

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**RÔLE DES COMPOSANTES DU RÉCEPTEUR DE
L'INTERLEUKINE-15 AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE
ET DE L'APOPTOSE DES NEUTROPHILES HUMAINS:
IMPORTANCE DE LA PROTÉINE SYK.**

Par
Claude Ratthé

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences Expérimentales de la Santé

JURY D'ÉVALUATION

Président du jury et examinateur interne	M. Alain Fournier, PhD INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	M. Philippe Tessier, PhD Centre de recherche du CHUL
Directeur de recherche	M. Denis Girard, PhD INRS-Institut Armand-Frappier

Avant-Propos et remerciements

« *Le travail est un trésor... Le travail des autres, cela va de soi.* » (Bruce Grocott)

Lorsque je repense aux deux dernières années écoulées, bien des événements me viennent en tête. Mais avant les faits, viennent les personnes, qui par leur aide et présence ont rendu chaque jour de ma maîtrise un peu plus mémorable. Les nombreuses pages de ce document sont bien peu comparées à la richesse de l'expérience qui m'a été donnée.

Je voudrais donc remercier en premier lieu mon directeur de recherche, le Dr. Denis Girard, qui non seulement a su, au gré de sa patience, m'encadrer, me soutenir et m'encourager, mais aussi m'écouter et me conseiller.

J'accorde une pensée toute particulière à mes collègues et amis de laboratoire Martin Pelletier, Valérie Lavastre, Éliane Moisan, Amélie Bouchard et Sonia Chiasson, qui m'ont grandement aidée et supportée, mais aussi avec qui j'ai partagé maints éclats de rire.

Je désire aussi souligner le travail de tout le personnel de l'INRS, qui a contribué de près ou de loin à ma réussite, mais aussi à former un merveilleux esprit d'équipe.

Finalement, je ne peux passer sous silence l'appui incontestable de ma famille, de mes amis, et de mon amour, Bruce, sans qui je ne serais probablement pas où j'en suis.

À vous tous, merci d'être là et de me donner le goût de continuer.

Table des matières

Avant-propos et remerciements	iii
Liste des abréviationsix
Liste des figures et des tableaux	xiii
Sommaire	xv
Introduction	xvii
SECTION 1 : Synthèse	1
Chapitre 1 : Le système immunitaire	3
1.1 Les composantes du système immunitaire	3
1.2 Immunité innée	5
1.2.1 Les cellules y jouant un rôle.....	5
1.2.2 Les mécanismes d'élimination de l'antigène	6
1.3 Immunité acquise	7
1.3.1 Les cellules y jouant un rôle.....	8
1.3.2 La présentation de l'antigène	8
1.3.3 L'activation des cellules effectrices	9
1.3.4 Les mécanismes d'élimination de l'antigène	10
Chapitre 2 : Le neutrophile et l'inflammation	12
2.1 Les fonctions du neutrophile	12
2.1.1 La phagocytose	12
2.1.2 La flambée oxydative	15
2.2 L'activation du neutrophile	16
2.3 La résolution de l'inflammation	17
2.4 Les maladies associées aux neutrophiles	19

Chapitre 3 : Les cytokines et le système immunitaire	20
3.1 Les cytokines	20
3.1.1 Les interleukines	21
3.1.2 Les interférons et les TNF	23
3.1.3 Les chimiokines	24
3.1.4 Les facteurs de croissance	26
3.2 Les récepteurs des cytokines	28
3.2.1 Les composantes des récepteurs	29
3.2.2 Les cascades de signalisation	30
3.2.2.1 Les cascades d'activation	31
3.2.2.2 Les cascades d'inhibition	32
3.3 Les cytokines et les maladies	34
Chapitre 4 : L'interleukine-15	36
4.1 La production de l'IL-15	36
4.2 Le récepteur de l'IL-15	37
4.2.1 Les chaînes du récepteur	37
4.2.2 Les cascades de signalisation activées	38
4.3 Les effets de l'IL-15	40
4.3.1 Les effets sur les cellules du système immunitaire humain	40
4.3.2 Les effets sur le neutrophile humain	42
4.4 Rôle thérapeutique de l'IL-15	42
4.4.1 Rôle dans les maladies	43
4.4.1.1 Les maladies inflammatoires	43
4.4.1.2 Le rejet de greffe	44
4.4.1.3 Le cancer	45
4.4.1.4 Les maladies infectieuses	45
4.4.2 Potentiel thérapeutique	46

SECTION 2 : Articles	49
Article 1	51
1.1 Résumé en français de l'article 1	53
1.2 Texte original de l'article 1	55
Article 2	91
2.1 Résumé en français de l'article 2.....	93
2.2 Article 2, tel que publié.....	95
Conclusion	103
Références	109

Liste des abréviations

ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou « antibody-dependent cellular toxicity »
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ATAC	« activation induced T-cell derived and chemokine related »
ATP	adénosine triphosphate
cAMP	adénosine monophosphate cyclique
BCR	récepteur des cellules B ou « B cell receptor »
BMP	protéine morphogénétique de la moelle osseuse ou « bone morphogenetic protein »
BPI	« bactericidal/permeability-inducing protein »
Card	domaine de recrutement et d'activation des caspases ou « caspase activation and recruitment domain »
CD	amas de différenciation ou « cluster of differentiation »
CD40L	ligand du CD40
Cellule B	lymphocyte dérivé de la moelle osseuse ou « bone-marrow-derived lymphocyte »
Cellule T	lymphocyte dérivé du thymus ou « thymus-derived lymphocyte »
CIS	protéine contenant un domaine SH2 inductible par les cytokines ou « cytokine-inducible SH2 containing protein »
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CNTF	facteur neuronotrope ciliaire ou « ciliary neurotropic factor »
CR	récepteur du complément ou « complement receptor »
DAG	diacylglycérol
ENA-78	protéine épithéliale-78 activatrice des neutrophiles ou « epithelial-neutrophil activating protein-78 »
EPO	érythropoïétine
Erk	kinase régulée extracellulairement ou « extracellular-regulated kinase »
FasL	ligand de Fas
Fab	fragment liant l'antigène ou « fragment antigen binding »
Fc	fragment cristallisable
FcR	récepteur reconnaissant le Fc
G-CSF	facteur stimulant des colonies de granulocytes ou « granulocyte colony-stimulating factor »
GH	hormone de croissance ou « growth hormone »
GM-CSF	facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages ou « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »
Gp	glycoprotéine
GRO	oncogène régulé par la croissance ou « growth regulated oncogene »
GTP	guanosine triphosphate

ICAM	molécule d'adhésion intercellulaire ou « intercellular adhesion molecule »
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IGF	facteur de croissance semblable à l'insuline ou « insulin-like growth factor »
IL(...)	interleukine-(...)
IL(...) _R	récepteur de l'interleukine-(...)
(IL-1) RA	antagoniste du récepteur
INRS	institut national de la recherche scientifique
IP ₃	inositol triphosphate
IP-10	protéine induite par l'IFN-gamma ou « interferon-gamma-inducible protein »
ITAM	motif d'activation tyrosine des immunorécepteurs ou « immunoreceptor tyrosine-based activation motif »
Jak	janus kinase
KDa	kilodalton
LFA-1	antigène associé aux fonctions des lymphocytes ou « lymphocyte-function-associated antigen-1 »
LIF	facteur d'inhibition des leucocytes ou « leucocyte inhibitory factor »
LPS	lipopolysaccharide
LT	leucotriène
MAP	protéine activée mitogénique ou « mitogen-activated protein »
MCP	protéine chimioattractante des monocytes ou « monocyte chemotactic protein »
M-CSF	facteur stimulant des colonies de macrophages ou « macrophage colony-stimulating factor »
MIP	protéine inflammatoire des macrophages ou « macrophage inflammatory protein »
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase
NAP	protéine antiproliférative neurale ou « Neural antiproliferative protein »
NF-κB	facteur nucléaire kappa-B ou « nuclear factor-kappa-B »
NGFR	facteur de croissance des nerf ou « nerve growth factor »
NK	cellule « natural killer »
OSM	oncostatine M
PAF	facteur d'activation des plaquettes ou « platelet activation factor »
PG(E)	prostaglandine
PIAS	« protein inhibitors of signal transducer and activator of transcription (STAT) »
Protéine G	protéine liant le GTP ou « GTP-binding protein »
RANTES	« regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted »
SDF	facteur dérivé des cellules stromales ou « stromal cell-derived factor »
SH(2,3)	domaine d'homologie à la famille Src ou « Src-homology domain »

SHP	tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2 ou « SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase »
SOCS	suppresseur de la signalisation des cytokines ou « suppressor of cytokine signalling »
STAT	transducteur de signal et activateur de la transcription ou « signal transducer and activator of transcription »
Syk	tyrosine kinase de la rate ou « spleen tyrosine kinase »
Tc	lymphocyte T cytotoxique
TCR	récepteur des cellules T ou « T cell receptor »
TGF	facteur de transformation de la croissance ou « transforming growth factor »
Th	lymphocyte T auxiliaire ou « helper »
Th1	lymphocyte T « helper » de type 1
Th2	lymphocyte T « helper » de type 2
TNF	facteur nécrosant des tumeurs ou « tumor necrosis factor »
TNFR	récepteur du TNF
TPO	thrombopoïétine
TRAIL	ligand induisant l'apoptose relié au TNF ou « TNF-related apoptosis inducing ligand »
TSLP	lymphopoïétine dérivée des cellules stromales du thymus ou « thymic stromal derived lymphopoietin »
TWEAK	faible inducteur d'apoptose ressemblant au TNF ou « TNF-like weak inducer of apoptosis »
TYK-2	tyrosine kinase-2
VIH	virus d'immunodéficience humaine

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Les composantes du système immunitaire	4
Figure 2 : Phagocytose d'un micro-organisme	13
Figure 3 : Migration du neutrophile vers les tissus	17
Figure 4 : Caractéristiques de l'apoptose des neutrophiles.....	18
Figure 5 : Les récepteurs de l'interleukine-15	38
Figure 6 : Les cascades de signalisation induites par l'IL-15	39

Tableaux

Tableau 1 : Cellules Th1 vs cellules Th2	9
Tableau 2 : Composantes des granules des neutrophiles	14
Tableau 3 : Les maladies associées aux neutrophiles	19
Tableau 4 : Les interleukines.....	21
Tableau 5 : Les interférons et les TNF	24
Tableau 6 : Les chimiokines	25
Tableau 7 : Les facteurs de croissance	27
Tableau 8 : Les familles de récepteurs de cytokines	30
Tableau 9 : Les composantes des cascades de signalisation inhibitrices	33
Tableau 10 : Effet de l'IL-15 sur les cellules du système immunitaire	40

Sommaire

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine pro-inflammatoire qui agit sur plusieurs cellules du système immunitaire. Elle entraîne entre autres, un retard de l'apoptose spontanée et une augmentation de la phagocytose des neutrophiles (NTs) humains. Les NTs expriment à leur surface les trois chaînes du récepteur de l'IL-15 (α , β , γ). À ce jour, l'importance de chacune des chaînes du récepteur dans l'action de l'IL-15 sur les NTs demeure obscure. De plus, les cascades de signalisation induites par la liaison de cette cytokine à son récepteur sont peu décrites dans la littérature. La présente étude démontre que la chaîne IL-15R α serait la plus importante dans le processus de phagocytose induit par l'IL-15. De plus, elle révèle que la tyrosine kinase Syk joue un rôle dans la cascade de signalisation reliée à l'activité de l'IL-15 sur la phagocytose ainsi que sur l'apoptose des NTs. De plus, il a été remarqué que l'ajout d'anticorps de type IgG₁ à une culture de NTs pouvait induire un retard d'apoptose chez ceux-ci et induire la phosphorylation de résidus tyrosine de la protéine Syk chez les NTs stimulés. Cet effet n'a cependant pas été observé avec les anticorps de type IgG₂ et pourrait être expliqué par l'activation des récepteurs Fc. Parallèlement, cette étude vise la mise à jour de certains éléments de la cascade de signalisation de l'IL-15 lors du retard d'apoptose des NTs : Jak2, p38MAP Kinase et ERK 1/2. Une expérimentation plus approfondie a aussi révélé que la protéine anti-apoptotique Mcl-1 serait un joueur clé de l'action de l'IL-15 sur les NTs.


Étudiante


Directeur de recherche

Introduction

Les neutrophiles sont une composante importante du système immunitaire puisqu'ils sont non seulement les plus nombreux dans la circulation sanguine après les plaquettes et les globules rouges, mais aussi les premiers à arriver au site inflammatoire. Lorsqu'ils sont activés en présence par exemple de micro-organisme, ils effectuent la phagocytose et produisent des radicaux libres afin de les éliminer. Les neutrophiles ont une durée de vie très courte et sont destinés à l'apoptose dans les 12-24 heures. Cependant, lors de l'inflammation, plusieurs facteurs peuvent prolonger la vie des neutrophiles en retardant leur apoptose afin de leur permettre d'effectuer leurs fonctions. L'interleukine-15 est une cytokine pro-inflammatoire qui agit sur plusieurs cellules immunitaires afin d'amplifier leur réponse. Elle potentialise les fonctions des neutrophiles en retardant leur apoptose et en augmentant leur capacité phagocytaire. De plus, elle augmente leur production d'IL-8, qui est un chimioattractant, permet la phosphorylation de certains résidus tyrosines et induit la synthèse protéique *de novo*. Suite à l'action de cette cytokine, les neutrophiles sont activés et peuvent phagocyter des micro-organismes et attirer d'autres cellules au site inflammatoire. D'un autre côté, la production d'interleukine-15 est un phénomène hautement contrôlé et un minime déséquilibre dans la quantité IL-15 produite peut favoriser le développement de certaines maladies, où celle-ci se retrouve en importantes quantités.

Les neutrophiles possèdent le récepteur dit « classique » de l'interleukine-15. Même si l'action de cette cytokine sur les neutrophiles est assez bien définie, peu de données sont disponibles quant aux mécanismes d'action par lesquels elle agit. Le but de cette étude est donc de définir tout d'abord l'importance de chaque chaîne du récepteur de l'IL-15 dans son action sur les neutrophiles. Les données obtenues nous permettront de déterminer à quel point une ou plusieurs des composantes du récepteur est/sont essentielle(s) pour l'action de l'IL-15 sur l'apoptose et la phagocytose des neutrophiles humains. Ces expériences nous

permettront aussi d'étudier l'effet du blocage de chacune de ces chaînes par des anticorps spécifiques. Ensuite, nous nous pencherons sur la signalisation intracellulaire reliée à l'interleukine-15, tant dans son action sur l'apoptose que sur la phagocytose, dans le but d'identifier certaines des molécules responsables de son action.

Ce document présente une revue de littérature qui traitera tout d'abord du système immunitaire, afin d'en expliquer les bases. Les composantes cellulaires ainsi que leur mécanismes d'action y seront exposés. Les neutrophiles seront ensuite décrits en plus amples détails et leur rôle dans le développement et la résolution de la réponse immunitaire sera mis au premier plan. Suivra une section sur les cytokines, leurs récepteurs et leur rôle dans le développement de la réponse immunitaire dans laquelle les cascades de signalisation intracellulaires seront expliquées. Finalement l'interleukine-15, son récepteur et son action sur les cellules immunitaires seront présentés afin de bien comprendre le rôle majeur de cette cytokine dans le processus d'inflammation.

SECTION I : SYNTHÈSE

Chapitre 1: Le système immunitaire

1.1 Les composantes du système immunitaire

Le système immunitaire de l'être humain se compose de plusieurs cellules effectrices différentes et spécialisées. Toutefois, ces composantes variées proviennent à l'origine d'une seule et même cellule hématopoïétique mère, dite cellule souche, qui possède la capacité de se diviser et de se différencier (figure 1). Cette cellule de la moelle osseuse est très conceptuelle, puisqu'en étant théoriquement la source de toutes les cellules du système immunitaire, elle n'a jamais pu être isolée en laboratoire. Les cellules souches sont donc généralement définies comme étant des cellules capables de division et pouvant se différencier vers les différentes lignées de précurseurs. Au premier stade de différenciation, la cellule souche se dirige soit vers la lignée myéloïde, soit vers la lignée lymphoïde. (Janeway et al., 1999 : 3-5 ; Parkin et Cohen, 2001 : 1777)

La lignée lymphoïde produit les lymphocytes, soit les cellules B, les cellules T, et les cellules NK (*natural killer*). Les lymphocytes, caractérisés par leur noyau rond occupant la majorité du cytoplasme, produiront les cellules plasmiques et les cellules T activées lorsqu'elles seront en contact avec un antigène approprié. Les cellules plasmiques produisent les anticorps alors que les cellules T activées adopteront un profil Th dit T «helper» ou Tc dit T «cytotoxique» dépendant de leurs fonctions. Les cellules Tc sont capables d'effectuer une lyse directe des cellules infectées par un micro-organisme. Les cellules Th, quant à elles, se différencient encore en Th1 ou en Th2 qui, respectivement, aident à l'activation des macrophages ou des cellules B. Les cellules NK sont aussi capables d'induire la lyse de cellules infectées. (Janeway et al., 1999 : 3-5 ; Parkin et Cohen, 2001 : 1777)

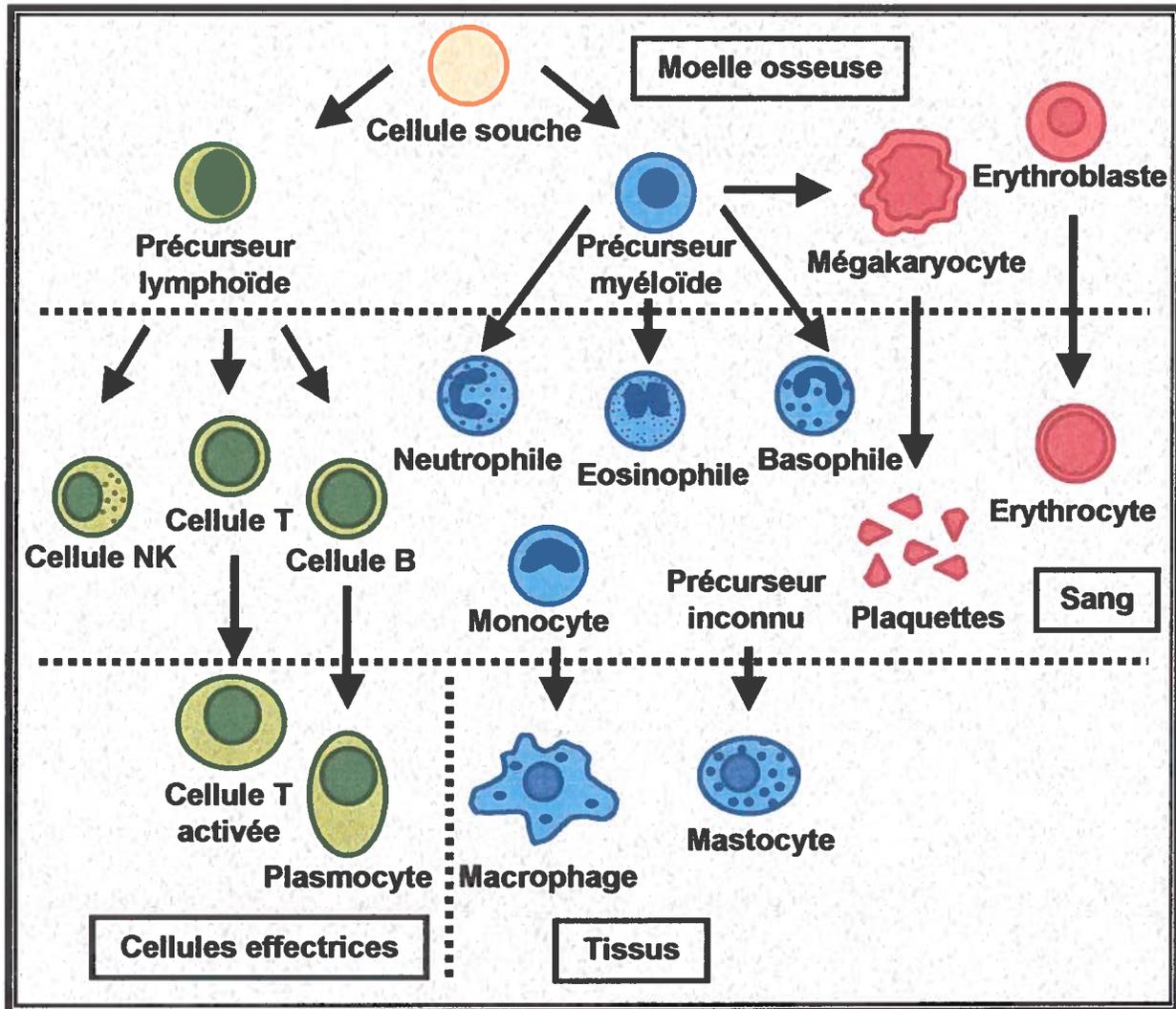


Figure 1. Les composants du système immunitaire (inspiré de Janeway et al., 1999 : 4 et de Edwards, 1994 : 35).

