via tail vein on day 0. Treatments were done at days 1, 2 and 10 by i.p. injections of saline, 2  $\mu$ g RLI, 2  $\mu$ g ILR,

0.8 µg sushi+, 1.2 µg IL-15 or the association of sushi+ and IL-15. For dose response experiments, mice were treated with 1 to 10000 pmoles of either RLI (from 0.05 to 8 µg), IL-15 (from 0.03 to 4.8 µg) or IL-2 (from 0.2 to 80 µg). In a first set of experiments, mice were sacrificed on day 21, lungs were removed and metastatic tumors (black nodules) were counted under a binocular microscope. In another set of experiments, mice were monitored for survival on a daily basis for up to 90 days postinoculation. For induction of liver metastasis, C57BL/6 mice were injected intrasplenically with 0.6x10<sup>6</sup> B16F10 cells, and 5 min after the injection, the spleen was removed. On days 1, 3, 7 and 10, the animals were treated with RLI (2 µg, i.p) or vehicle. Thirteen days after tumor cells inoculation, the mice were sacrificed and the liver weight was recorded for evaluation of tumor metastasis.

#### Pharmacokinetic experiments

The pharmacokinetic behavior of RLI, IL-2 and IL-15 following single i.p. doses was evaluated in C57BL/6 mice. The blood was collected and immediately centrifuged and the plasma was frozen at -20°C until analysis by ELISA assays. Three samples for plasma drug concentrations were obtained at each time points, ranging from 0 to 72h. Pharmacokinetic parameters were calculated using a one compartment model with GraphPad Prism software.

#### ELISA for detection of IL-2, IL-15, RLI and TNFα

Concentration of human IL-2 and mouse TNFα in mouse sera were evaluated by eBioscience ELISA kits according to manufacturer's recommendations (ClniSciences, France). The concentration of the fusion protein RLI was measured by ELISA with the anti-IL-15 monoclonal antibody 247 (R&D Systems) as the capture antibody and the anti-FLAG-M2-peroxydase conjugate (Sigma) as the revealing antibody. For IL-15 detection, the same capture antibody as RLI was used but the revealing antibody was a specific anti-IL-15 biotinylated Ab kindly provided by Dr. H. Gascan (Inserm U564, Angers, France),

followed by incubation with streptavidinperoxidase.

#### Orthotopic implantation of HCT-116 a human colorectal cancer cell line

Nude mice were anesthetized with ketamine and xylazine. After exteriorizing the cecum by a small midline abdominal incision, 1x10<sup>6</sup> HCT-116 cells/100 µl RPMI- 1640 were injected slowly into the cecal wall (Fig. 4B, Left). The cecum was returned to the abdominal cavity and the wound was closed with surgical grapes. One day after the cecal injection, groups of mice were randomly assigned to receive saline (Control) or RLI treatments (2 µg, i.p. thrice per week) for 4 weeks. The body weight was recorded throughout the treatment. The mice were killed on day 28 and a complete necropsy procedure was performed. We assessed the presence of local tumor at the injection site and in other organs (mesenteric lymph nodes, peritoneum, liver, spleen and lungs). Scoring of tumor development was achieved using the fourstage system developed by Cespedes et al. (33), and by a new system that we defined by scoring each organ for the presence of tumor or foci, the final stage corresponding to the sum of all organ scores.

#### Statistical analysis

The data are presented as mean values ± SEM. The animal survival data were analyzed using Kaplan-Meier survival analysis. Statistical analysis used the twotailed unpaired Student's t test for comparison of two experimental groups (HCT-116 experiments) and one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison's post test for melanoma experiments. P values <0.05 were considered significant.

## Results

#### RLI is more efficient than ILR and IL-15 for activating IL-15Rβ/γ and IL-15Rα/β/γ in vitro.

We first compared the effects of the two fusion proteins RLI and ILR with that of IL-15 for activating the human IL-15Rβ/γ and IL-15Rα/β/γ receptors. On the Mo7e cell line that expresses human IL-15Rβ and IL-15Rγ but not IL-15Rα (Fig. 1A), the three proteins

at saturation induced similar maximal levels of cell proliferation. However, based on the doses necessary to induce half-maximal proliferation (EC50), RLI was found 2-fold more active than ILR and ~ 500-fold more efficient than IL-15. We also analyzed the proliferation of the human lymphoma cell line Kit 225 that expresses endogenous IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  and IL-15R $\gamma$  (Fig. 1B). This study was conducted in the presence of a saturating concentration of A41, an anti-IL-15R $\beta$  monoclonal antibody that we previously shown to inhibit IL-15 activation of the IL-15R $\beta/\gamma$  receptor without affecting that of the IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$  receptor (34). Under these conditions, RLI was found 2-fold more efficient than ILR or IL-15 in inducing cell proliferation through IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$  (Fig. 1B).

**RLI is more efficient than ILR, IL-15, IL-15 plus soluble IL-15R $\alpha$  or IL-2 to reduce the metastatic potential of B16F10 mouse melanoma**

RLI and ILR were first compared in vivo for their ability to inhibit the development of lung metastasis in a B16F10 melanoma model. We first controlled by flow cytometry that B16F10 cells did not express any of the IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  or IL-15R $\gamma$  chains, therefore ruling out any direct effect of IL-15, RLI or ILR on the tumor cells (data not shown). C57BL/6 mice were inoculated i.v. with 1x10<sup>5</sup> B16F10 melanoma cells on day 0 and treated i.p. with RLI (2  $\mu$ g) or ILR (2  $\mu$ g) at days 1, 2 and 10 (Fig 1C). At day 21, mice were sacrificed and the lung metastatic melanoma nodules visible as black spots (see Fig 2A for examples) were counted under a binocular microscope. Both proteins reduced lung metastasis but the effect of RLI was superior to that of ILR, and only the effect of RLI was found significantly different from that of control (\*\*p<0.01). Using the same experimental design (Fig 1C), we then compared the efficiency of RLI with that of IL-2, a cytokine that was approved by the US Food and Drug Administration in 1998 for treatments of adults with advanced metastatic melanoma, but that can induce, at high-doses, severe toxicities such as hemodynamic complications (35, 36). After inoculation of B16F10 melanoma cells, mice were treated with increasing doses of IL-2, IL-15 or RLI (Fig. 2A). Administration of RLI had a

marked inhibitory effect on the number of lung metastasis, with a maximal plateau effect reaching 75% of inhibition, whereas the maximum inhibitory effects induced by IL-2 and IL-15 were 45% and 35% respectively (Fig 2A, bottom). In addition, the mean size of the tumor metastasis on the lung surface was found smaller in the RLI group than in the IL-2, IL-15 and control groups (Fig 2A, top). The non covalent association of soluble IL-15R $\alpha$  with IL-15 has been shown to enhance the activity of IL-15 in vitro (29, 31) and in vivo (26, 27), and we have recently shown that RLI was more active than the non covalent association of its two linked moieties, i.e. IL-15 and IL-15R $\alpha$  sushi+ domain, to activate in vitro the IL-15R $\beta/\gamma$  and IL-15R $\alpha/\beta/\gamma$  receptors (29). We therefore compared the maximal activity of RLI to that of a non covalent association of IL-15 plus IL-15R $\alpha$ -sushi+ domain in the B16F10 melanoma model (Fig 2B). The association of IL-15 with sushi+ did not induce a better decrease of metastasis than IL-15 alone. Only RLI induced a significant reduction vs control of the number of lung metastasis. The effect of RLI was then tested on the survival of C57BL/6 mice (Fig 2C). Control mice that were treated with saline died with a median survival of 28 days. Treatments with RLI significantly increased the median survival to 35 days, and 2/16 (12.5%) of the mice survived until at least day 90, with body weights that were identical to those of control mice (data not shown). Increasing the duration of treatment with RLI (twice per week over 6 weeks) did not change the median survival that was 31 days compared to 27 days for control mice (Fig 2C, bottom). We also analyzed the development of liver metastasis after intrasplenic injection of B16F10 cells in C57BL/6 mice (Fig 2D). This injection induced liver metastasis resulting in a 3-fold increase of liver weight in mice treated with saline. The intraperitoneal administration of RLI (twice per week over 2 weeks) strongly prevented liver metastasis of B16F10 melanoma, resulting in a significant 65%-inhibition of the liver weight increase.

### **RLI has a better bioavailability in vivo than IL-15 or IL-2**

To determine whether RLI had a favorable pharmacokinetic profile compared to IL-2 and IL-15, C57BL/6 mice were injected i.p. with a single dose of RLI (4 or 48 µg), IL-2 (2.5 or 30 µg) or IL-15 (2.4 or 28.8 µg), equivalent to 0.16 nmol (low dose) and 1.92 nmol (high dose) for each drug. Serum was collected just before treatment and at various times after treatment, and the drug plasma levels were determined (Fig. 3, top). The profiles of IL-2 and IL-15 were similar as reflected by their calculated pharmacokinetic parameters, whereas that of RLI showed a markedly increased bioavailability (Fig. 3 and Table 1). The half-lives of IL-2 and IL-15 were 20 and 30 min respectively whereas RLI half-life was 3 h. For each injected dose, the maximal plasma concentration (C<sub>max</sub>) of RLI was found to be 3 to 5-fold higher than that of IL-2 and IL-15, and its area under curve (AUC) was 12 to 34-fold greater than those of IL-2 and IL-15 (Fig. 3, bottom). As a control for non side effect (36), the serum levels of TNFα were not affected by the injection of low or high doses of RLI, IL-15 or IL-2 (data not shown).

### **RLI treatment of human colon cancer cells HCT-116 growing in the cecum of nude mice**

The antitumor effect of RLI was evaluated on another cancer model: the colorectal cancer. This is the second most frequent cause of cancer-related death worldwide, and patients with metastatic colorectal cancer have a median of 8.5 months without chemotherapy (37). In our study, we used a human colorectal cancer HCT-116 cell line, which has been described as the most aggressive human colorectal cancer cell line by Cespedes et al. (33). These cells were implanted in the cecum of nude mice. They were preliminary checked for the absence of any IL-15R chains expression (data not shown). HCT-116 cells (1x10<sup>6</sup>) were injected into the cecal wall of female nude mice (Fig 4B, left). One day after, mice were treated or not with one i.p. injection of RLI (2 µg) thrice per week for 4 weeks and tumor progression was evaluated at day 28 (Fig. 4A). None of the treatment produced loss of body weight and tumor incidence was 100%.

Mice treated with saline (Control) had large primary tumors in the cecum and metastatic nodules in the peritoneum and other organs such as liver and spleen. Mice receiving RLI had smaller primary tumors and a reduced incidence of metastasis (Fig. 4B, right). In order to quantify the results, two related scoring systems were used: first, the system of Cespedes et al. that takes into account four main tumor development stages (Fig 4C, second column); second, a system that we defined by dividing each main stage (I, II, III, IV) in sub-stages (Fig 4C, first column) and attributing relative scores to each of them, with a maximal score of 4.5 (Fig 4C, third column). With the first staging system, it was found that RLI treatment induced a strong inhibition of tumor growth in the cecum and metastasis dissemination in peritoneal cavity and other organs. In control mice, most of the tumors were at stage IV (59.3%) (stage I: 3.7%, stage II: 29.6% and stage III: 7.4%), whereas in RLI treated mice, tumors were mainly at stage I (55.6%) (stage II: 11.1%, stage III: 14.8% and stage IV: 18.5%) (Fig 4D, top). Using the second scoring system, it was found that the overall effect of RLI was to reduce by 50% tumor growth and metastasis (\*\*\*p<0.001) (Fig. 4D, bottom).

## **Discussion**

IL-2 is FDA-approved for the treatment of metastatic renal cancer and malignant melanoma since 1992 (35). However its toxicity at high doses as well as its ability to promote activation-induced cell death (AICD) and expansion of T regulatory cells (Tregs) has limited its contemplated use in cancer treatment (38). In contrast, IL-15 is less toxic than IL-2, inhibits AICD and stimulates the persistence of memory CD8<sup>+</sup> T cells, appearing therefore as a better alternative than IL-2 in the treatment of cancer and as a component of vaccines directed to cancer (20, 39). Its potential use as a cancer immunotherapeutic agent has already been suggested in several mouse cancer models (10-19). Its interest as adjuvant for enhancing the effect of chemotherapeutic agents and adoptive cell therapy on transplanted tumors has been widely established but its therapeutic potential on its own was found limited, one