La lignée myéloïde se subdivise en deux catégories pour former, d'un côté, les granulocytes, les mastocytes et les monocytes, et de l'autre, les plaquettes et les érythrocytes. Les granulocytes sont aussi appelés polynucléaires puisque leur noyau est composé de plusieurs lobes interconnectés. Ces cellules tiennent leur nom de leur cytoplasme qui est rempli de vésicules denses visibles au microscope. Les basophiles, les éosinophiles et

les neutrophiles font partie de cette catégorie. Les éosinophiles jouent un rôle principalement dans l'élimination des parasites et les basophiles ont une fonction encore obscure. Les neutrophiles sont des cellules capables de phagocytose et leurs fonctions seront discutées plus en détail dans la section correspondante. Les mastocytes possèdent des granules, mais leur noyau est rond. Ils ne font donc pas partie des polynucléaires, mais leurs granules sont responsables des phénomènes d'allergies via le relâchement de certains produits comme l'histamine. Les monocytes représentent le précurseur sanguin des macrophages. Ceux-ci se retrouvent dans les tissus et effectuent principalement la phagocytose. (Janeway et al., 1999 : 3-5 ; Parkin et Cohen, 2001 : 1777)

1.2 Immunité innée

L'immunité innée comprend les mécanismes d'élimination de l'antigène qui n'engendrent ni ne dépendent de la mémoire immunologique. Ce type d'immunité est rapide, puisqu'il agit en quelques heures, et dépend généralement de la reconnaissance de facteurs généraux, communs à de nombreux pathogènes. Il implique principalement la phagocytose, la lyse par le complément et l'élimination par les cellules NK. Ce type de reconnaissance non-spécifique est essentiel, puisqu'il permet à l'organisme de se débarrasser de plusieurs micro-organismes. Cependant certains types de pathogènes parviennent à contourner cette première ligne de défense et c'est pourquoi nous avons aussi besoin d'une immunité acquise plus spécifique qui engendre une mémoire immunologique. (Janeway et Medzhitov, 2002 : 197)

1.2.1 Les cellules y jouant un rôle

Les cellules qui agissent dans l'immunité innée se retrouvent généralement aux limites des barrières naturelles du corps humain, près des

portes d'entrée des micro-organismes. Elles se retrouvent donc, par exemple, dans les poumons, dans le système digestif, près de la peau, dans la circulation, etc. Ce sont principalement des cellules capables de phagocytose, comme les neutrophiles et les macrophages ou capables d'induire une lyse cellulaire, comme les cellules NK. (Janeway et al., 1999 : 375-390)

1.2.2 Les mécanismes d'élimination de l'antigène

Le premier joueur de l'immunité innée se nomme la voie alterne du complément. Il n'implique la participation d'aucune cellule immunitaire et d'aucun anticorps. Le système du complément se retrouve dans le plasma et est composé de plusieurs protéines et enzymes qui se lient les uns aux autres à la surface d'une cellule afin d'entraîner sa lyse. Ces protéines lient de façon constitutive toutes les cellules, mais celles du corps humain possèdent des enzymes capables d'induire la dissociation du complément et donc d'empêcher la lyse cellulaire. Ce mécanisme protège donc l'organisme contre tout type cellulaire étranger ne possédant pas de moyen de défense contre le complément. Le système du complément peut être activé de deux façons ; la voie classique et la voie alterne, la première étant dépendante de la présence des anticorps. (Janeway et al., 1999 : 370-373 ; Sherhan et Ward, 1999 : 2-3)

La phagocytose constitue le deuxième moyen de défense inné de l'organisme. Celle-ci peut s'effectuer d'elle-même ou avec l'aide d'anticorps ou du complément. Les neutrophiles et les macrophages possèdent à leur surface des récepteurs qui peuvent reconnaître plusieurs structures de la surface des bactéries comme les lipopolysaccharides, différents sucres ou la membrane cellulaire. De plus, ces cellules possèdent des récepteurs qui reconnaissent les micro-organismes opsonisés par des composantes du complément et des anticorps. Donc, si une bactérie est liée au complément ou à un anticorps, les neutrophiles et les macrophages pourront la reconnaître. Lorsqu'un des

récepteurs à la surface des phagocytes rencontre son ligand, une cascade de signalisation intracellulaire lui indique d'éliminer le corps étranger. À l'intérieur de la cellule, la membrane englobant le micro-organisme fusionnera avec un granule contenant plusieurs enzymes protéolytiques, des radicaux libres et des peptides. Ceci engendrera la destruction du corps étranger. (Janeway et al., 1999 : 348-352 ; Underhill et Ozinsky, 2002 : 825)

Les cellules NK représentent le dernier élément de l'immunité innée. Ces cellules sont capables de reconnaître les cellules du soi de celles du non-soi ou du soi modifié. Cette reconnaissance s'effectue par la par le biais du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules. Le CMH est requis lors de la présentation des antigènes et sa structure spécifique est commune à un organisme entier. Ainsi, une cellule infectée ou une cellule tumorale pourrait ne pas exprimer de CMH ou et la cellule NK induira leur lyse. La lyse des cellules NK s'effectue à l'aide d'enzymes protéolytiques relâchés dans l'espace intercellulaire qui détruiront la membrane de la cellule cible. (Janeway et al., 1999 : 386-388 ; Vilches et Parham, 2002 : 217)

1.3 Immunité acquise

L'immunité acquise repose sur le principe de la mémoire immunologique. Celle-ci permet une réponse plus rapide du système immunitaire lors d'une deuxième rencontre avec un antigène donné. Ce type d'immunité se base sur la reconnaissance spécifique d'épitopes à la surface des micro-organismes et le délai d'action s'échelonne sur 4 à 7 jours. Parmi les principes d'action de ce type d'immunité, on retrouve la production d'anticorps et la lyse par les cellules Tc. Un autre type de lyse, par les cellules NK ou les neutrophiles, fait aussi partie de cette catégorie. (Janeway et al., 1999 : 391-405 ; Parkin et Cohen, 2001 : 1777)

1.3.1 Les cellules y jouant un rôle

Les principales cellules de l'immunité acquise sont les cellules T, les cellules B et les cellules NK. Les cellules B et les cellules T résident généralement dans les organes lymphoïdes, soit la rate et les ganglions. C'est à cet endroit qu'ils rencontreront un antigène et se différencieront en cellules effectrices. Les cellules NK circulent plutôt dans les tissus et la circulation afin de rencontrer les micro-organismes pour induire leur lyse. (Janeway et al., 1999 : 263 ; Parkin et Cohen, 2001 : 1777)

1.3.2 La présentation de l'antigène

Le développement de l'immunité acquise débute par la reconnaissance de l'antigène par le biais de cellules spécialisées dans la présentation des antigènes : les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. Il existe deux types de présentation de l'antigène. Les cellules dendritiques et les macrophages, tel que mentionné antérieurement, effectuent la phagocytose des micro-organismes qu'elles reconnaissent. Ceux-ci sont ensuite fragmentés en petites particules qui seront présentées à leur surface par le CMH. Les cellules dendritiques sont aussi capables de macropinocytose pour ainsi engouffrer de grandes quantités d'antigènes extracellulaires. Les cellules B, quant à elles, utilisent leurs immunoglobulines de surface afin de reconnaître des antigènes spécifiques qui sont principalement des molécules solubles, des toxines et des virus. Ceux-ci sont ensuite internalisés et exprimés à la surface de la cellule par le CMH. Les cellules présentatrices d'antigènes sont aussi celles qui permettent la co-stimulation des lymphocytes par le biais des molécules de surface B7. Ce second signal est nécessaire à l'activation des cellules B et T. (Janeway et al., 1999 : 265-274 ; Parkin et Cohen, 2001 : 1777)

1.3.3 L'activation des cellules effectrices

Lorsqu'elles ont rencontré et exprimé un antigène à leur surface, les cellules présentatrices d'antigène migrent vers les ganglions et la rate afin d'y stimuler les cellules effectrices. Les cellules B et les cellules T circulent en tout temps dans les organes lymphoïdes par le système lymphatique. Chaque cellule B ou T possède à sa surface un récepteur spécifique appelé respectivement le BCR (B cell receptor) ou TCR (T cell receptor). Le TCR reconnaît un antigène couplé à un CMH. Lorsque le récepteur est engagé, la cellule T est activée si un second signal (liaison du B7 au CD28) est perçu simultanément. Les cellules activées entrent alors en division et constitueront un groupe de clones capables, pour les CD8⁺, d'éliminer effectivement les micro-organismes arborant l'antigène détecté au départ ou, pour les CD4⁺, d'aider à l'activation d'autres cellules effectrices. Les CD4⁺ ont la capacité de devenir des Th1 ou des Th2 lors de l'activation de la cellule, selon les cytokines retrouvées dans le milieu environnant (tableau 1). (Janeway et al., 1999 : 265-274)

CARACTÉRISTIQUES	Th1	Th2
Induit par	IL-12	IL-4
Inhibé par	IL-10	IFN- γ
Cytokines produites	IL-3, GM-CSF, TNF- α , Chimiokines.	
	IL-2, IFN- γ , TNF- β	IL-4, 5, 6, 10, TGF- β .
Type de réponse immunitaire	Cellulaire	Humorale

Tableau 1. Cellules Th1 vs cellules Th2 (selon Janeway et al., 1999 : 287).

Les cellules B qui expriment un antigène à leur surface sont activées lorsqu'une cellule Th2 reconnaît l'antigène couplé au CMH par son TCR. Dans ce cas-ci, le second signal nécessaire à l'activation se compose de la liaison du CD40 sur la cellule T au CD40L sur la cellule B. Certains antigènes dits thymo-indépendants servent à la fois de premier et de second signal. Les cellules B

activées sont appelées plasmocytes et sécrètent des anticorps spécifiques à l'antigène reconnu. (Janeway et al., 1999 : 307-313)

Les cellules NK et les neutrophiles possèdent à leur surface des récepteurs qui reconnaissent la partie Fc des immunoglobulines. Lorsqu'une cellule est opsonisée par des anticorps (voir plus bas), on peut observer le phénomène de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity). La cellule NK peut se lier à la cellule opsonisée et induire sa lyse par les mécanismes décrits précédemment (Vilches et Parham, 2002 : 217). La lyse des cellules opsonisées par les neutrophiles s'effectue par le relâchement de dérivés oxygénés et du contenu des granules dans l'espace intercellulaire. (Kobayashi et al., 2001 : 27)

1.3.4 Les mécanismes d'élimination de l'antigène

Les voies de l'immunité spécifique d'élimination des micro-organismes se divisent en deux catégories : celle dépendante des anticorps et celle qui ne l'est pas. Les anticorps spécifiques sécrétés par les plasmocytes reconnaissent l'antigène par lequel la cellule B a été activée. Que ce soit une partie d'une bactérie, une toxine ou un virus, les anticorps s'y lient par un processus que l'on nomme opsonisation. Celui-ci peut conduire à la neutralisation en bloquant plusieurs sites à la surface du micro-organisme ou de la toxine et en l'empêchant d'avoir des effets sur les cellules de l'hôte. Les anticorps activent aussi, par la suite, diverses réponses. Tout d'abord, les anticorps sont reconnus par les phagocytes et les cellules NK qui possèdent des récepteurs Fc à leur surface. Ceux-ci sont donc aptes à éliminer l'antigène qui leur est lié. Ensuite, les anticorps font aussi partie de la cascade d'activation classique du complément qui permet la lyse de la cellule étrangère.

Les cellules T CD8⁺ font partie de l'élimination des micro-organismes indépendante des antigènes. Ces cellules sont appelées T cytotoxiques et, une fois activées par une cellule présentatrice d'antigènes, vont effectuer la lyse des cellules arborant les mêmes épitopes. La lyse s'effectuera par le relâchement d'enzymes dans le milieu intercellulaire. (Janeway et al., 1999 : 395-396 ; Parkin et Cohen, 2001 : 1777)

Chapitre 2: Le neutrophile et l'inflammation

2.1 Les fonctions du neutrophile

Les neutrophiles sont produits en grande quantité chaque jour puisqu'environ 10^{11} cellules quittent la moelle osseuse pour former une population équivalente à $3-5 \times 10^6$ cellules/ml de sang. L'homéostasie de cette population cellulaire repose sur le principe de mort cellulaire programmée appelé l'apoptose. Les neutrophiles ont une demi-vie très courte de 8 à 12 heures dans le sang, ce qui permet un renouvellement constant des cellules circulantes. Si un neutrophile reçoit un stimulus adéquat, par exemple une cytokine, il retarde alors le moment de son apoptose afin de pouvoir exercer ses fonctions. (Al-Shami et Naccache, 1999 : 5333 ; Cassatella et McDonald, 2002 : 174 ; Edwards, 1994 : 4-6 Pelletier, Ratthé et Girard, 2002 : 164 ; Tyther et al., 2001: 41)

2.1.1 La phagocytose

Les neutrophiles ont la capacité d'effectuer la phagocytose et, de ce fait, d'éliminer bon nombre de pathogènes (Edwards, 1994 : 6). La phagocytose des micro-organismes s'effectue par le biais de deux types de récepteurs, soit les récepteurs Fc, qui reconnaissent la portion Fc des immunoglobulines et les récepteurs du complément (Ravetch et Clynes, 1998 : 421 ; Ravetch et Bolland, 2001 :275). Deux types de récepteurs Fc sont présents de façon constitutive à la surface des neutrophiles, soit le FcγRIIIb (CD16) et le FcγRIIIa (CD32). Le FcγRI (CD64) peut aussi apparaître à la surface de ces cellules, mais son expression doit être induite, par exemple par l'IFN-γ (Chuang, Sassaroli et Unkeless, 2000 : 350 ; Cooney et al., 2001 : 844 ; Durand et al., 2001 :3996). En tant que membre de la famille des récepteurs du complément (CR), on retrouve, à la surface des

neutrophiles, le CR1 et le CR3 (Edwards, 1994 : 106-112). Lorsqu'un de ces deux types de récepteurs est engagé, une cascade de signalisation intracellulaire est engendrée et plusieurs gènes sont activés ou réprimés pour enclencher le processus de la phagocytose (Kobayashi et al., 2002 : 6901 ; Kabutomori et Iwatani, 2001 : 443).

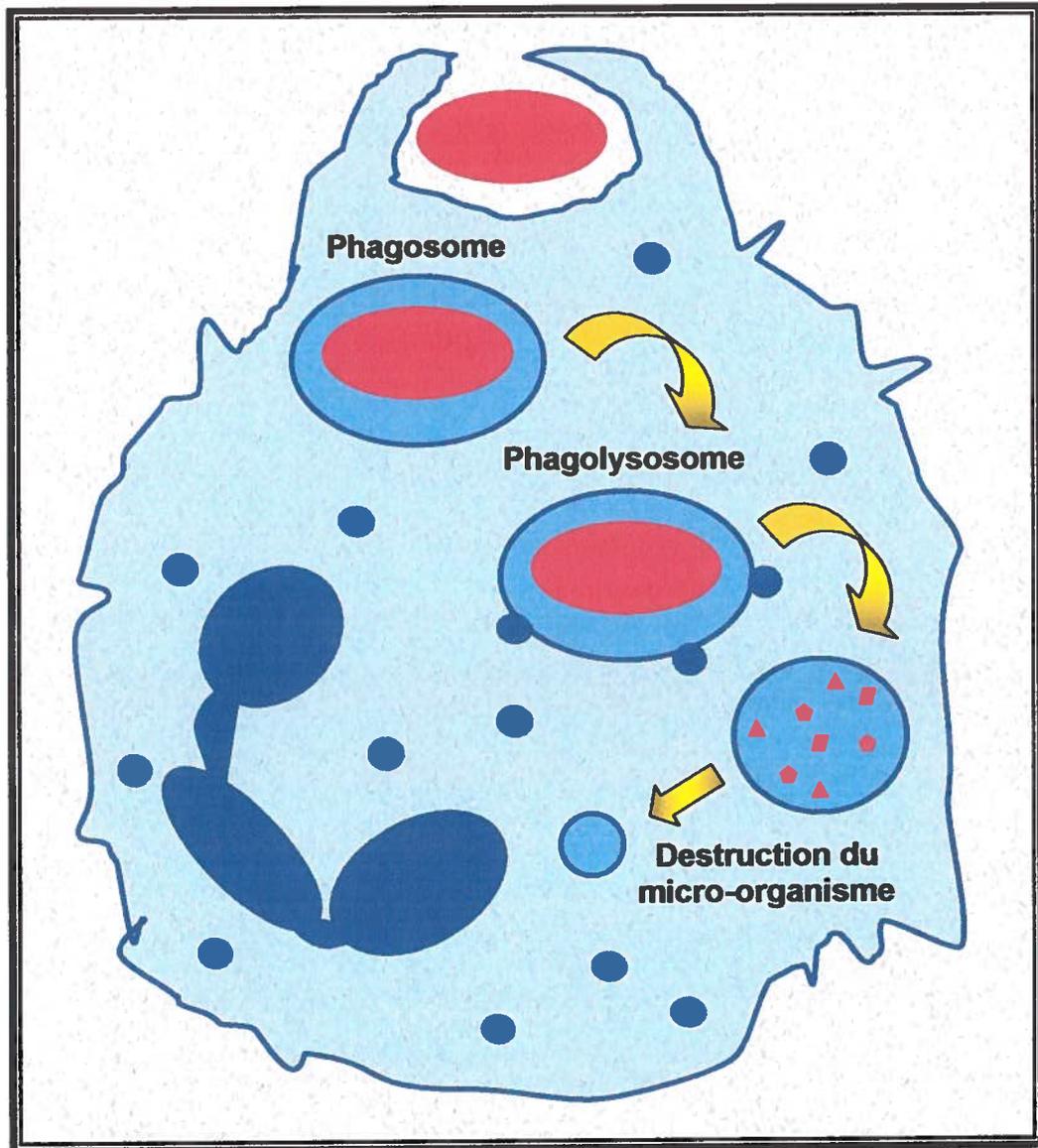


Figure 2. Phagocytose d'un micro-organisme : la fusion du phagosome et du lysosome permettra la dégradation du micro-organisme par des enzymes protéolytiques. (inspiré de Edwards, 1994 : 7 et de Janeway et al., 1999 : 334).

Il y a, entre autres, réarrangement du cytosquelette, production de certaines cytokines, altérations du transport membranaire, induction des mécanismes de destruction des microbes et induction de l'apoptose (Edwards, 1994 : 4-6). Durant ce processus, la membrane cellulaire du neutrophile s'invagine et entoure l'agent externe afin de former une vésicule intracellulaire appelée phagosome. (figure 2)

SUBSTANCE		PROPRIÉTÉS
Antimicrobiens	Myéloperoxidase	Destruction de la majorité des micro-organismes. Inactive les toxines. Augmente l'activité anti-microbienne du H ₂ O ₂ .
	Défensines	Détruit les bactéries Gram-positives et négatives et certains champignons en perméabilisant leur membrane.
	BPI	Détruit la membrane externe de bactéries Gram-négatives. Lie le LPS et hydrolyse les phospholipides.
	Cathepsine G	Protéase, détruit les bactéries Gram-positives et négatives et certains champignons. Inhibe la respiration cellulaire et les systèmes de transport dépendants d'énergie. Inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN.
	Élastase	Protéase, augmente l'activité d'autres protéines anti-microbiennes du neutrophile. Détruit la paroi bactérienne.
	Protéinase 3	Dégrade certaines protéines de la matrice extracellulaire.
	Azurocidine	Protéase, détruit certaines bactéries.
	Lysosyme	Détruit les bactéries Gram-positives. Coupe les liens entre les composants du peptidoglycane.
Hydrolases	β-glucuronidase	Les hydrolases digèrent les composants des micro-organismes détruits dans les phagolysosomes. Chaque hydrolase se réfère à la substance dont elle porte le nom. Par exemple, la β-glucuronidase hydrolyse la glucuronide.
	α-mannosidase	
	α-fucosidase	
	β-glucosamidase	
	Phospholipase A ₂	
	Phospholipase C	
	Phospholipase D	

Tableau 2. Composantes des granules des neutrophiles (selon Edwards, 1994 : 54-73.

Dans le cytoplasme, on retrouve d'autres vésicules, appelées granules, qui contiennent des enzymes hydrolytiques, des peptides et des protéines aux

propriétés cytotoxiques qui vont détruire le micro-organisme lorsqu'il y aura fusion avec le phagosome pour former le phagolysosome ou lors de la libération dans le milieu intercellulaire (tableau 2). (Edwards, 1994 : 149-167)

2.1.2 La flambée oxydative

La NADPH-oxydase catalyse la réaction $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{H}^+ + \text{NADP}^+$ et permet la formation des radicaux libres. Ce complexe est constitué de six sous-unités. Trois se retrouvent dans le cytosol et sont liés aux filaments d'actine: p40-phox, p47-phox et p67-phox. Trois autres sous-unités (gp-91-phox, p22-phox et Rapla) se retrouvent sur la membrane cellulaire du neutrophile, mais peuvent aussi être présentes sur la membrane des granules intracellulaires. Lors de l'activation du neutrophile, deux des composantes cytosoliques (p47-phox et p67-phox) migrent, par le réseau du cytosquelette vers les composantes membranaires afin de former un complexe fonctionnel. Suite à la phagocytose, les composantes membranaires de la NADPH-oxydase peuvent aussi faire partie du phagosome ou encore du phagolysosome. Dans ces deux cas, la formation de radicaux libres entraînera la destruction du micro-organisme. Toutefois, la réaction de la NADPH-oxydase peut aussi avoir lieu à l'extérieur de la cellule, par exemple lorsqu'il y a dégranulation et que les granules fusionnent avec la membrane plasmique afin de libérer leur contenu dans l'espace intercellulaire. Lors de ce phénomène, le superoxyde permet la destruction des micro-organismes environnants. Cette activité peut s'avérer nocive pour les cellules de l'hôte, puisqu'il n'y a aucune discrimination entre celles-ci et les bactéries, par exemple. Il s'agit toutefois d'un mécanisme de défense efficace, puisque la perte de quelques cellules saines de façon locale empêche la prolifération de bactéries qui pourraient nuire à l'organisme entier. (Edwards, 1994 : 149-167)

2.2 L'activation du neutrophile

Les neutrophiles qui circulent dans le sang adoptent un profil non-activé, c'est-à-dire une forme ronde uniforme. Le neutrophile activé devient plus allongé et possède des pseudopodes. Ses granules fusionnent avec la membrane plasmique et le nombre des récepteurs augmente à la surface. La première étape de l'activation du neutrophile est la réponse aux chimioattractants. Plusieurs de ces molécules peuvent attirer les neutrophiles circulant dans le sang au site de l'inflammation. Entre autres, notons le leukotriène B₄, le peptide C5a dérivé du complément, l'IL-8 et le facteur d'activation des plaquettes (PAF). Suite à la liaison de ces chimioattractants aux récepteurs à la surface des neutrophiles, une cascade de signalisation par les protéines G est induite à l'intérieur de la cellule. Des messagers secondaires (cAMP, DAG, IP₃) sont alors formés, entraînant une augmentation du calcium intracellulaire. Il y a ensuite réorganisation du cytosquelette par la polymérisation des filaments d'actine et le neutrophile change de configuration. Les messagers secondaires jouent aussi un rôle dans le déclenchement de la flambée oxydative. Plusieurs kinases sont phosphorylées lors de l'activation du neutrophile. Par exemple, des membres de la famille des Src kinases et les MAP kinases. Ceux-ci vont à leur tour phosphoryler leurs substrats afin d'enclencher tous les mécanismes découlant de l'activation du neutrophile. (Edwards, 1994 : 188-231)

Les molécules de surface du neutrophile varient aussi en nombre et en type suite à l'activation par les chimioattractants. L'expression de certaines sélectines intégrines est alors augmentée afin de permettre au neutrophile de s'associer aux cellules endothéliales de la paroi vasculaire. Cette liaison sera d'abord de faible affinité et le neutrophile roulera le long du vaisseau sanguin par attachements et détachements successifs aux cellules endothéliales. Ces liaisons feront place à une association de haute affinité qui permettra au neutrophile d'adhérer fermement à la paroi vasculaire pour ensuite la traverser par un processus appelé la diapédèse. Le neutrophile migrera donc dans le tissu

selon le gradient de chimioattractants où il pourra exercer ses fonctions (figure 3). Lorsque le neutrophile activé relâche le contenu de ses granules dans le tissu, les chimioattractants qui y sont emmagasinés attirent alors d'autres cellules du système immunitaire comme les macrophages et les lymphocytes. De cette façon, le neutrophile contribue au développement de la réponse inflammatoire. (Janeway et al., 1999 : 377-378)

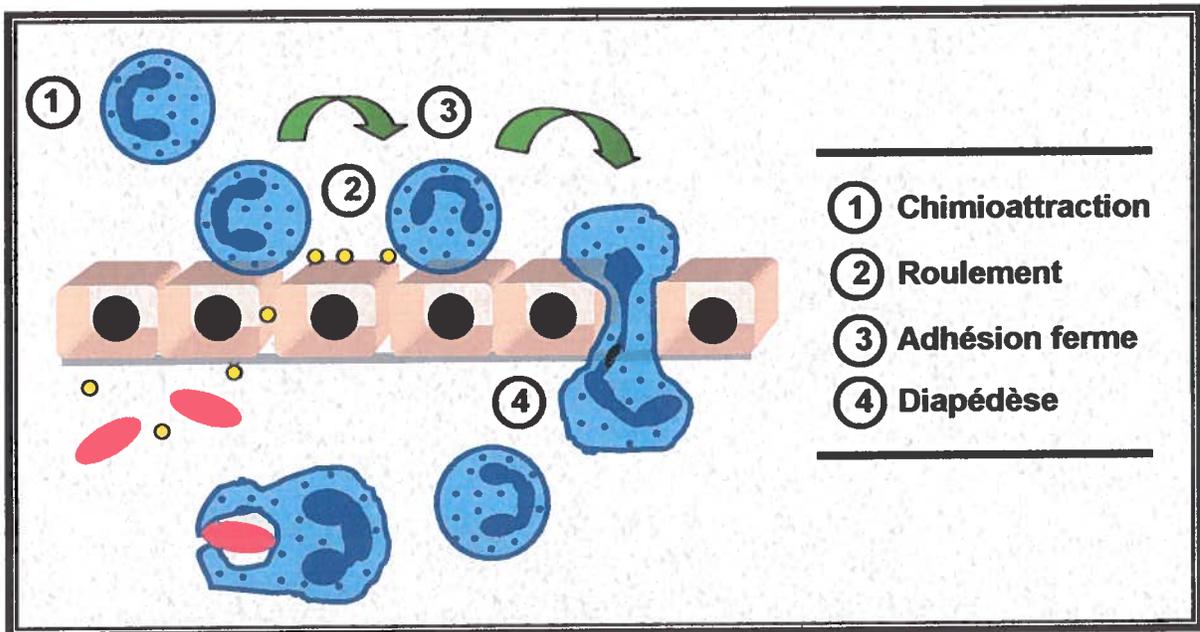


Figure 3. Migration du neutrophile vers les tissus (inspiré de Janeway et al., 378).

2.3 La résolution de l'inflammation

Comme précédemment mentionné, le processus d'inflammation et d'élimination des antigènes est essentiel à la survie de l'organisme. Toutefois, comme celui-ci est néfaste tant aux micro-organismes qu'aux cellules saines, il importe d'y mettre fin rapidement. L'apoptose des neutrophiles constitue le principal moyen de résolution de l'inflammation (Haslett et al., 1994 :327 ; Savill et Haslett, 1995 : 385 ; Savill, 1997 : 375). Ce phénomène, commun à plusieurs

types cellulaires est nécessaire à l'élimination normale de cellules, tant durant l'embryogenèse que lors du vieillissement cellulaire (Fadok et al, 1992 : 4029). De plus l'apoptose est nécessaire au maintien de l'homéostasie (Cohen, 1993 : 99s ; Squier, Sehnert et Cohen, 1995 : 2). Les neutrophiles apoptotiques possèdent plusieurs caractéristiques typiques (figure 4). L'absence des corps apoptotiques, qui permettent la dissociation des éléments cellulaires et ensuite leur élimination par les macrophages, est caractéristique des neutrophiles, puisqu'ils sont généralement présents lors de l'apoptose des autres cellules (Homberg et al., 1995 : 532 ; Homberg et Roos, 1996 : 94).

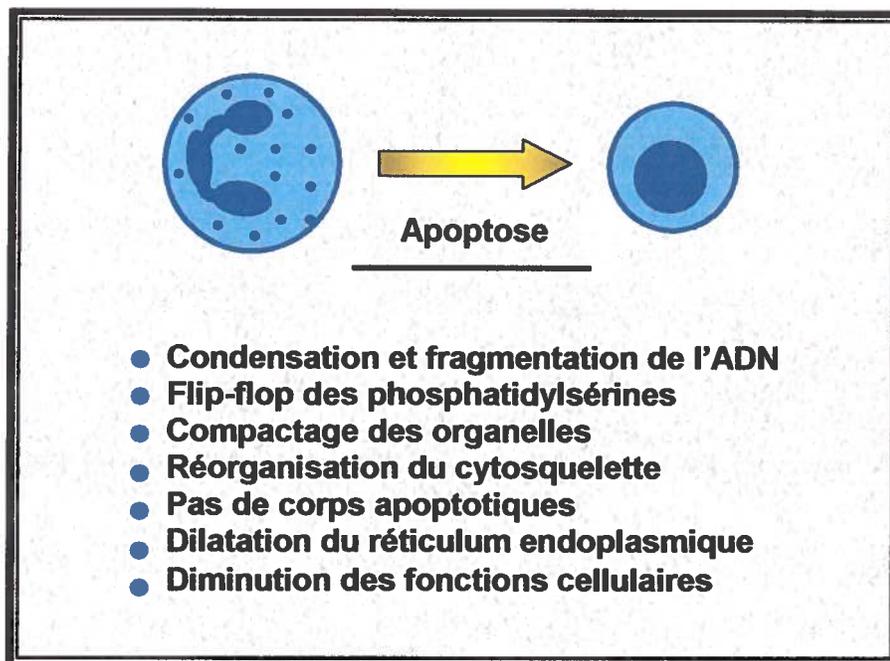


Figure 4. Caractéristiques de l'apoptose des neutrophiles (selon Edwards, 1994 : 4-6 et Homburg et Roos, 1996 : 94).

L'apoptose, couplée à l'absence d'un nouvel influx de neutrophiles empêche l'attraction d'autres cellules immunitaires et l'inflammation se résorbe peu à peu (Haslett, Savill et Meagher, 1990 : 225). Puisque les micro-organismes ne sont plus présents dans le tissu, les cellules endothéliales ne produisent plus de chimioattractants qui attirent les neutrophiles et les neutrophiles déjà présents

dans le tissu se dirigent vers une mort cellulaire programmée. Les macrophages présents reconnaissent les neutrophiles apoptotiques et sont en mesure de les éliminer (Savill et al., 1989 : 865 ;Savill, 1992 : 649).

2.4 Les maladies associées aux neutrophiles

Certaines maladies sont associées soit à une activation démesurée des neutrophiles, soit à leur absence ou dysfonction chez certains individus.

MALADIE	CARACTÉRISTIQUES
Syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS).	Dysfonction sévère des poumons et infections répétées. Infiltration des neutrophiles aux poumons.
Arthrite rhumatoïde.	Inflammation des articulations périphériques. Invasion de cellules B, T dans la membrane synoviale et de neutrophiles dans le liquide synovial.
Maladie granulomateuse chronique (CGD).	Susceptibilité accrue aux infections bactériennes et fongiques. Pas de flambée oxydative. Absence ou déficience du cytochrome b.
Déficience de la myéloperoxydase.	L'enzyme est absent. Généralement aucun symptôme, possibilité d'une plus grande incidence d'infection au <i>Candida</i> .
Déficience de l'Adhésion des Leucocytes (LAD).	Infections bactériennes répétées, neutrophiles déficients en phagocytose, chimiotactisme, etc. Absence ou faible expression de molécules d'adhésion : LFA-1, CR3, gp150, 95.
Syndrome de déficience spécifique des granules.	Infections répétées de la peau, des poumons, etc. Neutrophiles bilobés et sans granules ou granules vides.
Syndrome de Chediak-Higashi (CHS).	Granules cytoplasmiques géantes. Infections répétées et dysfonction cellulaire.
Syndrome de Job.	Dermatites aiguës, infections répétées. Concentration élevée des IgE dans le sérum. Peu de neutrophiles au site inflammatoire.
Syndromes myélodysplastiques (MDS).	Infections répétées. Déficience en la production d'un type de cellules hématopoïétiques (anémie, neutropénie, monocytose, thrombocytopenie).

Tableau 3. Les maladies associées aux neutrophiles (selon Edwards, 1994 : 263-285 et Abramson et Wheeler, 1993 : 183-214).

Chapitre 3: Les cytokines et le système immunitaire

3.1 Les cytokines

Les cytokines sont de petites molécules solubles (généralement plus petites que 15kDa) qui permettent la communication entre les différentes cellules de l'organisme. Elles sont sécrétées par des cellules et vont se lier à des récepteurs à la surface de celles-ci en agissant soit de façon autocrine, sur la cellule sécrétrice elle-même, soit de façon paracrine, sur des cellules environnantes. Les cytokines, contrairement aux hormones, ont un champ d'action large et peuvent agir localement de façons très variées. Ces molécules agissent comme des modulateurs majeurs de la réponse immunitaire et une légère modification de leur concentration dans le milieu peut entraîner des changements drastiques. Virtuellement, toutes les cellules du corps humain produisent des cytokines. Cependant, la quantité et la diversité des messagers produits varie d'un type cellulaire à un autre. Certaines cytokines sont produites de façon constitutive (de façon constante à un niveau basal) alors que d'autres sont induites par différents stimuli. Différentes combinaisons de cytokines peuvent engendrer une variété d'activités biologiques. Parfois ces fonctions se complètent pour former un effet additif alors que d'autres sont plutôt antagonistes et vont diminuer l'effet d'une cytokine seule. Il existe plusieurs catégories de cytokines qui sont divisées selon la source et les actions de celles-ci. Dans chaque catégorie, il existe encore des sous-catégories qui divisent les cytokines selon leurs différentes fonctions. Par exemple, il existe une différence entre les cytokines pro-inflammatoires : promotrices d'inflammation et celles anti-inflammatoires : inhibitrices d'inflammation. Certaines classes majeures de cytokines seront maintenant présentées, cependant les cytokines peuvent aussi être divisées selon les chaînes de récepteurs qu'elles utilisent, puisque certaines d'entre elles partagent des chaînes communes ou ayant une structure semblable.

Cette dernière classification, plus utilisée de nos jours, sera ensuite détaillée. (Janeway et al., 1994 : 288-292 ; Taga et Kishimoto, 1997 : 797)

3.1.1 Les interleukines

Une des familles de cytokines les plus connues est celle des interleukines. Mêmes si ces molécules possèdent peu d'homologie de séquence entre elles, les interleukines forment un groupe qui a la particularité de permettre la communication entre les leucocytes. Le nombre des interleukines se chiffre aujourd'hui à 29, mais celui-ci augmente sans cesse puisque de nouveaux membres de cette famille sont découverts. Les fonctions des interleukines sont très variées et celles-ci agissent sur une ou plusieurs cellules du système immunitaire (Janeway et al., 1994 : 288).