of the reason being, as described for IL-2, its poor pharmacokinetics in vivo (21, 22). Considering the IL-15 transpresentation model, we previously developed the fusion protein RLI, linking human sIL-15R $\alpha$ sushi+ domain to human IL-15, and showed its better biological activities than IL-15 in vitro (29, 31). The present studies were therefore conducted to evaluate whether RLI would be a better alternative than IL-1 and IL-2 for cancer treatment using two distinct animal models, and to measure its bioavailability in vivo. In the B16F10 mouse metastatic melanoma model, RLI was shown here to markedly reduce the number of lung metastasis after i.v injection of tumor cells as well as liver metastasis after intrasplenic injection. The maximal effect on lung metastasis (75% of inhibition) was significantly higher than those induced by IL-2 (45%) or IL-15 (35%). The better in vivo efficiency of RLI vs IL-15 is likely related to its better in vitro efficiency to stimulate IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  and/or IL-15R $\beta$ / $\gamma$  bearing cells as previously reported (29, 31). Our pharmacokinetic experiments also indicate that the better efficiency of RLI over IL-15 or IL-2 may also be related to a better serum distribution profile. The AUC and serum half-life of RLI were indeed approximately 30 times and 6 times higher respectively than those of IL-15 or IL-2. A previous study has shown a marked (20-fold) improvement of IL-15 serum half-life when associating with soluble IL-15R $\alpha$ -Fc, an effect that could be attributed to the Fc part fused to IL-15R $\alpha$  (26). Our results demonstrate that the IL-15R $\alpha$  sushi+ domain by itself increases the half-life of IL-15 in vivo. Soluble IL-15R $\alpha$ -IgG1-Fc has been shown in a similar B16 model to be more potent than soluble IL-15R $\alpha$  to increase the antitumor activity of IL-15, again stressing the roles of both Fc and sIL-15R $\alpha$  (27). Comparison of these data with our present data indicated that RLI (2 $\mu$ g, 3 injections) favourably compared to the IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc complex even used at much higher doses (10 $\mu$ g, 9 injections) to increase mice survival. Both IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc and RLI induce a similar 7 days-extension of the median survival compared with PBS-treated mice (27). However, while no mice survived under IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc treatment after 36 days, there was a significant number (10-

15%) of mice with long-term survival (>90 days) under RLI treatment. In addition, in our B16F10 experiments, RLI was also found to be more active than the IL-15/IL-15R $\alpha$ -sushi+ complex. These results are in agreement with our previous results showing a better activity of RLI vs the noncovalent IL-15/IL-15R $\alpha$ -sushi+ complex in vitro (29). In these studies, RLI was shown to activate with similar high-affinity both IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  and IL-15R $\beta$ / $\gamma$  complexes whereas IL-15 alone was 50-less efficient on the IL-15R $\beta$ / $\gamma$  complexes, and the non covalent association of IL-15 and IL-15R $\alpha$ -sushi+ was 3-fold less effective than RLI on IL-15R $\beta$ / $\gamma$  and 10-fold less effective than RLI or IL-15 on IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ . We have further shown an enhanced activity of RLI over the IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc complex to increase the number of human NK cells in mice reconstituted with a human immune system (HIS) (30). Our present data extend these observations by indicating a better antitumoral therapeutic efficiency of RLI over non covalent IL-15/soluble IL-15R complexes. The antitumoral effects of RLI were not due to a direct action on the tumor cells that do not express any of the IL-15R chains, and probably reflect an action via tumor-associated CD8+ T cells (28) and/or NK cells. Rowley et al. (40) have recently shown that IL-15 linked to IL-15R $\alpha$  expressed on tumor cells, induced a strong inhibition of tumor growth in an NK1.1+ cell- and CD8+ T cell-dependent manner in tumor challenged mice. Interestingly, ILR an other fusion protein that we previously described (31) and differing from RLI by inverse positions of IL-15 and IL-15Rasushi+ with regard to the central flexible linker, displayed a weaker antitumoral effect, comparable to that of IL-15. This difference may in part be due to the 2-fold lower activity of ILR vs RLI to induce proliferation of IL-15-dependent cells in vitro. However, a better in vivo stability of IL-15/IL-15R $\alpha$ sushi+ complex in the frame of RLI fusion protein than in the frame of ILR may not be excluded. The HCT-116 human colon cell line was also used to investigate the anticancer therapeutics properties of RLI. Colorectal is one of the highest incidence cancers worldwide (41). While early stage colorectal cancer is frequently curable with surgery, unresectable

metastatic disease is uniformly fatal (42). Therefore, there is a clear need for new treatment strategies to improve the prognosis of colorectal cancer patients. The orthotopic microinjection of HCT-116 cells allows a dissemination pattern closely replicating all relevant metastatic sites observed in humans. In this model, RLI induced a strong antitumoral effect by reducing the primary tumor growth in the cecum as well as decreasing metastatic progression in organs of the peritoneal cavity. Animals treated with RLI developed mainly stage I tumors (55.6%) whereas 59.3% of control mice presented stage IV tumors. Based on the study of Cespedes et al., as tumor staging closely correlated with animal survival, a survival time around 110 days, 2 to 3-fold longer than that of control animals, could be expected for RLI treated mice. Adjuvant and palliative treatments for colorectal cancer mainly involve fluorouracil-based chemotherapy and irinotecan, and more recently oxaliplatin (43, 44). However, when patients become refractory to these cytotoxic agents, there are essentially no established treatment options with demonstrated efficacy. The last few years have witnessed growing interest and significant advances in the use of targeted therapy for colorectal cancer. For example in 1998, Cao et al. (17, 18) had already demonstrated the ability of IL-15 to provide significant protection from fluorouracil- and irinotecan-induced intestinal toxicity with maintenance of antitumor activity, resulting in an increase in the therapeutic index of the cytotoxic agents. It will therefore be of interest to evaluate the advantage of RLI over IL-15 in such combination strategies. In conclusion, RLI has revealed strong anticancer therapeutic effect in two different cancer models, the B16F10 mouse lung and liver metastatic melanoma models and the HCT-116 human colon tumor mouse model. This fusion protein overcomes the limited effect of IL-15 by increasing its bioavailability and efficiency in stimulating IL-15R $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  and/or IL-15R $\beta$ / $\gamma$  bearing cells. These findings hold significant importance for the use of RLI as a potential adjuvant/therapeutic.

### Acknowledgments

*Grant support:* This research was supported in part by INSERM, CNRS, the Association de la Recherche Contre le Cancer, and Région Pays de Loire (mAbImpact and CIMATH networks; A. Bessard and V. Solé). G. Bouchaud is a recipient of fellowship from the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies and the Association de la Recherche Contre le Cancer. We thank Isabelle Barbieux and Sandrine Minault for technical assistance with FACS and animals respectively.



## *References*

1. Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., and et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, 264: 965-968, 1994.
2. Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T. A. 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, 1994.
3. Giri, J. G., Anderson, D. M., Kumaki, S., Park, L. S., Grabstein, K. H., and Cosman, D. IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *J Leukoc Biol*, 57: 763-766, 1995.
4. Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem*, 270: 29862-29869, 1995.
5. Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L. S., and Anderson, D. M. 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, 1995.
6. Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S., and Peschon, J. J. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*, 191: 771-780, 2000.
7. Lodolce, J. P., Burkett, P. R., Boone, D. L., Chien, M., and Ma, A. T cell-independent interleukin 15Ralpha signals are required for bystander proliferation. *J Exp Med*, 194: 1187-1194, 2001.
8. Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med*, 7: 114-118, 2001.
9. Waldmann, T. A. Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annu Rev Med*, 57: 65-81, 2006.
10. Ugen, K. E., Kutzler, M. A., Marrero, B., Westover, J., Coppola, D., Weiner, D. B., and Heller, R. Regression of subcutaneous B16 melanoma tumors after intratumoral delivery of an IL-15-expressing plasmid followed by in vivo electroporation. *Cancer Gene Ther*, 13: 969-974, 2006.
11. Lasek, W., Basak, G., Switaj, T., Jakubowska, A. B., Wysocki, P. J., Mackiewicz, A., Drela, N., Jalili, A., Kaminski, R., Kozar, K., and Jakobisiak, M. Complete tumour regressions induced by vaccination with IL-12 gene-transduced tumour cells in combination with IL-15 in a melanoma model in mice. *Cancer Immunol Immunother*, 53: 363-372, 2004.
12. Basak, G. W., Zapala, L., Wysocki, P. J., Mackiewicz, A., Jakobisiak, M., and Lasek, W. Interleukin 15 augments antitumor activity of cytokine gene-modified melanoma cell vaccines in a murine model. *Oncol Rep*, 19: 1173-1179, 2008.
13. Kishida, T., Asada, H., Itokawa, Y., Cui, F. D., Shin-Ya, M., Gojo, S., Yasutomi, K., Ueda, Y., Yamagishi, H., Imanishi, J., and Mazda, O. Interleukin (IL)-21 and IL-15 genetic transfer synergistically augments therapeutic antitumor immunity and promotes regression of metastatic lymphoma. *Mol Ther*, 8: 552-558, 2003.
14. Di Carlo, E., Comes, A., Basso, S., De Ambrosis, A., Meazza, R., Musiani, P., Moelling, K., Albini, A., and Ferrini, S. The combined action of IL-15 and IL-12 gene transfer can induce tumor cell rejection without T and NK cell involvement. *J Immunol*, 165: 3111-3118, 2000.
15. Evans, R., Fuller, J. A., Christianson, G., Krupke, D. M., and Troutt, A. B. IL-15 mediates anti-tumor effects after cyclophosphamide injection of tumor-bearing mice and enhances adoptive immunotherapy: the potential role of NK cell subpopulations. *Cell Immunol*, 179: 66-73, 1997.
16. Habibi, M., Kmiecik, M., Graham, L., Morales, J. K., Bear, H. D., and Manjili, M. H. Radiofrequency thermal ablation of breast tumors combined with intralesional administration of

IL-7 and IL-15 augments anti-tumor immune responses and inhibits tumor development and metastasis. *Breast Cancer Res Treat*, 2008.

17. Cao, S., Black, J. D., Troutt, A. B., and Rustum, Y. M. Interleukin 15 offers selective protection from irinotecan-induced intestinal toxicity in a preclinical animal model. *Cancer Res*, 58: 3270-3274, 1998.

18. Cao, S., Troutt, A. B., and Rustum, Y. M. 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, 1998.

19. Klebanoff, C. A., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., Lichtman, M. K., Gattinoni, L., Theoret, M. R., Grewal, N., Spiess, P. J., Antony, P. A., Palmer, D. C., Tagaya, Y., Rosenberg, S. A., Waldmann, T. A., and Restifo, N. P. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1969-1974, 2004.

20. Cheever, M. A. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev*, 222: 357-368, 2008.

21. Kobayashi, H., Carrasquillo, J. A., Paik, C. H., Waldmann, T. A., and Tagaya, Y. Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumor targeting between interleukins 2 and 15. *Cancer Res*, 60: 3577-3583, 2000.

22. Zama, L., Ponti, C., Mirandola, P., Gobbi, G., Papa, S., Galeotti, L., Cocco, L., and Vitale, M. NK cells and cancer. *J Immunol*, 178: 4011-4016, 2007.

23. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A., and Tagaya, Y. IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*, 17: 537-547, 2002.

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

25. Rubinstein, M. P., Kovar, M., Purton, J. F., Cho, J. H., Boyman, O., Surh, C. D., and Sprent, J. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 9166-9171, 2006.

26. Stoklasek, T. A., Schluns, K. S., and Lefrancois, L. Combined IL-15/IL-15R $\alpha$  immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J Immunol*, 177: 6072-6080, 2006.

27. Dubois, S., Patel, H. J., Zhang, M., Waldmann, T. A., and Muller, J. R. Preassociation of IL-15 with IL-15R  $\alpha$ -IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> T cells and its antitumor action. *J Immunol*, 180: 2099-2106, 2008.

28. Epardaud, M., Elpek, K. G., Rubinstein, M. P., Yonekura, A. R., Bellemare-Pelletier, A., Bronson, R., Hamerman, J. A., Goldrath, A. W., and Turley, S. J. Interleukin-15/interleukin-15R  $\alpha$  complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res*, 68: 2972-2983, 2008.

29. Bouchaud, G., Garrigue-Antar, L., Sole, V., Quemener, A., Boublik, Y., Mortier, E., Perdreau, H., Jacques, Y., and Plet, A. The exon-3-encoded domain of IL-15R $\alpha$  contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15R $\alpha$ . *J Mol Biol*, 382: 1-12, 2008.

30. Huntington, N. D., Legrand, N., Alves, N. L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., and Di Santo, J. P. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med*, 206: 25-34, 2009.