INTERLEUKINE		SOURCE	EFFETS
IL-1	IL-1 α et IL-1 β	Monocytes, cellules NK, B et T, macrophages activés, neutrophiles, cellules épithéliales, endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes et cellules présentatrices d'antigènes.	Fièvre, activation des Th et des macrophages. Prolifération des B et synthèse des immunoglobulines. Prolifération et activation des NK, fibroblastes, astrocytes et cellules microgliales. Augmente les intégrines de surface des neutrophiles, cellules B, T et des monocytes.
	IL-1 RA	Monocytes, hépatocytes, macrophages, neutrophiles.	Antagoniste de l'IL-1 α et β .
IL-2		Cellules Th1 activées, cellules NK, cellules T et B transformées.	Prolifération des cellules T et B. Synthèse d'IFN- γ par les leucocytes et sécrétion d'IL-1, TNF- α et TNF- β .
IL-3		Cellules T activées, NK, mastocytes, cellules épithéliales du thymus, kératinocytes, monocytes,	Rôle dans l'hématopoïèse, prolifération des macrophages et des mastocytes, production d'histamine.
IL-4		Cellules Th2 activées et Th1, mastocytes.	Prolifération et différenciation des B activées, inhibition des Th1.
IL-5		Cellules T.	Croissance et différenciation des éosinophiles, génération de T cytotoxiques.

IL-6	Cellules T, B, granulocytes, éosinophiles, macrophages, monocytes, fibroblastes, cellules endothéliales.	Croissance et différenciation des cellules B et T, fièvre, production des protéines de phase aiguë. Synthèse des métallothionéines. Induction de la synthèse des immunoglobulines.
IL-7	Kératinocytes, cellules du thymus et de la moelle osseuse.	Croissance des pré-B et pré-T, prolifération des cellules T naïves et activées, synthèse d'IL-1, -6 et MIP-1.
IL-8	Monocytes, hépatocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes.	Activation et chimioattraction des neutrophiles et des granulocytes, inhibe la production d'IgE par les B.
IL-9	Cellules T helper.	Prolifération des T helper et mastocytes.
IL-10	Cellules Th, B et NK, monocytes activés.	Inhibe les macrophages, les Th et la synthèse de certaines cytokines. Chimioattraction des lymphocytes T et co-stimulation de la prolifération des mastocytes.
IL-11	Fibroblastes.	Rôle dans l'hématopoïèse.
L-12	Cellules présentatrices d'antigènes, cellules B et T, macrophages.	Polarisation des Th1, prolifération des T naïves et des NK. Synthèse d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF.
IL-13	Cellules CD4+ et CD8+ activées, basophiles.	Croissance et différenciation des cellules B et de monocytes, inhibition des Th1 et des macrophages.
IL-14	Cellules B et T.	Génération et survie des B mémoires.
IL-15	Cellules NK, monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules B et T, mastocytes, épithélium intestinal, vaisseaux sanguins.	Voir section sur l'IL-15.
IL-16	Cellules CD8+ activées.	Chimioattraction des lymphocytes T.
IL-17	Cellules T activées CD4+, cellules T mémoires.	Augmentation de ICAM-1 sur les fibroblastes, sécrétion d'IL-6, -8, G-CSF et PGE2 par les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes.
IL-18	Monocytes, macrophages, cellules dendritiques, T et B, astrocytes, cellules microgliales.	Chimioattraction des lymphocytes, différenciation des Th1. Augmentation des activités cytotoxiques des NK, Production d'IFN- γ par les cellules B et inhibition de la production des IgE.
IL-19	Monocytes, cellules B.	?
IL-20	Monocytes, kératinocytes.	?

IL-21	Monocytes.	Prolifération des cellules de la moelle osseuse.
IL-22	Cellules T, cellules NK.	Pro-inflammatoire, synthèse des protéines de phase aiguë.
IL-23	?	Augmente la production d'IFN- γ par les cellules Th1 mémoires.
IL-24	Cellules T, monocytes.	Apoptose de lignées cellulaires cancéreuses.
IL-25	Mastocytes, cellules Th2.	Induction de l'IL-4, 5 et 13 par une population de cellules T, prolifération des éosinophiles.
IL-26	Cellules T mémoires, cellules NK.	?
IL-27	Cellules présentatrices d'antigènes activées.	Expansion clonale des T naïves et production d'IFN- γ par les CD4+ naïves.
IL-28	?	Activités antivirales.
IL-29	?	Activités antivirales.

Tableau 4. Les interleukines (selon Cytokine Reference online, 2000, l'encyclopédie Horst Ibelgauf's en ligne des cytokines, 2002 et Janeway et al., 1994 : 288 et 588).

3.1.2 Les interférons et les TNF

Une autre famille de cytokines est celle des interférons. Ces molécules jouent un rôle dans certaines réponses de défense de l'hôte et dans l'inhibition de la réplication virale. Les interférons sont surtout produits suite à l'enclenchement des mécanismes de l'immunité acquise. Les membres de la famille des TNF (tumor necrosis factor) quant à eux, jouent un rôle dans la prolifération et l'activation de certaines cellulaires immunitaires et dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose. (Janeway et al., 1994 : 288 et 385-386)

CYTOKINE	SOURCE	EFFETS
Famille TNF	TNF- α	Macrophages, monocytes, neutrophiles, cellules NK, T. Inflammation locale, activation des neutrophiles, cytolysse de lignées cellulaires tumorales. Destruction cellulaire, activation des cellules endothéliales, angiogénèse. Prolifération des cellules T et astrogliales.
	TNF- β	Cellules T et B, fibroblastes, astrocytes, cellules endothéliales et épithéliales. Activation des cellules endothéliales. Prolifération et synthèse de plusieurs cytokines par les fibroblastes, mitogène des cellules B. Cytolyse de cellules tumorales, inhibe la croissance des ostéoclastes et kératinocytes.
	LT- β	B et T activées. Développement des ganglions.
	CD40L	Cellules T, mastocytes. Activation des cellules B et changement d'isotype des immunoglobulines.
	FasL	Cellules T. Apoptose, cytotoxicité.
	CD27L	Cellules T. Prolifération et maturation des cellules T.
	CD30L	Cellules T. Prolifération des cellules B et T.
	TRAIL	Tissus variés. Apoptose de cellules transformées, marqueur de différenciation des cellules NK.
	TWEAK	Tissus variés. Inflammation du cerveau, induction d'apoptose, activation de NF- κ B.
Interférons	IFN- α	Leucocytes. Anti-virale, augmente les CMH de classe 1.
	IFN- β	Fibroblastes. Anti-virale, augmente les CMH de classe 1.
	IFN- γ	Cellules T et NK. Activation des macrophages, augmente les CMH et induit le changement d'isotype des immunoglobulines.

Tableau 5. Les interférons et les TNF (selon Cytokine Reference online, 2000, l'encyclopédie en ligne Horst Ibelgauf's des cytokines, 2002 et Janeway et al., 1994 : 589).

3.1.3 Les chimiokines

Les chimiokines sont apparentées dans leur séquence en acides aminés et dans leurs fonctions. Une des principales fonctions de cette famille de molécules est la chimioattraction des leucocytes aux sites inflammatoires. Il existe quatre sous-groupes de chimiokines, soit les CXC, les CC, les C et les

CX₃C, selon la présence de l'acide aminé cystéine séparé ou non par d'autres acides aminés. Ces différentes sous-catégories possèdent aussi des fonctions qui leur sont apparentées. (Janeway et al., 1994 : 380-382 ; Rossi et Zlotnik, 2000 : 217)

CHIMIOKINE		SOURCE	EFFETS
CXC	IL-8	Monocytes, macrophages, fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales.	Chimioattraction et activation des neutrophiles, chimioattraction des cellules T naïves, angiogénèse.
	IP-10	Monocytes, cellules T et endothéliales, fibroblastes, kératinocytes.	Chimioattraction des T naïves, NK, et monocytes. Immunostimulation, inhibe l'angiogénèse, active les Th1.
	SDF-1	Cellules stromales.	Chimioattraction des T naïves, et des cellules B. Implication dans le développement des lymphocytes B, compétition avec le VIH-1.
	NAP-2	Plaquettes.	Chimioattractant et activateur des neutrophiles, angiogénèse.
	GRO α , β , γ	Monocytes, fibroblastes, cellules endothéliales.	Chimioattraction des cellules T naïves, des neutrophiles et des fibroblastes. Activation des neutrophiles, angiogénèse.
CC	MIP-1 α	Monocytes, cellules T, mastocytes, fibroblastes.	Chimioattractant des monocytes, cellules dendritiques, NK et T et des basophiles. Compétition avec le VIH-1, promouvoie les Th1.
	MIP-1 β	Monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules endothéliales.	Chimioattraction des Monocytes, cellules dendritiques, NK et T. Compétition avec le VIH-1.
	MCP-1	Monocytes, macrophages, fibroblastes, kératinocytes.	Chimioattractant des monocytes, cellules dendritiques, NK et T et des basophiles. Active les macrophages. Relâchement de l'histamine des basophiles et promouvoit les Th2.
	Éotaxine	Cellules T, endothéliales, épithéliales, plaquettes.	Chimioattraction des éosinophiles, monocytes et cellules T, rôle dans les allergies.

	RANTES	Cellules T, endothéliales et plaquettes.	Chimioattractant des monocytes, cellules dendritiques, NK et T, des basophiles et des éosinophiles. Active les cellules T, induit la dégranulation des basophiles et l'inflammation chronique.
C	ATAC (humaine)	Cellules T CD8+.	Chimioattraction des cellules T. Version humaine de lymphotactine.
	Lymphotactine (murine)	Cellules T.	Chimioattraction des thymocytes, cellules dendritiques et NK. Impliquée dans la localisation des lymphocytes et leur développement.
CX ₃ C	Neurotactine (murine)	Cellules microgliales.	Chimioattraction des neutrophiles.
	Fractalkine (humaine)	Monocytes, cellules endothéliales et microgliales.	Chimioattraction des monocytes et des cellules T, inflammation du cerveau. Version humaine de la neurotactine.

Tableau 6. Les chimiokines (selon Cytokine Reference online, 2000, l'encyclopédie en ligne Horst Ibelgaufts' des cytokines, 2002 et Janeway et al., 1994 : 591).

3.1.4 Les facteurs de croissance

Tel que leur nom l'indique, les facteurs de croissance aident à la prolifération et à la maturation des cellules de l'organisme. Ces molécules peuvent agir tant sur des cellules du système immunitaire que sur des cellules des différents tissus de l'organisme. (Nemunaitis, 1997 : 709 ; Trneny et Klener, 1992 : 427 ; Vose et Armitage, 1995 : 2473)

FACTEUR DE CROISSANCE	SOURCE	EFFETS
PDGF (Plaquet-derived growth factor)	Plaquettes, cellules endothéliales, fibroblastes, placenta, macrophages, mégakaryocytes,	Prolifération des tissus conjonctifs, des cellules gliales et musculaires lisses. Vasoconstriction. Guérit les blessures, augmente certains récepteurs membranaires. Chimioattraction des fibroblastes, monocytes et neutrophiles.
EGF (Epithelial growth factor)	Glandes sous-maxillaires et glandes de Brunner.	Prolifération et différenciation des cellules épithéliales, gliales et mésenchymales. Sécrétion des sucs gastriques, synthèse d'hormones, agit comme mitogène. Augmentation de l'angiogénèse, chimioattractant des fibroblastes et des cellules épithéliales.
TGF- α (transforming growth factor)	Cellules transformées, kératinocytes, macrophages, plaquettes, hépatocytes.	Guérison normale des blessures. Développement de l'épiderme et des tissus hépatiques. Augmentation de l'angiogénèse et synthèse du collagène.
TGF- β	Cellules Th1 activées et cellules NK, plaquettes, cellules endothéliales, kératinocytes, chondrocytes.	Prolifération des macrophages et des lymphocytes, diminution de la production de cytokines et des CMH de classe II. Inhibition de la croissance de plusieurs cellules. Augmentation de l'angiogénèse et de la neurogénèse. Effet supprimeur du système immunitaire. Module la sécrétion des immunoglobulines par les B.
FGF (Fibroblast growth factor)	Plusieurs cellules variées.	Prolifération de plusieurs types cellulaires.
NGF (nerve growth factor)	Cellules musculaires lisses, fibroblastes, hypothalamus, glande thyroïde, épидидyme.	Croissance et survie des cellules neurales. Synthèse de plusieurs neurotransmetteurs, chimioattraction des polynucléaires et leucocytes, prolifération des mastocytes. Relâchement d'histamine, prolifération et différenciation des cellules B et T.
Érythropoïétine (Epo)	Cellules rénales, hépatocytes, macrophages.	Prolifération et différenciation des érythrocytes.
IGF-1 (Insulin-like growth factor)	Cellules hépatiques, rénales, pulmonaires, etc.	Prolifération et différenciation de plusieurs types cellulaires.
IGF-2	Plusieurs cellules variées.	Prolifération de plusieurs types cellulaires, principalement fœtaux.

G-CSF	Monocytes, fibroblastes, macrophages, neutrophiles, cellules stromales et endothéliales.	Prolifération et différenciation des granulocytes/neutrophiles, augmente l'ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity).
GM-CSF	Cellules T, endothélium, fibroblastes, macrophages.	Prolifération et développement des granulocytes et macrophages. Expression du C3a sur les basophiles.
M-CSF	Monocytes, granulocytes, cellules endothéliales, B et T, fibroblastes.	Prolifération des macrophages et des granulocytes. Survie et différenciation des monocytes. Induction de l'ADCC par les macrophages production de cytokines.

Tableau 7. Les facteurs de croissance (selon Cytokine Reference online, 2000 et l'encyclopédie en ligne Horst Ibelgauf's des cytokines, 2002).

3.2 Les récepteurs des cytokines

Chaque cytokine possède son propre récepteur qui permet à la cellule qui l'exprime à sa surface de répondre à la cytokine correspondante. Les différents récepteurs permettent d'obtenir la spécificité d'action. Les récepteurs de cytokines peuvent être composés de plusieurs sous-unités appelées chaînes et, selon la cytokine, une ou plusieurs chaînes est/sont nécessaire(s) pour initier une cascade de signaux intracellulaires qui vont engendrer une réponse fonctionnelle. Par exemple, les récepteurs des hématopoïétines sont généralement composés d'au moins deux chaînes. Les effets peuvent amener à une activation de la cellule par la phosphorylation de la partie intracellulaire du récepteur et par le recrutement de différentes catégories de protéines comme les JAKs ou les STATS (Janeway et al., 1994 : 291 ; Leonard et O'Shea, 1998 : 293). D'un autre côté, le recrutement de protéines qui déphosphorylent les récepteurs et les JAKs/STATs, par exemple, les SOCS et SHP-1, entraîne quant à lui une régulation négative de la cellule. Ce phénomène permet de contrôler le

degré d'activation de la cellule et ainsi d'empêcher une suractivation qui pourrait jouer un rôle dans le développement de désordres inflammatoires. (Greenhalgh et Hilton, 2001 : 348 ; Veillette, Latour et Davidson, 2002 : 669 ; Yasukawa, Sasaki et Yoshimura, 2000 :143)

3.2.1 Les composantes des récepteurs

Comme mentionné précédemment, il existe plusieurs catégories de cytokines. Leur classification peut être basée sur différentes caractéristiques. On peut observer la structure tridimensionnelle de la molécule, sa composition en acides aminés ou ses activités biologiques, mais la classification la plus utilisée de nos jours tient compte des récepteurs auxquels se lient les cytokines. Selon cette dernière, il y a principalement 8 grandes classes de cytokines. La première, celle des hématopoïétines comporte plusieurs interleukines et certains facteurs de croissance et renferme quatre sous-catégories distribuées selon l'utilisation d'une chaîne de récepteur commune. Ce partage d'une chaîne de récepteur permet la redondance dans les fonctions des cytokines puisque ces différentes chaînes activent chacune des cascades de signaux intracellulaires spécifiques lorsque liées par une cytokine. On retrouve comme deuxième catégorie les interférons suivie par le groupe des récepteurs au TNF. Il existe aussi la famille des récepteurs à l'IL-1 et les membres des récepteurs au TGF. Finalement, on compte aussi la catégorie des récepteurs couplés aux protéines G, la superfamille des récepteurs aux immunoglobulines et la superfamille des récepteurs aux protéines tyrosines kinases. (Barrett, 1996 : 1 ; Dower, 1993 : 28 ; Foxwell, Barrett et Feldmann, 1992 : 161 ; Inglot, 1997 : 353 ; Lu, 1995 : 305 ; Niederlova et Koubek, 1999 : 169)

FAMILLES		MEMBRES	SPÉCIFICITÉS
Hématopoïétines	gp130 users	IL-6, IL-11, CNTF, LIF, OSM, Card1.	Récepteur formé d'au moins deux chaînes. 4 résidus cystéines près du groupement NH ₂ et un site WSXWS près de la région transmembranaire. Chacune des sous-familles partage une chaîne de récepteur commune indiquée par son nom.
	βc users	GM-CSF, IL3, IL-5.	
	γc users	IL-2, 4, 7, 9, 15, 21.	
	αc users	IL-4, IL-13.	
Interférons		IFN-α, β, γ, IL-10.	4 résidus cystéines près du groupement NH ₂ . Deux types de récepteurs pour les IFN, soit IFNRI et IFNRII.
TNF		TNF-α, TNFβ, FASL, CD40L, NGFR, CD95L.	Plusieurs cystéines dans le domaine extracellulaire. Deux types de récepteurs pour les TNF, soit TNFRI et TNFRII.
IL-1		IL-1α, IL-1β, IL-1Rα.	3 domaines extracellulaires semblables aux immunoglobulines. Deux récepteurs à l'IL-1.
TGF-β		TGF-β, BMP.	Domaines extracellulaires riches en cystéines. Deux types de récepteurs au TGF-β.
Chimiokines		IL-8, GRO-α, β, γ, ENA-78, éotaxine, fractaline, MIP1-α, β, RANTES, etc.	Récepteurs couplés aux protéines G. Récepteurs à 7 domaines trans-membranaires. Ligands peuvent induire la chimioattraction.

Tableau 8. Les familles de récepteurs de cytokines (selon Barrett, 1996 : 1 ; Dower, 1993 : 28 ; Fowwell, Barrett et Feldmann, 1992 : 161 ; Inglot, 1997 : 353 ; Janeway et al., 1994 : 291 ; Lu, 1995 : 305 ; Niederlova et Koubek, 1999 : 169).