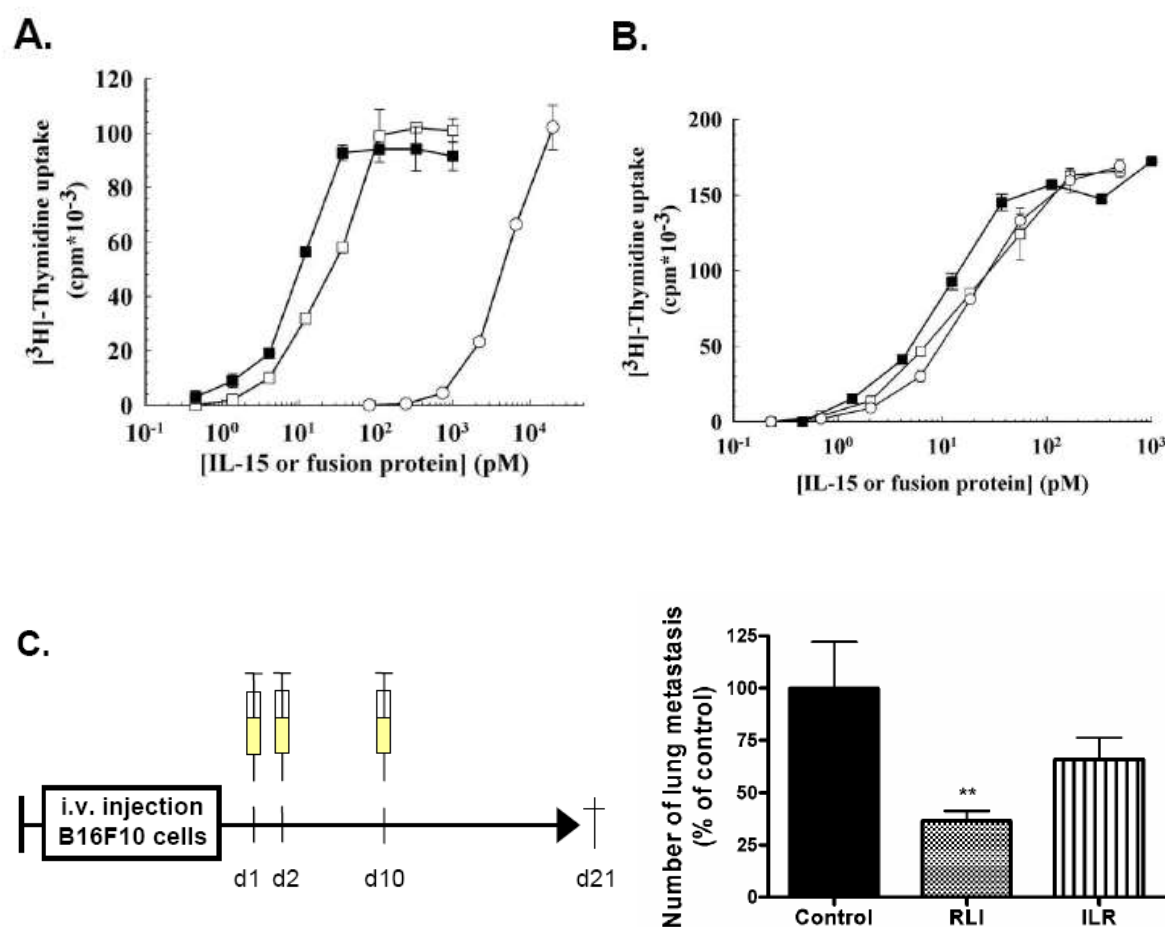
31. Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grotzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. Soluble interleukin-15 receptor  $\alpha$  (IL-15R  $\alpha$ )-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R  $\beta$ / $\gamma$ . Hyperagonist IL-15 x IL-15R  $\alpha$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

32. 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., and Jacques, Y. Identification of an interleukin-15 $\alpha$  receptor-binding site on human interleukin-15. *J Biol Chem*, 279: 24313-24322, 2004.

33. Cespedes, M. V., Espina, C., Garcia-Cabezas, M. A., Trias, M., Boluda, A., Gomez del Pulgar, M. T., Sancho, F. J., Nistal, M., Lacal, J. C., and Mangués, R. Orthotopic microinjection of human