3.2.2 Les cascades de signalisation

Lorsqu'une cytokine se lie à son récepteur à la surface d'une cellule, plusieurs molécules intracellulaires sont recrutées près de la membrane cytoplasmique. Selon le récepteur et la cellule cible, un certain groupe de protéines spécifiques engendre une réponse cellulaire. Ces molécules s'assemblent sous la forme d'une cascade, c'est-à-dire que la première protéine à se fixer au récepteur entraînera la liaison de la deuxième et ainsi de suite. (Janeway et al., 1994 : 164-183)

3.2.2.1 Les cascades d'activation

Une des principales voies d'activation des cellules par les cytokines est la cascade Jak/STAT (janus kinase/signal transducers and activators of transcription). Ce type de cascade de signalisation est commun à plusieurs récepteurs. Les Jak sont des kinases qui s'associent aux récepteurs et qui sont phosphorylées lors de l'activation de celui-ci. À ce jour, il existe quatre Jaks : Jak-1, Jak-2, Jak-3 et Tyk-2. Plusieurs récepteurs différents activent une ou plusieurs des Jaks et chacune de ces Jaks, une fois phosphorylée, a la possibilité de s'associer à un des STATs. Il existe 8 STATs connus : STAT 1 α , 1 β , 2, 3, 4, 5 α , 5 β et STAT6. Lorsque le STAT se lie à une Jak, il se phosphoryle et se dimérise pour se rendre dans le noyau. Il existe des homodimères de STATs, composés de deux membres identiques phosphorylés, et des hétérodimères. Les différents dimères de STATs se lient à divers endroits sur l'ADN et engendrent la transcription de plusieurs gènes. (Ivashkiv, 2000 : 220 ; Janeway et al., 1994 : 185 ; Kisseleva et al., 2002 : 1 ; Leonard, 2002 : 271 ; Leonard et O'Shea, 1998 : 293 ; O'Shea, Gadina et Schreiber, 2002 : s121)

Une autre voie d'activation est celle des Src kinases. Lorsqu'un récepteur est lié par une cytokine, on observe généralement une phosphorylation dans le domaine intracellulaire principalement aux acides aminés tyrosine, mais aussi, pour certains récepteurs, sur les sérines et les thréonines. Un motif de phosphorylation formé de deux tyrosines, séparées par environ treize acides aminés se nomme ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Ce motif peut être reconnu par une molécule possédant un domaine SH₂ comme les Src. Lorsqu'un membre de la famille des kinases Src se lie au récepteur, il est phosphorylé à son tour et capable de recruter d'autres molécules au récepteur comme des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase) ou des molécules de la famille Erk (extracellular-regulated kinase) (Dong, Davis et Flavell, 2002 : 55). Ces cascades de signalisation se terminent généralement par un élément capable de se rendre au noyau et de se fixer à des éléments de l'ADN. (Barrett,

1996 : 1 ; Boger et Goldberg, 2001 : 557 ; Finidori et Kelly, 1995 : 11 ; Lu, 1995 : 305 ; Taga et Kishimoto, 1992 : 3387)

3.2.2.2 Les cascades d'inhibition

Lorsqu'une cellule immunitaire est activée par une cytokine, elle participe entre autres au processus d'inflammation et d'élimination de l'antigène. Toutefois, ce processus inflammatoire engendre des dégâts considérables chez l'hôte et il doit être transitoire. Il est donc nécessaire que la cellule activée retourne à son état antérieure afin que se résolve l'inflammation. Il existe des molécules qui ont la propriété d'inactiver les cascades de signalisation intracellulaires. Parmi ces protéines, on retrouve, chez l'humain, les phosphatases, les SOCS, et les PIAS. (Tableau 9) Les phosphatases sont des protéines exprimées de façon constitutive qui ont la capacité de déphosphoryler des protéines ou des récepteurs. La famille des SOCS (Suppressor of cytokine signaling) est formée de huit membres (Cis et SOCS-1 à 7). Leur production peut être induite par des cytokines ou encore être constitutive et augmentée par des cytokines. Chaque SOCS possède un domaine SH₂ central ainsi qu'une région C-terminale contenant la boîte SOCS. La longueur de leur région N-terminale varie. Les SOCS se lient soit directement aux Jak, soit aux récepteurs phosphorylés. La boîte SOCS permet l'ubiquitination et la dégradation des SOCS et des molécules qui leur sont liés par le protéosome. Les PIAS (Protein inhibitors of signal transducer and activator of transcription (STAT)) sont exprimés de façon constitutive et partagent un domaine liant le zinc et une région très acide. Leurs activités se situent principalement au niveau du noyau où ils inactivent les STATS. (Cooney, 2002 :83 ; Greenhalgh et Hilton, 2001 :348 ; Kile, Nicola et Alexander, 2001 : 292 ; Kile et Alexander, 2001 : 1627 ; Krebs et Hilton, 2000 : 2813 ; Krebs et Hilton, 2001 : 378 ; Starr et Hilton, 1999 : 47 ; Veillette, Latour et Davidson, 2002 : 669 ; Yasukawa, Sasaki et Yoshimura, 2000 : 143)

INHIBITEUR		FONCTION	MÉCANISME
Phosphatases	SHP-1	Régulation négative du BCR, TCR, de la cascade de signalisation du GM-CSF, CSF-1, EPO, IL-3, IFN- γ .	Déphosphorylation de JAK2 et des composantes de la signalisation par la liaison au récepteur.
	CD45	Impliqué dans la signalisation du BCR et TCR. Régulation négative de certaines cascades de cytokines (IL-3, IFN- γ , EPO).	Déphosphorylation de JAK2.
SOCS	CIS	Régulation négative de la cascade de IL-2, IL-3, EPO, GH et prolactine.	Lie les résidus phosphorylés sur le récepteur et empêche la phosphorylation des STAT.
	SOCS-1	Régulation négative de la cascade de IFN- α , IFN- γ , IL-2, 3, 4, 6, EPO, LIF, GH, TNF- α , TPO et TSLP.	Lie la boucle d'activation des JAKs et empêche la liaison de l'ATP.
	SOCS-2	Régulation négative de la cascade de GH, IL-6, LIF et IGF-1.	Inconnu.
	SOCS-3	Régulation négative des cascades de EPO, IL-2, 3, 4, 6, 9, 11, LIF, IFN- γ , GH, prolactine, leptine, insuline et IGF-1.	Interagit avec plusieurs récepteurs phosphorylés et lie les JAKs.
	SOCS-4	Inconnue.	Inconnu.
	SOCS-5	Régulation négative de la cascade de IL-6 et LIF.	Inconnu.
	SOCS-6	Inconnue.	Inconnu.
PIAS	SOCS-7	Lie Nck.	Inconnu.
	PIAS1	Inconnue.	Lie le dimère non méthylé de STAT1 et empêche leur liaison à l'ADN.
	PIAS3	Inconnue.	Lie les STAT3 phosphorylés et les empêche d'activer des gènes.
	PIAS- γ	Inconnue.	Inconnu.
	PIAS-y	Empêche la signalisation de l'IFN- γ .	Inhibe l'activation de gènes de STAT1, pas sa liaison à l'ADN.
	PIASx- α	Inconnue.	Inconnu.
PIASx- β	Inconnue.	Inconnu.	

Tableau 9. Les composantes des cascades de signalisation inhibitrices (selon Cytokine Reference online, 2000 et l'encyclopédie en ligne Horst Ibelgauffs' des cytokines, 2002).

3.3 Les cytokines et les maladies

Comme mentionné précédemment, la production des interleukines et autres cytokines est un phénomène hautement contrôlé, et un minime déséquilibre peut avoir des effets notables sur un ou plusieurs types cellulaires et même sur l'orientation ou l'efficacité de la réponse immunitaire. De ce fait, il existe plusieurs pathologies découlant aussi bien d'une carence en une cytokine que d'un surplus. De plus, l'absence ou la défaillance d'un récepteur d'une cytokine spécifique entraîne des symptômes similaires à une déficience en la cytokine elle-même. Par exemple, dans l'arthrite rhumatoïde, on observe un taux élevé de cytokines pro-inflammatoires dans les articulations des patients qui contribue au maintien du statut inflammatoire de l'articulation (Edwards, 1994 : 282-285). Par contre, chez les patients X-SCID (X-linked severe combined immune deficiency) qui ont une susceptibilité accrue aux infections, c'est la chaîne de récepteur γc , commune à plusieurs cytokines, et dont le gène est situé sur le chromosome X, qui est mutée. La déficience de cette chaîne empêche l'action de plusieurs cytokines comme l'IL-2, 4, 7, 9, 15 et 21 sur les cellules immunitaires et engendre une diminution des capacités du système de défense de l'organisme (Uribe et Weinberg, 1998 : 299). Une déficience des molécules jouant un rôle dans la cascade de signalisation des récepteurs peut aussi être une source de pathologies plus ou moins graves selon le niveau auquel elle se situe. Depuis quelques années, les cytokines sont de plus en plus ciblées pour des thérapies contre des maladies ou des cancers (Garrison et McDonell, 1999 : i65 ; Moreland et al., 1997 : 141 ; Negrier et al., 1998 : 1272 ; Rosenberg, 1994 : 907 ; Rosenberg, 2001 : 380). Une meilleure connaissance de leurs sources et de leurs actions permet d'identifier des situations où l'ajout ou le blocage d'une cytokine pourrait être bénéfique à l'organisme.

Il est possible de modifier la réponse à une cytokine, et ce, à plusieurs niveaux différents. Les cytokines et leurs récepteurs peuvent être modulés, soit à

la hausse, soit à la baisse par différents stimuli tels que des facteurs environnementaux, des polluants, des dérivés chimiques, la présence d'antigènes ou de pathogènes et même par d'autres cytokines (Lu, 1995 : 305; Niederlova et Koubek, 1999 : 169; Parkin et Cohen, 2001 : 1777). Tout d'abord, on peut stimuler ou inhiber la production d'une cytokine en modifiant la transcription même de son ARN ou encore la traduction de la protéine. Ensuite, on peut inhiber l'effet d'une cytokine en injectant localement ou en modulant la sécrétion des récepteurs solubles à celle-ci. Les récepteurs solubles lient la cytokine et agissent comme compétiteurs directs en l'empêchant de se lier à son récepteur à la surface d'une cellule. Ainsi, la cytokine demeure dans la circulation ou les tissus, mais elle est neutralisée. D'un autre côté, on peut aussi utiliser des antagonistes du récepteur à la cytokine afin de bloquer l'espace occupé normalement sur le récepteur par la cytokine et ainsi empêcher celle-ci de se lier et d'induire une signalisation. Finalement, on peut inhiber des éléments de la cascade de signalisation induite par la liaison de la cytokine à son récepteur à l'aide d'inhibiteurs spécifiques pour empêcher l'effet de la cytokine sur la cellule.

Compte tenu de la redondance de plusieurs cytokines qui peuvent effectuer des fonctions similaires sur un même type cellulaire, il se peut qu'une déficience en une cytokine particulière ne cause pas de problème majeur sur l'organisme. Par contre, comme les cytokines agissent souvent sur plusieurs types cellulaires différents, une déficience en une cytokine peut aussi affecter plusieurs aspects de la réponse immunitaire de l'organisme. (Janeway et al., 287-290)

Chapitre 4: L'interleukine-15

4.1 La production de l'IL-15

L'IL-15 est une cytokine de la famille des hématopoïétines qui utilisent la chaîne de récepteur γc (He et Malek, 1998 :503 ; Lin et al., 1995 :331). Cette famille comporte aussi les interleukines-2, 4, 7, 9 et 21 (Asao et al., 2001 : 1 ; Giri et al., 1995 : 763 ; Kimura et al., 1995 : 115 ; Noguchi et al., 1993 : 1877 ; Russell et al., 1993 : 1880) . Le gène de l'interleukine-15 comporte 9 exons, dont 7 codant pour la protéine (Anderson et al., 1995 : 701 ; Krause et al., 1996 : 667). La production de l'IL-15 est un phénomène contrôlé de façon très stricte et post-transcriptionnelle (Bamford et al., 1996 : 476 ; Grabstein et al., 1994 : 965). Malgré les taux élevés d'ARN messager détectés chez plusieurs types cellulaires, la protéine est sécrétée en très faible quantité par les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules stromales de la moelle osseuse, l'épithélium du thymus, les astrocytes et les cellules microgliales fœtales, les cellules épithéliales des tubules corticaux et l'épithélium de l'intestin fœtal (Bramford et al., 1996 : 476 ; Carson et al., 1995 : 2578 ; Grabstein et al., 1994 : 965 ; Jonuleit et al., 1997 : 2610 ; Leclercq et al., 1996 : 325 ; Lee et al., 1996 : 1062 ; Mohamadzadeh et al., 1995 : 4492 ; Reinecker et al., 1996 : 1706 ; Weiler et al., 1998 : 1194). Cependant, si l'IL-15 est peu sécrétée dans le milieu intercellulaire, elle est aussi détectée lorsque liée à son récepteur, à la surface de fibroblastes, de monocytes et de précurseurs de leucocytes (Briard et al., 2002 : 4326 ; Musso et al., 1999 : 3531). De plus, une grande quantité de la cytokine demeure à l'intérieur même des cellules suggérant un rôle dans le trafic cellulaire.

Il existe deux isoformes de l'IL-15. La première possède un signal peptide long et se retrouve soit dans le cytoplasme et le noyau pour être dégradée par les protéosomes, soit dans le réticulum endoplasmique pour être sécrétée en

passant par différentes voies de glycosylation. La deuxième présente un signal peptide court, ne passe pas par le réticulum endoplasmique et demeure dans le cytoplasme et le noyau de la cellule (Kurys et al., 2000 : 30653). La longueur du signal peptide et la présence de nombreux codons AUG à l'extrémité 5' de la protéine favoriseraient la faible transcription de l'IL-15. Cette faible transcription pourrait être aussi perçue comme un mécanisme de défense du corps humain, puisqu'on sait qu'une trop grande quantité d'IL-15 peut favoriser le développement de certaines maladies tant inflammatoires qu'infectueuses.

4.2 Le récepteur de l'IL-15

Le récepteur de l'interleukine-15 se retrouve sur plusieurs cellules de l'organisme, entre autres sur les cellules immunitaires T, B, NK, les neutrophiles et les mastocytes (Anderson et al., 1995 : 29862). Il est composé de trois chaînes dont deux sont utilisées par d'autres cytokines. En plus de partager sa chaîne γ avec plusieurs interleukines (2, 4, 7, 9, 21), le récepteur de l'IL-15 partage sa chaîne β avec celui de l'IL-2 et ainsi, ces deux cytokines possèdent certaines fonctions similaires. (Bamford et al., 1994 : 4940 ; Giri et al., 1994 : 2822 ; Grabstein et al., 1994 : 965).

4.2.1 Les chaînes du récepteur

L'interleukine-15 se lie à un récepteur possédant trois chaînes dites classiques soit la IL-15R α , la IL-2/15R β et la γ . Les chaînes β et γ font partie de la superfamille de type 1 des récepteurs de cytokines. Ceux-ci possèdent un motif composé de quatre cystéines extra-cellulaires. La chaîne IL-15R α , par contre n'appartient pas à ce groupe, mais est plutôt une protéine membranaire de type 1 (ou hématopoïétine). Elle comporte, comme l'IL-2R α , un domaine SUSHI, important dans les interactions entre les protéines (Giri et al., 1995 : 3654). Une

liaison de haute affinité est obtenue lorsque la cytokine se fixe à l'IL-15R α seule ou au récepteur entier (α , β , γ) (Anderson et al., 1995 : 29862 ; Giri et al., 1995 : 3654). Une moyenne affinité de liaison est rencontrée lors de la présence conjointe des chaînes β et γ (Tagaya et al., 1996 : 4928). Récemment, une toute nouvelle chaîne de récepteur de l'IL-15, nommée IL-15RX a été découverte chez les mastocytes (Tagaya et al., 1996 : 329 ; Tagaya et al., 1996 : 4928). Ces cellules répondent à l'IL-15 grâce à une chaîne de récepteur différente de celles partagées avec l'IL-2, qui active, comme expliqué plus loin, une voie Jak/STAT.

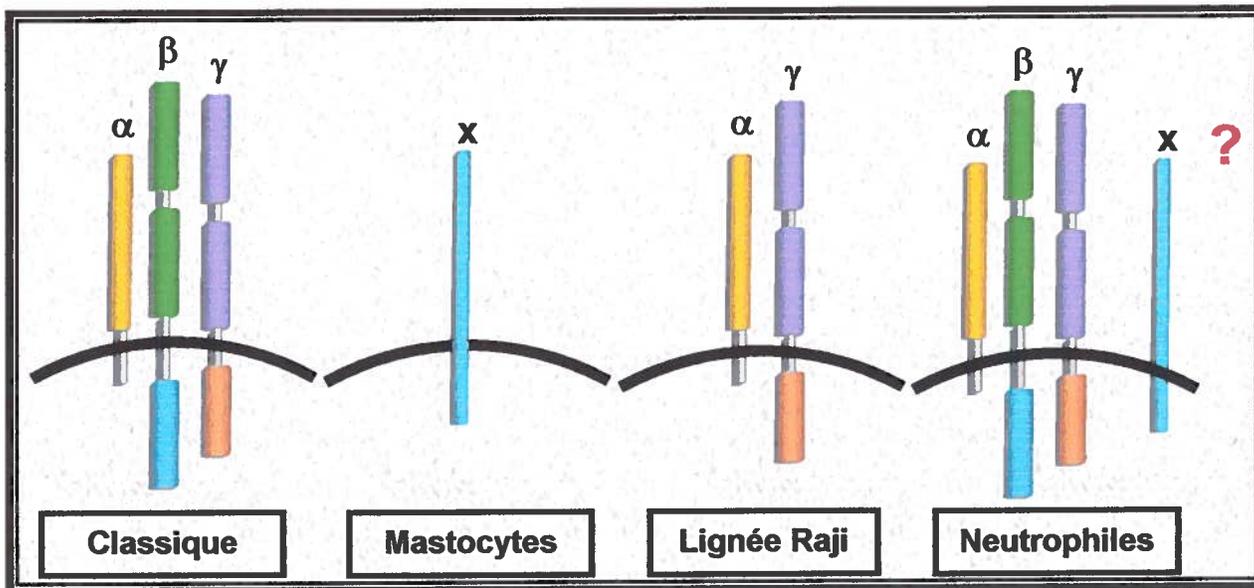


Figure 5. Les récepteurs de l'interleukine-15.

4.2.2 Les cascades de signalisation activées

Lorsque l'interleukine-15 se lie à son récepteur, plusieurs cascades de signalisation sont activées. La chaîne β du récepteur de l'IL-15 est associée avec la protéine Jak1 et la chaîne γ , avec Jak3 (Johnston et al., 1995 : 8705 ; Witthuhn et al., 1994 : 153). Ces deux protéines recrutent, par la suite, les STATs 3 et 5 (Johnston et al., 1995 : 8705 ; Lin et al., 1995 : 331).

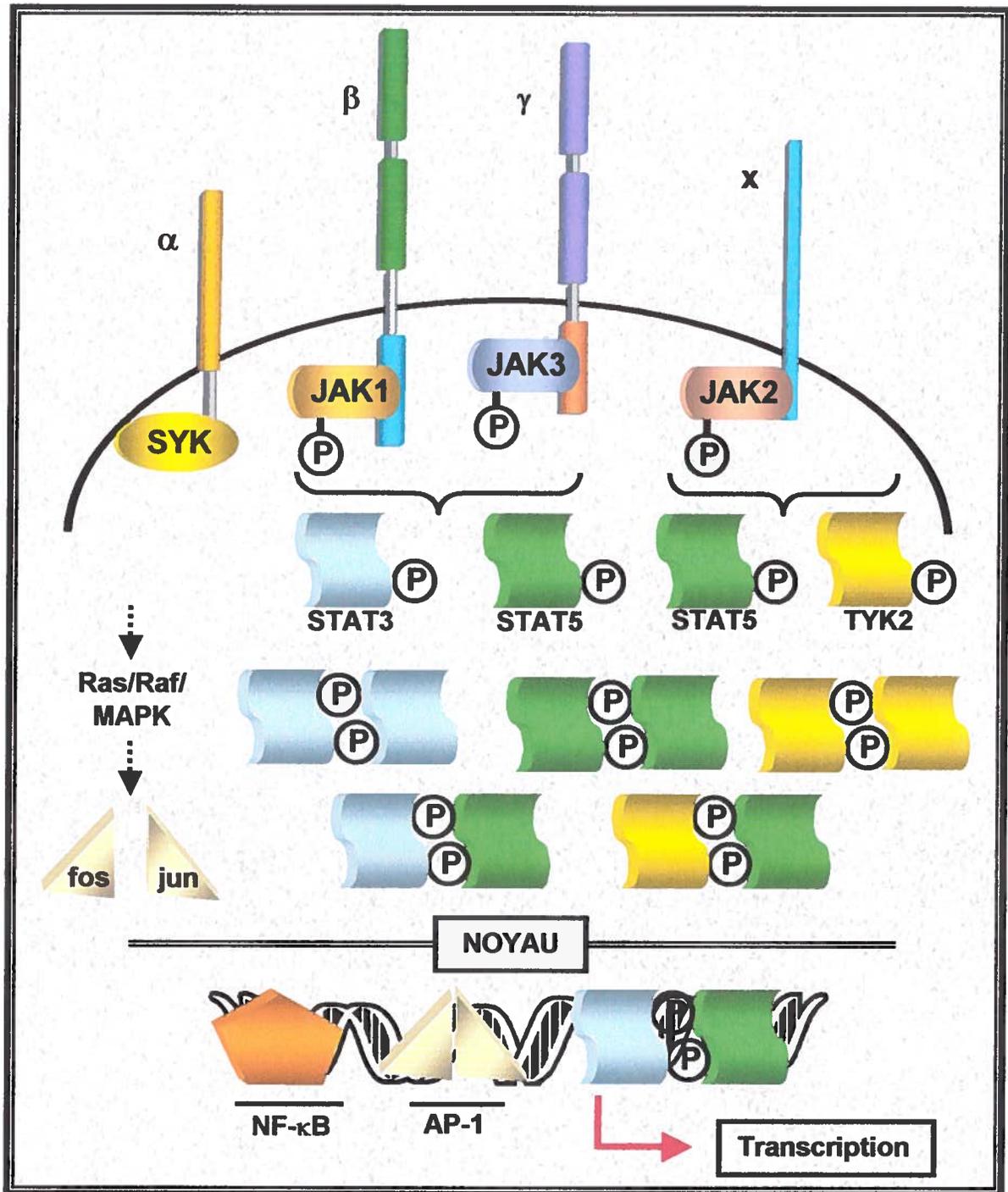


Figure 6. Les cascades de signalisation induites par l'IL-15: La phosphorylation du récepteur permet le recrutement des Jaks, qui phosphorylent les STATs. Les STATs dimérisés migrent dans le noyau où ils induisent la transcription de gènes.

Il a été récemment démontré, dans une lignée de cellules humaines B « Raji », que la partie intracellulaire de la chaîne de récepteur α de l'IL-15 s'associe à la protéine Syk (Bulanova et al., 2001 : 6292). Ce phénomène est plutôt inattendu, puisque la queue intracytoplasmique de l'IL-15R α est courte. La chaîne IL-15RX, quant à elle, amène le recrutement de Jak2 et de STAT5, ainsi que Tyk2 et STAT6 (Tagaya et al., 1996 : 4928). De plus, il a été démontré que la cascade Ras/Raf/MAPK, qui induit l'activation de fos, de jun et des tyrosines kinases de la famille src est activée par l'IL-15 (Miyazaki et al., 1995 : 223). On remarque aussi l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 par l'IL-15 chez tous les lymphocytes mais non chez les neutrophiles, qui activent seulement NF- κ B (Lin et al., 1995 : 331). (figure 6)

4.3 Les effets de l'IL-15

L'interleukine-15 est une cytokine pro-inflammatoire, c'est-à-dire, qu'elle aide au développement de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Elle possède aussi des propriétés anti-tumorales et elle agit sur plusieurs aspects des cellules immunitaires comme la maturation, la croissance, l'activation et la sécrétion de cytokine.

4.3.1 Les effets sur les cellules du système immunitaire humain

TYPE CELULAIRE	FONCTIONS MODULÉES	RÉFÉRENCES
Cellule B	Augmentation de la prolifération, induction de la production d'anticorps (IgG1, IgM, IgA induits par la co-stimulation avec le CD40).	Armitage et al., 1995: 483; Trentin et al., 1996: 3327.

Cellule T	Facteur de croissance des cellules T activées et T mémoires, effet de chimioattraction, orientation de la localisation et de l'homéostasie.	Bamford et al., 1994: 4940; Burton et al., 1994: 4935; Chu et al., 1999: 1896; Kanegane et Tosato, 1996: 230; Lodolce et al., 1998: 669; Wilkinson et al., 1995: 1255.
Monocyte	Sécrétion des chimioattractants IL-8, MCP-1.	Musso et al., 1999: 3531.
Macrophage	Faible concentration d'IL-15: diminution de la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α . Forte concentration d'IL-15: augmentation de la production de ces mêmes médiateurs.	Alleva et al., 1997: 2941.
Cellules NK	Maturation, différenciation et prolifération, production de cytokines (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α) et de chimiokines (MIP-1 α et-1 β). Permet d'effectuer la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). Si co-stimulé avec l'IL-12, production d'inhibiteurs de la réplication du virus d'immunodéficience humaine <i>in vitro</i> .	Carson et al., 1994: 1395; Fehniger, Carson et Calleg, 1999: 1476; Fehniger et al, 1999: 4511; Fehniger et al., 2000: 1643; Mrozek et al., 1996: 2632; Robertson et al., 1990: 2421; Ross et Caligiuri, 1997: 910; Yu et al., 1998: 3647.
Mastocyte	Retarde l'apoptose et augmente la production de l'IL-4 chez les souris, aucune confirmation encore chez l'humain.	Masuda et al., 2000: 29331; Masuda et al., 2001: 26107.
Neutrophile	Voir section suivante.	

Tableau 10. Effet de l'IL-15 sur les cellules du système immunitaire.

Malgré ces rôles importants, les souris transgéniques déficientes en IL-15 sont viables et ne présentent pas de déficience aux muscles, aux vaisseaux sanguins ou aux os. Cependant, ces souris ne possèdent pas de cellules NK, ont une déficience en cellules mémoires CD8+, ont une diminution du nombre de cellules de certains sous-types de cellules T et ont une diminution du poids et de

la cellularité des ganglions périphériques. (Kennedy et al., 2000 : 771; Loldolce et al., 1998 : 669)

4.3.2 Les effets sur le neutrophile humain

Les neutrophiles possèdent le récepteur classique de l'IL-15 (Djeu et al., 1993 : 960 ; Girard et al., 1998 : 232 ; Liu et al., 1994 : 3870 ; Nakarai et al., 1994 : 241) et possiblement une chaîne de récepteur X puisqu'une liaison de l'IL-15 à son récepteur sur les neutrophiles entraîne une activation de la kinase Jak2 (Pelletier, Rathé et Girard, 2002 : 164). L'IL-15 module plusieurs fonctions des neutrophiles. Elle augmente leur phagocytose, augmente leur synthèse de protéines et d'ARN *de novo*, elle retarde leur apoptose spontanée (Girard et al., 1996 : 3176), elle augmente leur production d'IL-8 (McDonald et al., 1998 : 4828), et elle augmente leur capacité à inhiber la croissance de *Candida albicans* (Musso et al., 1998 : 2640). L'IL-15 ne semble cependant pas nécessaire à la maturation des neutrophiles (Kennedy et al., 2000 : 771 ; Lodolce et al., 1998 : 669).

4.4 Rôle thérapeutique de l'IL-15

L'interleukine-15, lorsque surexprimée, possède des effets néfastes sur l'organisme qui se traduisent par des maladies. Par contre, cette cytokine augmente les fonctions de plusieurs cellules du système immunitaire et plusieurs évidences nous portent à croire qu'il serait très intéressant de pouvoir développer une immunothérapie avec l'interleukine-15, tant dans les cas de cancers que pour les transplantations ou encore pour certains vaccins. (Azzarone et al., 1996 : 27 ; Ferrini, Azzarone et Jasmin, 1996 : 656 ; Gamero et al., 1995 : 4988)

4.4.1 Rôle dans les maladies

Plusieurs maladies sont caractérisées par une quantité excessive ou un manque d'IL-15. D'autres sont reliées à une mauvaise réponse de la part de la cellule cible soit à cause d'une déficience ou d'une trop grande sensibilité du récepteur. Comme cette cytokine agit sur plusieurs types cellulaires, les catégories de maladies auxquelles l'interleukine-15 est associée sont variées.

4.4.1.1 Les maladies inflammatoires

L'interleukine-15 joue un rôle dans plusieurs maladies inflammatoires (Kirman, Vainer et Nielsen, 1998 : 285). Tout d'abord, elle joue un rôle dans l'arthrite rhumatoïde en étant surexprimée dans les articulations des patients atteints (Harada et al., 1999 : 1508 ; McInnes, et al., 1996 : 175). Ces articulations comportent aussi un nombre anormalement élevé de cellules T, de neutrophiles, de cytokines proinflammatoires (IL- α , β , IL-6, TNF- α , β) et de chimioattractants (IL-15, IL-8, MCP-1, MIP-1 α). Comme l'IL-15 est chimioattractante pour les cellules T, elle contribuerait au maintien de la population de ces cellules dans l'articulation. L'interleukine-15 augmente aussi la production de TNF- α des cellules T (McInnes et al., 1997 : 189). De plus, comme elle retarde l'apoptose des neutrophiles et augmente leur production d'IL-8, elle assurerait la survie des neutrophiles et le constant renouvellement de cette population, ainsi que l'attraction d'autres types de cellules inflammatoires. L'IL-15 induit aussi la production de l'IL-17, qui augmente le relâchement d'IL-6, IL-8, de GM-CSF et de PGE2 par les synoviocytes, ce qui contribue à l'inflammation (Ziolkowska et al., 2000 : 2832).

L'IL-15 est aussi présente dans la sarcoïdose où elle joue aussi un rôle d'activateur de la prolifération des cellules T (Agostini et al., 1996 : 1115). Dans le cas des inflammations chroniques de l'intestin, soit la colite ulcéreuse et la

maladie de Crohn, on retrouve un pourcentage élevé de cellules mononucléaires périphériques du sang (PBMC) exprimant l'IL-15 (Kirman et Nielsen, 1996 : 1789). Cette cytokine est aussi détectée abondamment dans le sérum, les biopsies et les fluides locaux des patients atteints de ces maladies comparativement aux individus sains (Lui et al., 2000 : 331 ; Sakai et al., 1998 : 1237).

L'IL-15 est aussi associée à la maladie chronique du foie causée par l'hépatite C. Des taux élevés d'IL-15 ont été détectés chez ces patients ainsi que chez les patients atteints d'hépatocarcinome (Kakumu et al., 1997 : 458). Les traitements sont accompagnés par une réduction du niveau d'IL-15. Du côté de la sclérose en plaque, on retrouve un taux élevé de monocytes exprimant l'ARN messager de l'IL-15 (Kivisakk et al., 1998 : 193). De plus le niveau d'IL-15 est plus bas chez les patients en rémission. (Pashenkov et al., 1999 : 302). L'interleukine-15 contribuerait donc aux maladies inflammatoires en augmentant et en permettant la persistance de l'inflammation.

4.4.1.2 Le rejet de greffe

Les cytokines s'associent au rejet de greffe en permettant l'infiltration et l'activation de cellules immunitaires dans les organes greffés. L'IL-15 est présente en plus grande quantité dans les greffes rénales rejetées, comparées à celles qui ne le sont pas (Pavlakakis et al., 1996 : 543). Dans ce cas, l'IL-15 contribuerait à la prolifération des cellules T (van Gelder et al., 1998 : 405). Des études démontrent que l'IL-15 pourrait jouer le même rôle dans les greffes du cœur (Baan et al., 1999 : 2726). La chaîne γc serait principalement visée puisque les autres cytokines utilisant cette chaîne sont aussi liées au rejet des greffes du cœur. De plus, il a été démontré, lors d'expériences effectuées chez la souris, que le blocage de cette chaîne, entraîne une prolongation de la survie de la greffe (Li et al., 1998 : 890). Le blocage de la chaîne IL-15R α par un anticorps

soluble contre celle-ci augmente aussi à un certain point la survie de la greffe (Smith et al., 2000 : 3444).

4.4.1.3 Le cancer

Durant la leucémie engendrée par le virus HTLV-1, la transcription du gène de l'IL-15 est activée par une protéine virale nommée Tax via un site NF- κ B (Azimi et al., 1998 : 2452). De plus, cette protéine active aussi l'expression du gène de la chaîne IL-15R α (Mariner et al., 2001 : 2602). Il n'est cependant pas encore clair de quelle façon l'IL-15 participe à la progression de la maladie. De plus, l'IL-15 agit possiblement dans le lymphome cutané des cellules T en permettant la croissance et la survie de ces cellules. (Dobbeling et al., 1998 : 252). L'interleukine-15 favorise aussi la maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires. Il a été démontré que des cellules isolées des patients atteints de ce désordre possédaient le récepteur classique de l'IL-15 (chaînes α , β et γ) et proliféraient en réponse à la cytokine (Zambello et al., 1997 : 201). Dans ce cas, l'IL-15 serait liée à la surface des cellules. Finalement, l'IL-15 induit la prolifération des cellules B issues de la leucémie lymphocytaire et de la leucémie des trypholeucocytes (Trentin et al., 1996 : 3327). L'interleukine-15 aiderait aussi à la propagation du mélanome multiple qui exprime le récepteur de l'IL-15, en produit et a accès à une régulation autocrine (Tinhofer et al., 2000 : 610).

4.4.1.4 Les maladies infectieuses

Les niveaux d'IL-15 sont aussi élevés chez les patients atteints de maladies causées par le virus HTLV-1 (Azimi et al., 1999 : 4064). On en retrouve aussi de grandes quantités chez les patients atteints de mélioidose, une maladie causée par la bactérie *Burkholderia pseudomallei* (Lauw et al., 1999 : 1878). De plus, une augmentation de l'activité des cellules NK dépendante de l'interleukine-

15 a été détectée dans les infections aux virus de l'herpès humain de type 6 (HHV-6) et de type 7 (HHV-7), ainsi qu'au virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) et au virus d'Epstein-Barr (EBV) (Atedzoe et al., 1997 : 4966 ; Flamand et al., 1996 : 1373 ; Gosselin et al., 1999 : 4210).

4.4.2 Potentiel thérapeutique

L'IL-15 possède des fonctions qui lui sont spécifiques et des fonctions qui sont partagées avec l'IL-2. Par contre, dans certaines fonctions, l'IL-15 est plus efficace que l'IL-2, donc une immunothérapie utilisant cette cytokine pourrait s'avérer très intéressante. L'IL-15 s'accumule aussi plus efficacement que l'IL-2 dans la moelle osseuse lorsque administrée de façon intraveineuse (Kobayashi et al., 2000 : 3577). Compte tenu de l'activité de l'IL-15 sur les cellules NK, il est possible que des doses d'IL-15 puissent augmenter l'activité et la survie des NK ainsi que leur production de cytokines. Ces fonctions pourraient être utiles dans le traitement des cas de cancer, soit par l'injection d'IL-15 seule ou par l'injection d'une combinaison de cytokines. Les cellules T CD8⁺ sont aussi très efficaces pour éliminer les cellules transformées et puisque l'IL-15 permet leur survie, cette cytokine pourrait être avantageusement utilisée. Finalement, l'IL-15 pourrait être utilisée afin d'augmenter les fonctions des toutes les cellules qui répondent à cette cytokine. Par exemple, l'IL-15 augmente la survie des cellules T issues de transplantation de cellules progénitrices du sang périphérique qui sont généralement très susceptibles à l'apoptose spontanée (Rutella, S. et al., 2001 : 1503). La toxicité de cette cytokine demeure cependant toujours à déterminer. En plus de la thérapie avec la cytokine même, des anticorps contre les chaînes du récepteur de l'IL-15 ou des agents bloquants contre la cytokine pourraient être utilisés afin de contrer les effets néfastes d'une surproduction d'IL-15.