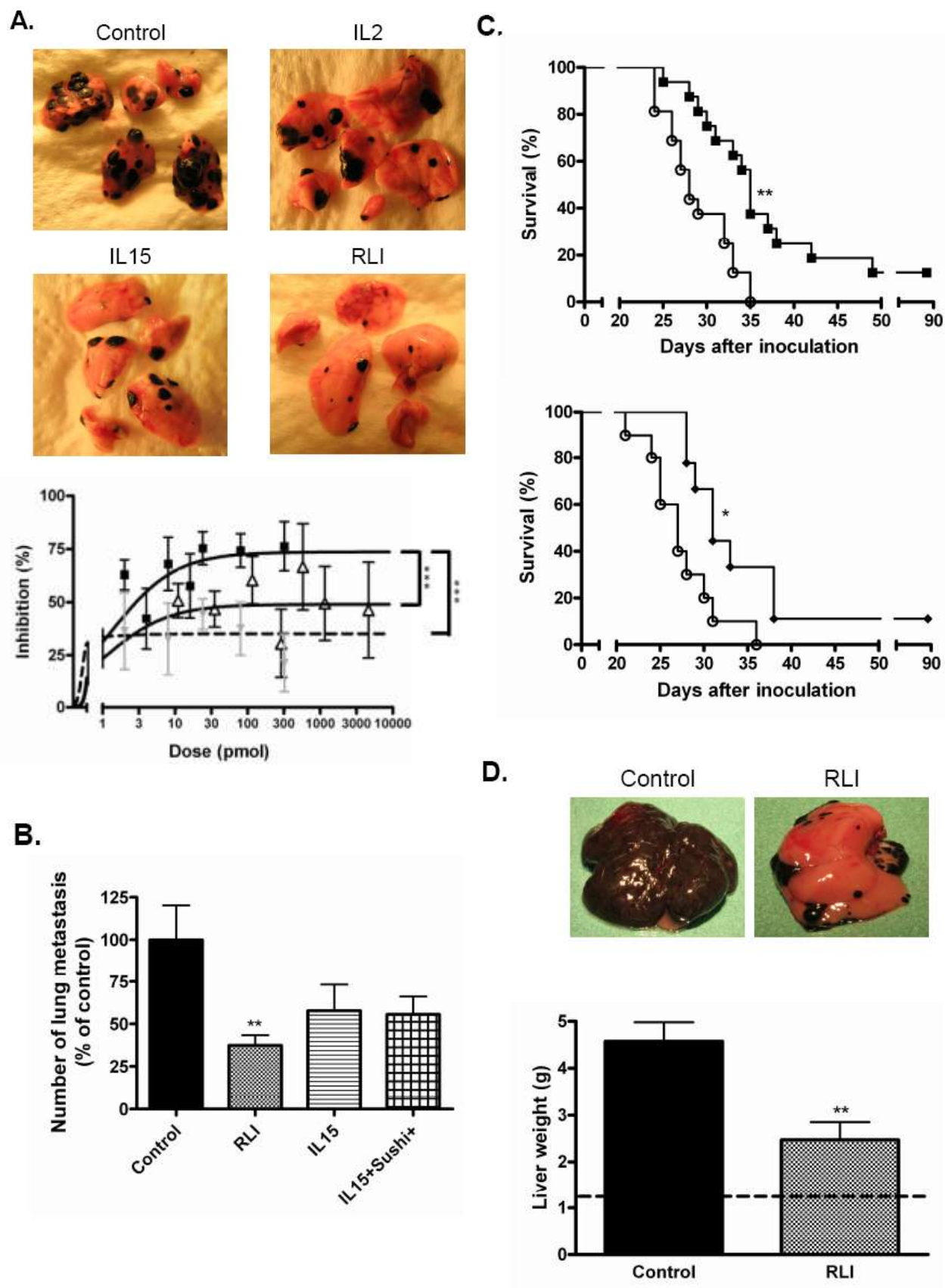
- colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol*, 170: 1077-1085, 2007.
34. Lehours, P., Raher, S., Dubois, S., Guo, J., Godard, A., and Jacques, Y. Subunit structure of the high and low affinity human interleukin-15 receptors. *Eur Cytokine Netw*, 11: 207-215, 2000.
35. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *Jama*, 271: 907-913, 1994.
36. Baluna, R. and Vitetta, E. S. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology*, 37: 117-132, 1997.
37. Simmonds, P. C. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Colorectal Cancer Collaborative Group. *Bmj*, 321: 531-535, 2000.
38. Schwartz, R. N., Stover, L., and Dutcher, J. Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology (Williston Park)*, 16: 11-20, 2002.
39. Waldmann, T. A., Dubois, S., and Tagaya, Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity*, 14: 105-110, 2001.
40. Rowley, J., Monie, A., Hung, C. F., and Wu, T. C. Inhibition of tumor growth by NK1.1+ cells and CD8+ T cells activated by IL-15 through receptor beta/common gamma signaling in trans. *J Immunol*, 181: 8237-8247, 2008.
41. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., and Thun, M. J. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58: 71-96, 2008.
42. Wolpin, B. M. and Mayer, R. J. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 134: 1296-1310, 2008.
43. Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirotta, N., Elfring, G. L., and Miller, L. L. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*, 343: 905-914, 2000.
44. Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R. F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., Findlay, B. P., Pitot, H. C., and Alberts, S. R. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 22: 23-30, 2004.

## Figures and legends



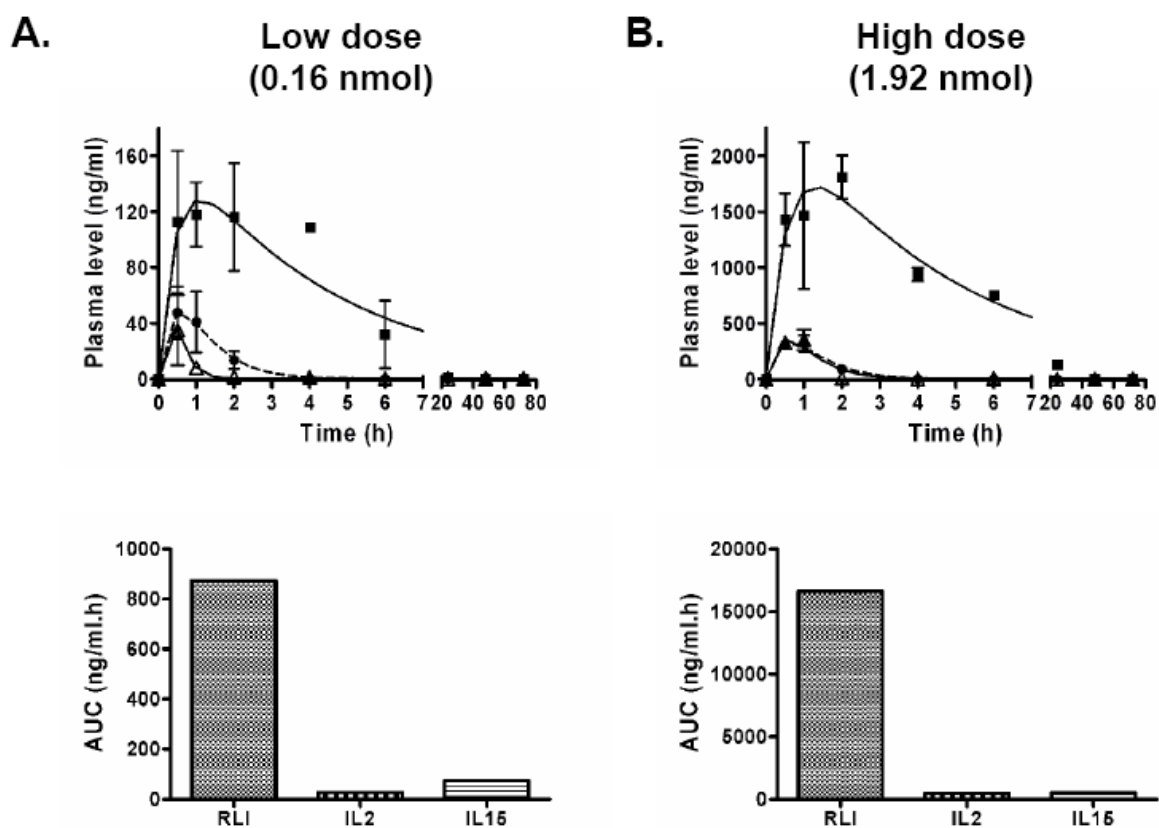
**Figure 1:**

**Comparison of RLI and ILR.** Cell proliferation was evaluated by incorporation of [3H]-thymidine. (A) Mo7e cells were cultured with increasing concentrations of human rIL-15 ( $\circ$ ), RLI ( $\blacksquare$ ) or ILR ( $\square$ ). (B) Kit225 cells were incubated with increasing concentrations of IL-15 ( $\circ$ ), RLI ( $\blacksquare$ ) or ILR ( $\square$ ) in the presence of a fixed concentration of A41 (66 nM). Data are the mean  $\pm$  SD of triplicate wells and are representative of two independent experiments. (C) Top, schematic of the regimen in mice bearing intravenously B16F10 melanoma cells (1x10<sup>5</sup>). Mice were given three doses of either saline (Control; n=22), RLI (2  $\mu$ g; n=22) or ILR (2  $\mu$ g; n=26) i.p. At day 21, B16 nodules on the lungs were counted. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. \*\*p<0.01 vs Control, Dunnett's Multiple Comparison Test.



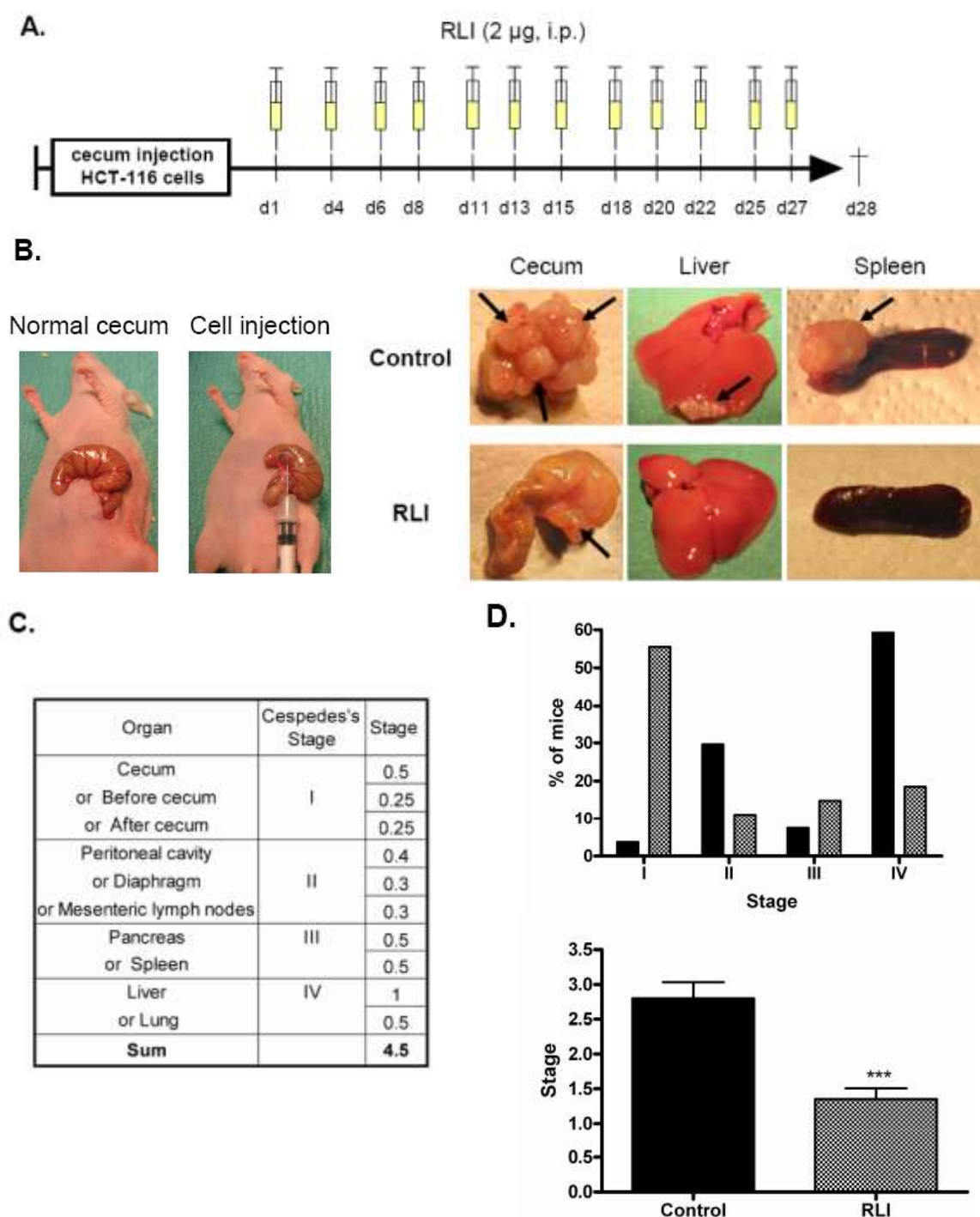
**Figure 2:**

**Effect of IL-2, IL-15 and RLI in the B16F10 mouse melanoma model.** (A) Mice were treated with RLI, IL-15, IL-2 or saline on days 1, 2 and 10. On day 21, mice were sacrificed and tumors (black nodules) were counted. Top, representative pictures of lungs. Bottom, dose-response curves of RLI (■), IL-15 (▼ ---) and IL-2 (Δ) on lung metastasis. Data shown are expressed as % of inhibition vs Control (saline). Maximal effects are statistically different (\*\*\* $p < 0.001$  in F-test). (B) RLI (2  $\mu\text{g}$ ) or IL-15 (1.2  $\mu\text{g}$ ) alone or pre-associated with sushi+ (0.8  $\mu\text{g}$ ) were administered i.p. on days 1, 2 and 10. Mean values  $\pm$  SEM of each group (n=18) are shown. \*\* $p < 0.01$  vs Control, Dunnett's Multiple Comparison Test (C) Kaplan Meier survival analysis of mice i.v. injected with B16F10 cells. Top, Mice were treated with RLI (■; 2  $\mu\text{g}$ ) or saline (○) on days 1, 2 and 10 (n=16). Bottom, Mice received 12 i.p. injections (twice per week) of either RLI (◆; 2  $\mu\text{g}$ ) or saline (○) for long-term treatment (n=10). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs Control in log rank test for prolonged survival. (D) Mice were injected intrasplenically with  $0.6 \times 10^6$  B16F10 cells and treated i.p. with RLI (2  $\mu\text{g}$ ) or saline on days 1, 3, 7 and 10. On day 13, mice were sacrificed. Representative metastasized liver of RLI-treated groups (RLI, right) and saline treated groups (Control, left) is depicted (Top). In addition, the liver weight was measured (Bottom). The weight average of normal livers is ~1.2 g and is represented with the dotted line. \*\* $p < 0.01$  vs Control, Student t Test.