Certaines combinaisons de cytokines, lorsqu'utilisées conjointement à des vaccins permettent une meilleure réponse du système immunitaire et une

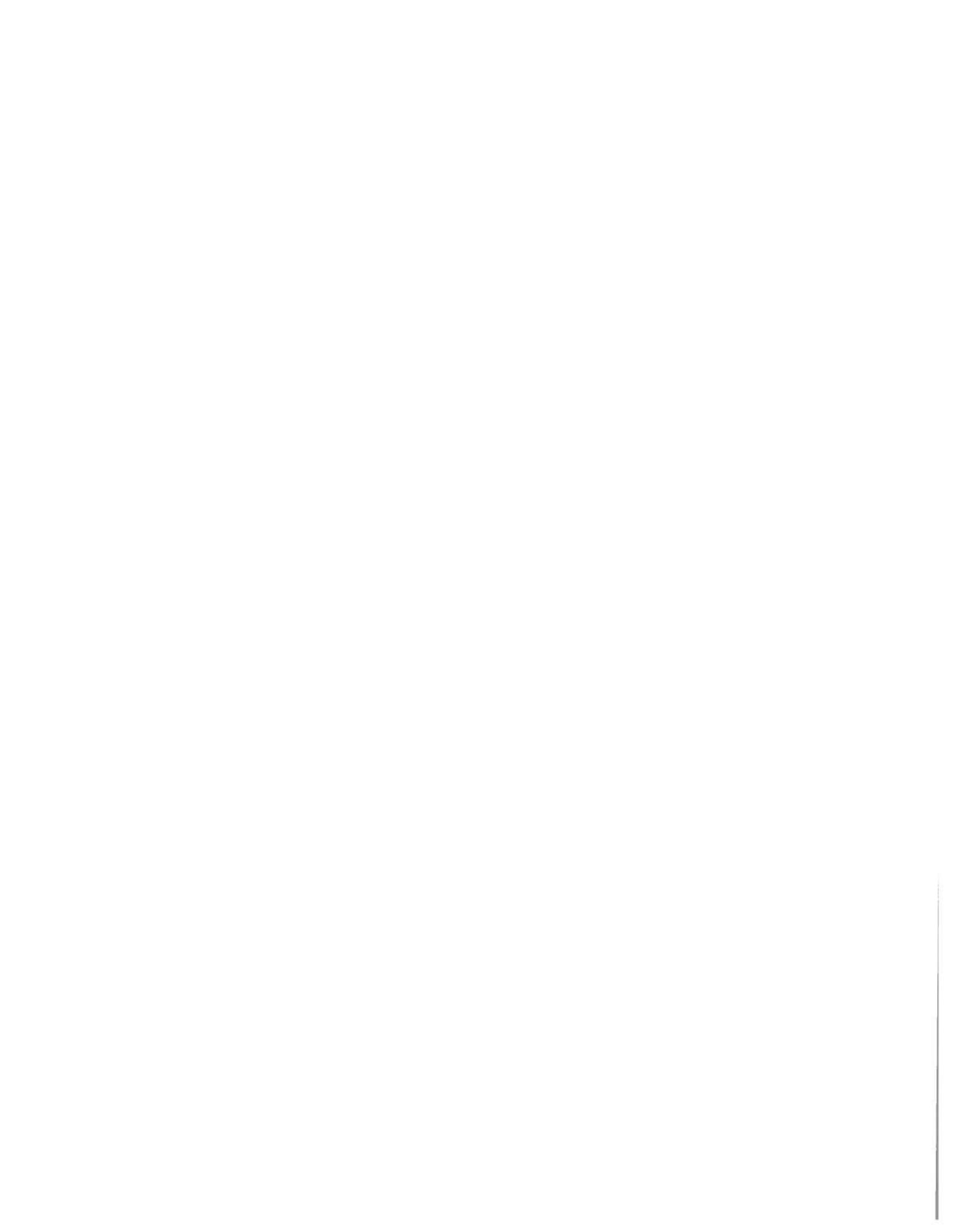
protection accrue contre le pathogène visé (Scheerlinck et al. 2001 : 4053). De plus, il existe une technologie qui utilise des antigènes tumoraux afin de vacciner l'organisme et de tenter d'obtenir de sa part une réaction immunologique contre le cancer. La réponse de l'organisme est augmentée lorsque ces vaccins sont donnés en combinaison à une forte dose d'IL-2 (Rosengerg, 2001 : 380). Puisque l'IL-15 a un rôle à jouer dans l'activation des cellules NK et la survie des cellules T CD8⁺ mémoires, on peut penser que l'administration conjointe de cette cytokine et des vaccins anti-tumoraux pourrait augmenter la réponse du système immunitaire.

Jusqu'à maintenant, les essais de thérapies avec l'IL-15 sont encore à des stades pré-cliniques et cette cytokine n'a pas encore été administrée à des humains. Cependant, plusieurs études démontrent que l'interleukine-15 serait un bon candidat pour le traitement du cancer, par exemple, par l'expansion exogène de populations NK et des cellules mémoires CD8⁺. Plusieurs études ont été effectuées chez les souris. L'administration exogène d'IL-15 permet l'expansion des cellules NK in vivo (Munger et al., 1995 : 289; Evans et al., 1997 : 66) ainsi que l'expansion des cellules CD8⁺ mémoires, ce qui amène une résistance accrue aux infections virales et parasitiques (Zhang et al., 1998 : 591; Lee et al., 1999 : 299). De plus, les souris transgéniques surexprimant l'IL-15 ont une plus grande capacité à générer des cellules T CD8⁺ mémoires suite à une infection avec *Listeria monocytogenes* (Yajima et al., 2002 : 1198). Ces souris ont aussi une augmentation de la réponse au *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin suite à une augmentation des cellules NK et de la réponse cytotoxique (Unemura et al., 2001 : 946). Plusieurs éléments pouvant bloquer l'action de l'IL-15 ont été utilisés chez la souris. Un anticorps contre la chaîne IL-15R α a été développé (Ruchatz et al., 1998 : 5654) et semble améliorer l'arthrite induite par le collagène. Une autre équipe (Khan et al., 2002 : 1463) a utilisé le même type d'anticorps et a bloqué la réponse immunitaire au parasite *Toxoplasma gondii*. Un antagoniste de l'IL-15 (Kim et al., 1998 : 5742) a aussi été mis au point et un sérum polyclonal neutralisant (Fehniger et al., 2000 : 1643) diminue les réactions

d'hypersensibilité. Finalement, un anticorps humanisé contre la chaîne β du récepteur de l'IL-15 et de l'IL-2 augmente la survie des greffes autologues du cœur (Tinubu et al., 1994 : 4330).

Bref, en administrant l'interleukine-15, on peut induire la prolifération de cellules activées par cette cytokine et permettre une meilleure réponse immunitaire à des cancers ou des syndromes d'immunodéficience. En la bloquant, on peut diminuer son effet et contrer des maladies inflammatoires, des rejets de greffe et des cancers. Cependant, peu importe la cytokine visée, il faut toujours garder en tête qu'il existe une ligne très mince entre une dose thérapeutique et une dose d'excès qui entraîne des pathologies.

SECTION 2 : ARTICLES



Article 1

Titre

Role of interleukin-15 receptor (IL-15R) components and Syk activation in IL-15-induced human neutrophils.

Auteurs

Claude Ratthé et Denis Girard.

Soumis à la revue

Journal of Immunology

Contribution personnelle

Cet article contient les résultats principaux qui ont permis de tirer les conclusions de mon projet de maîtrise. J'en suis l'auteure principale et j'ai effectué toutes les expériences décrites dans l'article. J'ai aussi participé à la planification des expériences, à l'élaboration des protocoles et à la correction du manuscrit. J'ai participé aux analyses statistiques et aux analyses des résultats.

Contribution du coauteur

Le Dr. Girard a mis en structure le cœur du projet, a participé à la planification des expériences, à l'élaboration de protocoles et a supervisé toutes les expériences. Il a aussi rédigé le manuscrit et effectué des analyses statistiques et des analyses de résultats.

1.1 Résumé en français de l'article 1

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine qui possède un potentiel thérapeutique intéressant. Toutefois, l'IL-15 est aussi une cytokine pro-inflammatoire qui active les neutrophiles. Les mécanismes d'activation des neutrophiles par l'IL-15 ne sont pas encore bien compris. Même si ces cellules sont reconnues pour exprimer un récepteur fonctionnel de l'IL-15 (IL-15R) composé des chaînes IL-15R α , IL-2/15R β , et γ_c , le rôle de chacune des composantes du récepteur n'a jamais été élucidé dans l'action de l'IL-15 sur les neutrophiles. Dans la présente étude, des analyses de cytométrie en flux révèlent que la capacité de l'IL-15 à augmenter la phagocytose des neutrophiles et retarder leur apoptose n'est pas due à une augmentation de l'expression de IL-15R α , IL-2/15R β (CD122) et γ_c (CD132) à la surface des neutrophiles. Un pré-traitement des neutrophiles avec des anticorps spécifiques à IL-15R α , CD122 ou CD132 inhibe la phagocytose des globules rouges de moutons opsonisés de 40, 21 et 27% respectivement. Comme prévu, le pré-traitement des neutrophiles avec un anti-IL-2R α (CD25) n'a eu aucun effet. En utilisant une approche similaire pour étudier le rôle de chaque composante du IL-15R dans l'apoptose, il a été démontré que les anticorps contre IL-15R α et IL-2R α (isotype IgG₁) peuvent retarder l'apoptose peu importe que l'IL-15 soit ajoutée à la culture ou non. Cependant, les anticorps dirigés contre CD122 (IgG_{2a}) ou CD132 (IgG_{2b}) n'ont aucun effet. Ces résultats sont en accord avec la liaison préférentielle des récepteurs Fc aux IgG₁ comparée aux IgG₂. Un pré-traitement des neutrophiles avec l'inhibiteur de Syk piceatannol inhibe de façon significative l'augmentation de la phagocytose induite par l'IL-15. De plus, l'IL-15 induit la phosphorylation de Syk et celle-ci est inhibée par un pré-traitement des cellules avec le piceatannol. L'effet de l'IL-15 sur l'apoptose est aussi renversé par le piceatannol et les anticorps de type IgG₁, mais non IgG₂ induisent la phosphorylation de Syk. Finalement, la protéine Syk s'associe physiquement avec la chaîne IL-15R α et cette association est augmentée par l'IL-15. Nous concluons que IL-15R α joue un rôle important dans l'augmentation de la phagocytose induite par l'IL-15. De

plus, l'IL-15 induit la phosphorylation de Syk qui s'associe avec l'IL-15R α . Finalement, la cascade de signalisation induite par Syk permet la modulation de la phagocytose des neutrophiles, mais aussi de la suppression de l'apoptose induite par les anticorps.

1.2 Texte original de l'article 1

Role of interleukin-15 receptor (IL-15R) components and Syk activation in IL-15-induced human neutrophils¹.

Claude Ratthé and Denis Girard*

From INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, PQ, Canada.

*Correspondence to: Dr Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier
245 boul. Hymus, Pointe-Claire (PQ), Canada, H9R 1G6.
Tel/Fax: (514) 630-8847/8850.
e-mail: Denis.Girard@INRS-iaf.Uquebec.ca

Keywords: Neutrophils, cytokine receptor, inflammation, apoptosis, phagocytosis

¹*This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (MOP-89534) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CR holds a M.Sc. FRSQ-FCAR-Santé award and DG is a Scholar from FRSQ.*

ABSTRACT

Interleukin-15 (IL-15) is a cytokine that possesses interesting potential therapeutic properties. However, based on several parameters, including activation of neutrophils, it is also recognized as a pro-inflammatory cytokine. The mechanisms by which IL-15 activates human neutrophil functions are not fully understood. Although these cells express a functional IL-15 receptor (IL-15R) composed of IL-15R α , IL-2/15R β (CD122) and γ c (CD132) subunits, the role of each receptor component has not been investigated in IL-15-induced human neutrophils. In the present study, FACS analysis revealed that the ability of IL-15 to induce neutrophil phagocytosis and suppress apoptosis is not due to increased expression of IL-15R α , CD122 or CD132 on the neutrophil cell surface. Pre-treatment of neutrophils with specific antibodies to either IL-15R α , CD122, or CD132 was found to inhibit phagocytosis of opsonized-sheep red blood cells (SRBC) by nearly 40, 21, and 27%, respectively. As expected, pre-treatment of neutrophils with anti-IL-2R α (CD25) had no effect. This strategy was ineffective for studying the role of the IL-15R components during apoptosis since antibodies of the IgG₁ isotype (anti-IL-15-R α and IL-2R α) were found to inhibit apoptosis whether or not IL-15 was added in the culture, whereas those directed against CD122 (IgG_{2a}) or CD132 (IgG_{2b}) did not alter the response. Pre-treatment of cells with the Syk inhibitor piceatannol was found to significantly inhibit IL-15-induced phagocytosis. In addition, IL-15 was found to induce tyrosine phosphorylation of Syk that was largely inhibited by pre-treating cells with piceatannol. Moreover, we found that Syk kinase is associated with IL-15R α . The ability of IL-15 to delay neutrophil apoptosis was inhibited by piceatannol and the antibodies of the IgG₁ isotype, but not IgG₂, were found to induce Syk phosphorylation. We conclude that IL-15R α is highly involved in IL-15-induced phagocytosis, that IL-15 induces tyrosine phosphorylation of Syk and that Syk is associated with IL-15R α .

INTRODUCTION

Interleukin-15 (IL-15)¹ is a cytokine known to mediate its biological activity by binding to a specific cell surface receptor composed of at least three subunits, named γ c (CD132), IL-2/IL-15R β (CD122), and the more recently identified IL-15R α (1). The γ c chain is shared by other receptors such as IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R and IL-21 (2-5). In addition to the γ c chain, both the IL-2R and IL-15R share the IL-2R β subunit. This largely explains why these two cytokines possess some redundant biological actions (6,7).

IL-15 is a human neutrophil agonist known to induce RNA and *de novo* protein synthesis, phagocytosis, and to delay apoptosis (8). Neutrophils are known to express a high affinity IL-15R (composed of CD122, CD132 and IL-15R α subunits), and an IL-2R of intermediate affinity, which is lacking one component, namely, the IL-2R α (CD25) (9-11). IL-15, unlike IL-2, was also found to induce the production of the potent neutrophil chemoattractant IL-8 and the activation of NF- κ B (12). In addition, we have reported that the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I, which is a potent inhibitor of protein synthesis, did not alter IL-15-induced phagocytosis, suggesting that this biological activity of IL-15 is independent of the production of proteins (13). Inversely, this lectin was found to completely inhibit the ability of IL-15 to delay neutrophil apoptosis (13). Conversely, IL-15 was found to induce the production of IL-1 receptor antagonist (14). Although it was previously demonstrated that IL-15 is a human neutrophil agonist, its mode of action remains to be elucidated. We have recently demonstrated that the anti-apoptotic Mcl-1 protein is involved in IL-15-induced human neutrophil apoptosis and that IL-15 utilizes different cell signaling pathways, since this cytokine activates Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2, but not STAT-5a/b (15). The mechanism involved in IL-15-induced phagocytosis has not been investigated. It is of great importance to elucidate the induction of phagocytosis by IL-15, since this cytokine, like IL-2, possesses interesting potential therapeutic properties for humans, especially in advanced cancers (16-18). The use of IL-15

in cancer therapy offers a potential beneficial effect because it can induce phagocytosis (8), an important response that could, at least, partly prevent recurrent infections following cytokine treatment. Because IL-15, but not IL-2, is known to enhance neutrophil phagocytosis and apoptosis (8,19), and since neutrophils express two chains common to IL-2R and IL-15R (CD122 and CD132) and the specific IL-15R α , but not the IL-2R α chain (CD25), we hypothesized that the IL-15R α chain must be highly involved in the biological effects mediated by IL-15. In this study, we demonstrate that the ability of IL-15 to mediate its effect is not due to an increase of cell surface expression of IL-15R α , CD122 or CD132. In addition, inhibition experiments with antibodies reveal that IL-15R α is an important component involved in IL-15-induced neutrophils and that this cytokine recruits Syk when inducing its biological effect. Moreover, we found that Syk is associated with IL-15R α .

¹**Abbreviations used:** IL-15, interleukin-15; R, receptor; SRBC, sheep red blood cells

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and agonists. IL-15 was obtained from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ) and the Syk inhibitor piceatannol was purchased from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO). Specific mouse antibodies to human IL-2/IL-15R β (CD122, IgG_{2a} isotype), IL-2R α (CD25, IgG₁) and rat anti-human γ c (CD132, IgG_{2b}), were purchased from PharMingen Canada. The anti-IL-15R α (clone M161, IgG₁), was kindly provided by Genmab (Utrecht, Netherlands) and, for immunoprecipitation experiments, the goat anti-human IL-15R α antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Fluorescein (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG, F(ab')₂ fragment specific and FITC-conjugated affiniPure F(ab')₂ donkey anti-rat IgG (H+L) were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA). Tris-HCL, NaCl, Triton X-100 and SDS were purchased from Fisher Scientific (Whitby, ON). Orthovanadate, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), aprotinin, leupeptin and pepstatin were purchased from Sigma (St-Louis, MO) and trypsin inhibitor was from Calbiochem (Pasadena, CA).

Neutrophil isolation. Cells were isolated from the venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc, QC), as previously described (8-10). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability (>98%) was monitored by Trypan blue exclusion and the purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by the Hema 3 Stain Set (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ).

Cell surface expression of IL-15R subunits. Following the incubation period, cells were suspended at 10⁷ cells/ml, washed and pre-incubated 30 min (4°C, light protected) with 20% autologous serum to prevent non-specific binding via Fc receptors. Cells (10⁶ cells/ml) were then washed and incubated with the different antibodies (5 μ g/mL) for 1h (4 °C, light protected). After two additional washes,

cells were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (1:100). Cells were then washed and fixed with 0.5% paraformaldehyde. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson).

Phagocytosis of sheep erythrocytes. Sheep red blood cells were opsonized with a final 1/200 dilution of rabbit IgG anti-SRBCs antibody (Sigma) followed by incubation for 45 min at 37 °C as previously described (8). Prior to the phagocytosis assay, neutrophils were incubated 30 min with 1 µg/ml of anti-CD25, -CD22, -CD132 or -IL-15R α to evaluate a potential inhibitory effect. This was based on previous experiments performed with increasing concentrations of antibodies (0-10 µg/ml) incubated simultaneously or prior to addition of IL-15 (data not shown). Neutrophils (10^7 cells/ml in RPMI-1640) pretreated 30 min with buffer or IL-15 (250 ng/ml), were incubated with 5×10^7 opsonized SRBCs for 45 min as above. The samples were centrifuged 200 x g at 4°C for 10 min. Supernatants were discarded and, in order to eliminate non-ingested SRBCs, osmotic shock was performed on the pellets by treating them with 300 µl H₂O for 20 seconds followed immediately by the addition of 4.5 ml ice cold PBS (1X). The samples were washed twice with ice cold PBS and the final pellets were suspended to a final concentration of 10^7 cells/ml. Duplicate cytocentrifuged preparations (Cyto-tek® centrifuge, Miles Scientific, IN, USA) were prepared in aliquots of ~200 µl and processed essentially as previously documented (8). Phagocytosis was measured as percentage of neutrophils ingesting at least one opsonized SRBC. IL-15 could be considered as a positive control in the present set of experiments since we have previously reported that this cytokine can increase neutrophil phagocytosis in a concentration-dependent fashion (8). In some experiments, cells were pre-treated 30 min (37 °C) with increasing concentrations of piceatannol (10-100 µM).