**Figure 3:**

Pharmacokinetic profiles of RLI (■), IL-2 (Δ) or IL-15 (●) following a single i.p. administration of equivalent low (A; 0.16 nmol) or high (B; 1.92 nmol) dose of these compounds: RLI, 4 or 48 μg; IL-2, 2.5 or 30 μg and IL-15, 2.4 or 28.8 μg. Male C57BL/6 mice were injected i.p. and plasma concentrations were determined at the indicated points. Bottom, histograms depicting the AUC (area under curve) of RLI, IL-2 and IL-15.



**Figure 4:**

Therapy of HCT-116 human colon cancer cells implanted in the cecum of nude mice. (A) Schematic of the RLI treatment in mice injected with  $1 \times 10^6$  HCT-116 cells into the cecal wall. Nude mice received one i.p. injection of RLI (2  $\mu$ g) or saline (Control) at day 1 and thrice per week for 28 days. (B) Left, representative pictures of cecum before or during HCT-116 cell injection in the cecum of nude mice. Right, metastasis (arrows) in cecum, liver or spleen of Control and RLI treated mice. (C) Definition of tumor staging 28 days after HCT-116 cell injection: column 2, according to Cespedes et al; column 3, according to our tumor staging. (D) Development stages of HCT-116 tumors after treatment with RLI (▨) or vehicle (■) (n=27 for each group). Top, tumor staging (% of mice) according to Cespedes et al and bottom, quantification of local tumor and dissemination pattern. \*\*\* $p < 0.001$  vs Control, Dunnett's Multiple Comparison Test.



|                          | RLI  |       | IL2  |      | IL15 |      |
|--------------------------|------|-------|------|------|------|------|
| Dose ( $\mu\text{g}$ )   | 4    | 48    | 2.5  | 30   | 2.4  | 28.8 |
| Dose (nmol)              | 0.16 | 1.92  | 0.16 | 1.92 | 0.16 | 1.92 |
| C <sub>max</sub> (ng/ml) | 118  | 1810  | 35   | 350  | 47   | 319  |
| T <sub>max</sub> (h)     | 1    | 2     | 0.5  | 1    | 0.5  | 1    |
| T <sub>1/2</sub> (h)     | 3    | 3     | 0.17 | 0.42 | 0.5  | 0.5  |
| AUC (ng/ml.h)            | 872  | 16638 | 28   | 484  | 75   | 524  |

Abbreviation: C<sub>max</sub>, maximum plasma concentration; T<sub>max</sub>, time to reach maximum plasma concentration; T<sub>1/2</sub>, half life; AUC, area under the plasma concentration curve

**Table 1:**

Summary of the pharmacokinetic parameters of RLI, IL-2 and IL-15 in male C57BL/6 mice following a single i.p. administration.

## **ANNEXE II**

### ***BREVET :***

**The soluble alpha chain of IL-15 receptor as a biomarker of survival of patients suffering from type of cancers known to express IL-15r alpha.**

**EP 08 300 131.3.**

**Auteurs : C. Badoual, G. Bouchaud, E. Mortier, Y. Jacques et E. Tartour.**

## RESUME

### **Caractérisation structurale et fonctionnelle du complexe formé entre la Chaîne Alpha soluble du Récepteur de l'Interleukine-15 Humaine et l'Interleukine-15: Implication en immuno-cancérologie**

L'Interleukine-15 (IL-15) est une cytokine qui présente des activités semblables à celles de l'IL-2 *in vitro* du fait de l'utilisation commune des chaînes réceptrices IL-2R $\beta$  et  $\gamma_c$ , la spécificité d'action étant conférée par une chaîne réceptrice  $\alpha$ . L'IL-15R $\alpha$  existe sous forme soluble après clivage protéolytique de la forme membranaire. Dans cette étude, nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires régulant les activités agonistes et antagonistes des formes solubles de la chaîne IL-15R $\alpha$ . Nous avons mis en évidence que le domaine du sIL-15R $\alpha$  codée par l'exon 3 et, située à l'extrémité C-terminale du domaine sushi liant la cytokine, participe à la forte affinité du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  et est indispensable à la fonction antagoniste du récepteur soluble. Nous avons également montré le rôle primordial du complexe IL-15/sIL-15R $\alpha$  dans des pathologies cancéreuses et inflammatoires grâce au pouvoir pro-inflammatoire induit par le sIL-15R $\alpha$  dans les cancers de la tête et du cou et son implication dans la réponse thérapeutique à l'infliximab (anti-TNF) dans la maladie de Crohn. Ce travail montre que le sIL-15R $\alpha$  est une composante importante dans la régulation des activités de l'IL-15 et pourrait conduire à différentes applications thérapeutiques.

**Mots clés :** Immunologie, Cytokine, Interleukine-15, Récepteur Soluble de l'Interleukine-15, Activité Antagoniste, Protéine de Fusion, Transsignalisation.

## **ABSTRACT**

### **Functional and structural properties of the complex formed by human Interleukine 15 and its soluble private chain : Involvement in immuno-cancérology**

The Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine which outlines similar activities as those of IL-2 *in vitro* because of the common use of IL-2R $\beta$  and  $\gamma_c$  chains. The specificity of action is conferred by a private  $\alpha$  chain (IL-15R $\alpha$ ). The  $\alpha$  chain exists in soluble form after proteolytic cleavage of the membrane anchored IL-15R $\alpha$ . In this study, we characterized the molecular mechanisms regulating the agonistic and antagonistic activities of the soluble forms of IL-15R $\alpha$  (sIL-15R $\alpha$ ). We highlighted that the exon 3 encoded domain of the sIL-15R $\alpha$ , located at the C-terminal end of the IL-15 binding domain (sushi) which participates to the high affinity of the IL-15/sIL-15R $\alpha$  complex and is necessary for the antagonistic function of the soluble receptor. We also showed the vital role of this complex in cancer and inflammatory diseases through the capacity to escape to immunity of tumor with sIL-15R $\alpha$  in head and neck cancers and its involvement in the therapeutic response to infliximab in Crohn disease. This work shows that the sIL-15R $\alpha$  is an important component in the regulation of IL-15 and could lead to different therapeutic applications.

**Key Words :** Immunology, Cytokine, Interleukin-15, Interleukin-15 Soluble Receptor, Antagonist Activity, Fusion Protein, *Transsignalisation*.

**Grégory BOUCHAUD**

**Département de Recherches en Cancérologie**

**INSERM U892, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu**

**44093 Nantes Cedex**