Assessment of neutrophil apoptosis. Freshly isolated human neutrophils (10^7 cells/ml in RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum) were pre-incubated for 60 min in 24-well plates in the presence or absence of the indicated

antibody or an increasing concentration of the Syk inhibitor piceatannol and then incubated for 23h in the presence or absence of 250 ng/ml IL-15 (8). Antibodies or piceatannol remained in the culture. Apoptosis was evaluated by cytology as previously published (8). Briefly, cytocentrifuged preparations of neutrophils (with ~200 μ l) were performed using a Cyto-tek® centrifuge and processed essentially as previously documented (8). Cells were examined by light microscopy at 400 X final magnification and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristic darkly stained pyknotic nuclei. Results were expressed as percentage of apoptotic cells. This assay was found to correlate well with other techniques such as FITC-annexin-V/PI binding (13,20), cell surface CD16 expression (21) and PI/Hoechst binding (8). In the present study, we confirmed the apoptotic rate of neutrophils by flow cytometry and observed that the percentage of FITC-annexin-V positive cells was significantly diminished in cells treated with IL-15 (34 ± 6) or GM-CSF (35 ± 4) when compared to untreated cells (69 ± 4) (mean \pm SEM, n=5) (*not shown*).

Western blot. Neutrophils (4×10^7 cells/mL RPMI-Hepes-P/S) were stimulated from 15 sec to 30 min with the indicated agonists. Whole cell lysates were prepared as previously described (8). Proteins ($2,5 \times 10^7$ cells/well) were separated on 7.5 % SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked for 1h at room temperature in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk (Carnation, Don Mills, ON). After washing, the anti-phosphospecific Syk antibody (#2711, New England Biolabs) or the antibody directed against the nonphosphorylated form of Syk (SC-1240, clone 4D10, Santa Cruz Biotechnology) was added at a final dilution of 1:1000 or 1:400, respectively, in TBS-Tween + 5% bovine serum albumin or TBS-Tween + 5% nonfat dry milk. The membranes were kept overnight at 4°C. Membranes were then washed with TBS-Tween and incubated for 1h at room temperature with a goat anti-rabbit-horseradish peroxidase secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:20,000 in TBS-Tween + 5% bovine serum albumin or a goat anti-mouse-horseradish peroxidase secondary antibody (Jackson

ImmunoResearch Laboratories) at 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk followed by washes. The Syk protein expression was revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection system as previously published (15).

Immunoprecipitation. Neutrophils (4×10^7 cells/ml) were untreated or stimulated with IL-15 for the indicated time, centrifuged and lysed in 400 μ l of a non-denaturing lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.01 % SDS, 1 mM orthovanadate, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml trypsin inhibitor, and 10 μ g/ml of aprotinin, leupeptin and pepstatin) for 1 h on ice and sonicated three times. The lysates and supernatants were pre-cleared using 40 μ l of protein G-Sepharose (Amersham Biosciences Inc.). After 1 h, brief centrifugation followed to remove the Sepharose beads and the samples were incubated with 2 μ g/ml of goat anti-human IL-15R α at 4°C with gentle agitation overnight at 4°C. 40 μ l of protein G-Sepharose were then added for a further 3 h incubation. The solid matrix was collected and washed three times with lysis buffer before suspending it in 35 μ l of sample buffer and heating to 100°C for 5 min. Immunoprecipitates were electrophoresed on a 7.5 % SDS-polyacrylamide gel, transferred on a nitrocellulose membrane, incubated with the anti-Syk antibody followed by two washes with TBS-Tween and then incubated with the goat anti-mouse-horseradish peroxidase secondary antibody, according to previously described protocols.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with SigmaStat for Windows Version 2.0 with a one-way analysis of variance (ANOVA) or Student t-test. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

IL-15 does not increase neutrophil cell surface expression of IL-15R α , CD122 or CD132. Because IL-15 is known to modulate neutrophil phagocytosis and apoptosis and that these cells express the three IL-15R components IL-15R α , CD122 and CD132 on their surface, we decided to investigate the potential increase in expression of one or more of these IL-15R components. As illustrated in **Fig. 1**, treatment with IL-15 for 30 min (time point corresponding to the phagocytosis assay) or 24h (corresponding to the apoptosis assay) did not increase the expression of any IL-15R subunit. The diminution of expression of CD122 and IL-15R α subunits after 30 min of treatment corresponds with the internalization of IL-15R following IL-15 binding (22). Of note, we have performed time course experiments and have never observed a significant modulation of any chain after 15 min, 30 min, 2h, 4h, 6h and 24h (data not shown). This indicates that IL-15 does not increase the ability of neutrophils to stimulate phagocytosis or delay apoptosis by up-regulating IL-15R components.

Involvement of IL-15R components in IL-15-induced neutrophils. We have previously documented that IL-15 increases the ability of human neutrophils to ingest opsonized-SRBC (8). Here we were interested in investigating the role of each IL-15R component in this biological response. As illustrated in **Fig. 2**, pre-incubation of neutrophils with an antibody to IL-15R α , CD122, or CD132 was found to inhibit phagocytosis of opsonized-SRBC by nearly 40, 21, and 27%, respectively. This indicates that IL-15R α is highly involved in IL-15-induced phagocytosis. Pre-incubation with an anti-CD25 antibody did not block the ability of IL-15 to induce phagocytosis, consistent with the fact that human neutrophils do not express the IL-2R α chain on their cell surface (8,11). We decided to use the same approach to study the role of the IL-15R components during IL-15-induced suppression of apoptosis. As illustrated in **Fig. 3**, the ability of the anti-IL-15R α antibody to reverse the effect of IL-15 is explained by the fact that addition of the antibody alone can suppress neutrophil apoptosis by 55%. This was not observed with the antibodies to CD122 or CD132. When anti-CD25 was used as

a potential negative control that would not block the effect of IL-15, we found that the antibody was also able to delay neutrophil apoptosis. We correlated this observation with the fact that antibodies that delay neutrophil apoptosis are of the IgG₁ isotype (anti-IL-15R α and anti-CD25) whereas those having no effect are of the IgG₂ isotype (anti-CD122 and anti-CD132). We confirmed this by using another antibody of the IgG₁ isotype directed against the proto-oncogene Cbl that was also found to delay neutrophil apoptosis when added to the culture (*data not shown*).

The Syk inhibitor piceatannol reverses the ability of IL-15 to induce phagocytosis and delay apoptosis. Because activation of Syk is required to initiate the signaling events during neutrophil phagocytosis (23,24), we decided to investigate the potential role of Syk in IL-15-induced phagocytosis of opsonized-SRBC. As illustrated in **Fig. 4**, pre-treatment of neutrophils with the Syk inhibitor piceatannol results in an inhibition of phagocytosis by ~42%, when used in concentration of 10 μ M. The use of higher concentrations of the inhibitor did not result in a greater inhibition. In fact, the inhibition was 17% and 7% for concentrations of piceatannol of 50 and 100 μ M, respectively. This indicated that the optimal concentration of the Syk inhibitor is in the range of 10 μ M, agreeing with other studies (25,26). Using the same approach, we decided to determine whether or not Syk was involved in IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis. As illustrated in **Fig. 5**, piceatannol had little effect on IL-15 activity when used at a concentration of 10 or 50 μ M, but largely inhibited the response when used at a concentration of 100 μ M (13.3 ± 2.7 vs 27.6 ± 5.6 for a concentration of 0 and 100 μ M, respectively). This opens the possibility that candidates other than Syk may be inhibited by a high concentration of piceatannol, as recently documented (27).

IL-15 induces tyrosine phosphorylation of Syk. Because tyrosine phosphorylation of Syk is known to be a key factor in Fc-mediated phagocytosis, we next investigated the potential activation of this protein by IL-15. As illustrated

in **Fig. 6A**, IL-15 rapidly induces Syk phosphorylation with a maximal effect ranging between 30 sec and 1 min, starts to decline after 15 min. This correlates with our previous results indicating that IL-15 induces rapid tyrosine phosphorylation events in human neutrophils, as assessed by immunoblotting with a pan anti-phosphotyrosine antibody (15). To further demonstrate the involvement of Syk in IL-15-induced neutrophils, we pre-treated cells with 10 μ M piceatannol and observed a marked decrease of Syk phosphorylation (**Fig. 6B**).

Syk is physically associated with IL-15R α in human neutrophils. With respect to the previous results indicating that IL-15 can activate Syk kinase and because it was recently reported that the IL-15R α subunit can induce cell signaling through association with Syk in human B cells (28), we hypothesized that Syk is associated with IL-15R α in human neutrophils. As illustrated in **Fig. 7**, Syk was detected following immunoprecipitation with the anti-IL-15R α antibody. Furthermore, the association was increased following activation of cells by IL-15, suggesting that even if Syk is constitutively activated or non-specifically activated (due to cell isolation procedures) its level of activation is further increased by IL-15, as well as is its association with IL-15R α .

Activation of Syk by anti-IL-15R α and other antibodies. Because anti-IL-15R α was found to delay neutrophil apoptosis and that addition of the Syk inhibitor to the culture was found to reverse this effect, we decided to study whether or not this antibody could activate Syk. Results of **Fig. 8** indicate that the antibody effectively induces Syk phosphorylation, similar to IL-15. However, this was not specific to this antibody, since treatment of neutrophils with anti-CD25 (IgG₁) was also found to induce Syk phosphorylation in contrast to the anti-CD122 and anti-CD132 antibodies (both IgG₂) (**Fig. 9**). Of note, addition of the anti-CD25 antibody to neutrophil cultures also inhibited spontaneous apoptosis (Inset, **Fig. 9**).

DISCUSSION

There is a growing body of evidence that IL-15 possesses interesting potential therapeutic uses, especially in cancer (29,30). Under normal circumstances, IL-15 production and release is tightly regulated (31). When deregulation occurs, over-production of IL-15 is associated with various diseases, including inflammatory disorders (32). In this regard, high concentrations of IL-15 have been detected in the synovial fluid and in synovial membrane cells of rheumatoid arthritis patients (33-36). Also, elevated levels of IL-15 have been demonstrated in peripheral blood mononuclear cells from patients with active ulcerative colitis, in alveolar macrophages from patients with active sarcoidosis and in chronic hepatitis C (37-40).

Despite the fact that IL-15 is a pro-inflammatory cytokine and that neutrophils could be activated by it, there is little information concerning its mode of action on these cells. We have recently demonstrated that IL-15 delays neutrophil apoptosis by preventing the loss of expression of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and via several kinases including Jak-2, p38 and ERK-1/2 (15).

Prior to the present study, no data was available concerning the participation of the different IL-15R subunits in IL-15-induced neutrophils as well as the mechanism by which IL-15 increases the ability of neutrophils to exert phagocytosis. Here, data obtained from inhibitory experiments with antibodies against IL-15R subunits indicate that the IL-15R α chain exerts a predominant role, since the biological activity of IL-15 was largely inhibited by the corresponding antibody when compared with those directed against the two other subunits during phagocytosis. However, the involvement of CD122 and CD132 cannot be discounted. In fact, these results confirm our hypothesis that IL-15R α is highly involved, since IL-2 was previously reported to be unable to induce neutrophil phagocytosis, due to the lack of expression of the IL-2R α component necessary for a functional high affinity IL-2R. In contrast, IL-15 can bind with

good affinity to cells expressing only the IL-15R α subunit (41), and neutrophils are known to express all three IL-15R components (8-11).

The important role of Syk in the cell-signalling cascade during neutrophil phagocytosis is well established (25,26). However, its role in IL-15-induced neutrophils is not known. In this study, we report for the first time that IL-15 increases neutrophil phagocytosis of opsonized-SRBC by activating the protein tyrosine kinase Syk. This is supported by the fact that treatment with the Syk inhibitor piceatannol inhibited IL-15-induced neutrophil phagocytosis. In addition, IL-15 induced tyrosine phosphorylation of Syk. Moreover, pre-treatment of cell with piceatannol markedly inhibited Syk phosphorylation induced by IL-15. In one study, Syk was found to be physically associated with IL-15R α in Raji cells and IL-15 was found to recruit this kinase for mediating its effect (28). In the present study, we demonstrated in neutrophils that Syk is also physically associated with IL-15R α , demonstrating the important role of Syk in IL-15-induced biological functions. Like others, we observed a basal level of phosphorylation of Syk in control cells (42,43). However, it is not clear if this corresponds to a constitutive activation of Syk in neutrophils or if this is due to non-specific activation following cell isolation. Of note, in some studies, pre-treatment of neutrophils with diisopropyl fluorophosphates (DFP) was found to eliminate (44) or drastically decrease (45) the basal level of phosphorylated Syk. In our hands, the basal level was variable from donor to donor after cell isolation. Nevertheless, Syk phosphorylation was always increased by IL-15. In fact, we believe that doing experiments with neutrophils without addition of DFP prior to activation with IL-15 represents a more physiological model, knowing that during inflammation neutrophils are already activated by several surrounding cytokines.

In the present study, we found that the ability of IL-15 to delay neutrophil apoptosis was reversed by pre-treating cells with piceatannol, suggesting that the protein Syk is involved in this response. However, while the concentration of piceatannol required for inhibiting IL-15-induced phagocytosis was 10 μ M, the

concentration required to reverse the ability of IL-15 to delay apoptosis was 100 μ M. At this concentration, the specificity of the inhibitor for Syk is greatly diminished (27). In this respect, piceatannol was found to selectively inhibit tyrosine phosphorylation of Jak-1, STAT3 and STAT5 in interferon- α mediated activation of Ramos and Jurkat cells (27). Interestingly, we have previously demonstrated that, like GM-CSF, IL-15 activates Jak-2, but unlike GM-CSF, IL-15 does not phosphorylate STAT5a/b. From these results it is conceivable that in neutrophils, IL-15 also recruits Jak-1 and STAT3. The complete analysis of the JAK-STAT pathway in response to IL-15 induction is presently under investigation in our laboratory.

Although the results obtained from the use of antibodies against the IL-15R subunits in order to inhibit the biological activity of IL-15 during phagocytosis were conclusive, this was not the case for apoptosis. Our results clearly indicate that the whole antibody molecule of the IgG₁ isotype can delay human neutrophil apoptosis themselves, rather than blocking the potential effect of IL-15, suggesting a cross reactivity with human FcR. Of note, despite the fact that human neutrophils do not express IL-2R α on their surface (10,11), addition of the anti-CD25 antibody (IgG₁) to neutrophil culture was also found to inhibit spontaneous apoptosis (Inset, **Fig. 9**) as well as an antibody directed against the intracellular Cbl proto-oncogene (IgG₁) (*data not shown*). We suggest that the suppression of neutrophil apoptosis by whole IgG₁ molecules occurs via the FcR, which induces Syk phosphorylation. Interestingly, our observation is in accordance with data from others indicating that anti-Fc γ RIIIb autoantibodies can extend neutrophil survival by delaying apoptosis (46). According to our results, it is tempting to speculate that the mechanism involved in their observation is probably dependent upon Syk activation. This remains to be verified.

Collectively, results from this study indicate that the ability of IL-15 to enhance phagocytosis and delay apoptosis is not related to an increase of cell surface receptor components. Rather, based on the utilization of piceatannol and

induction of Syk phosphorylation, we can conclude that IL-15 mediates its effect by activating Syk kinase, which is associated with the IL-15R α chain.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *IL-15 does not modulate the expression of IL-2/15R β , γ c or IL-15R α , on human neutrophil cell surface.* Freshly isolated human neutrophils were incubated for 30 min or 24h in the presence or absence (Ctrl) of 250 ng/ml IL-15 or 1 μ g/ml LPS and cell surface expression of IL-2/15R β , γ c and IL-15R α was measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n=4). Inset, representative data plotted in the bar graph.

Figure 2. *Role of the IL-15R components in IL-15-induced neutrophil phagocytosis.* Prior to the phagocytosis assay, neutrophils were incubated in the presence (+) or absence (-) of 1 μ g/ml of anti-CD25, -CD22, -CD132 or -IL-15R α and then stimulated with (+) or without (-) 250 ng/ml IL-15. Phagocytosis of opsonized SRBCs was evaluated as described in Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n \geq 4). *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by Student *t*-test.

Figure 3. *Anti-IL-15R α but not anti-IL-2/15R β or anti- γ c antibody delays neutrophil apoptosis by itself.* Human neutrophils (10 x 10⁶ cells/ml) were pre-incubated for 60 min in the presence or absence of the indicated antibody and stimulated with buffer (Ctrl) or 250 ng/ml IL-15 for 23h. Apoptosis was evaluated as described in Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n \geq 4). *, *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

Figure 4. *Inhibition of IL-15-induced neutrophil phagocytosis by piceatannol.* Prior to the phagocytosis assay, neutrophils were incubated in the presence of piceatannol at the indicated concentrations and then stimulated with buffer (Ctrl) or 250 ng/ml IL-15. Phagocytosis of opsonized SRBCs was evaluated as described in Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n \geq 4). *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

Figure 5. *Inhibition of IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis by piceatannol.* Human neutrophils were pre-treated with piceatannol as in legend of **Figure 4** and then stimulated with buffer (Ctrl) or 250 ng/ml IL-15. Apoptosis was evaluated as described in Materials and Methods. D, diluent. Results are means \pm SEM ($n \geq 4$). *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

Figure 6. *IL-15 induces Syk phosphorylation.* Neutrophils were stimulated with 250 ng/ml IL-15 for the indicated periods of time. A, the membrane was probed with an anti-phosphospecific Syk antibody (upper panel) as described in Materials and Methods, stripped and probed with an anti-Syk antibody indicating equivalent loading. B, cells were pre-treated with the Syk inhibitor piceatannol (10 μ M) (right part), stimulated with IL-15 and Western blots were performed as in panel A. Upper panel, phosphorylated Syk; bottom panel, unphosphorylated Syk. Results are from one representative experiment out of four.

Figure 7. *Association of Syk with IL-15R α .* After isolation, neutrophils were stimulated with buffer (Ctrl) or 250 ng/ml IL-15 for 5 min. Lysates were precipitated (+) or not (-) with anti-IL-15R α and Syk kinase was detected using the anti-Syk antibody as described in Materials and Methods. S, amount of Syk not precipitated and present in the supernatant fraction. Results are from one representative experiment out of 3.

Figure 8. *Anti-IL-15R α antibody induces Syk phosphorylation.* Neutrophils were stimulated with an anti-IL-15R α antibody, 65 ng/ml GM-CSF (GM) or 250 ng/ml IL-15 and Syk activation was monitored as described in the legend of **Figure 6**. The membrane was probed with the phosphospecific Syk antibody (upper panel), stripped and probed with the antibody recognizing the unphosphorylated form of Syk. Results are from one representative experiment out of three.

Figure 9. *Activation of Syk is not exclusive to the anti-IL-15R α antibody.* Freshly isolated neutrophils were stimulated by 1 μ g/ml antibodies of IgG₁ or IgG₂ isotype

for the indicated periods of time and phosphorylation of Syk was monitored as described in Materials and Methods. Note that only IgG₁ type antibodies were found to induce Syk phosphorylation (anti-CD25 and anti-IL-15R α), which correlates well with the ability to delay neutrophil apoptosis. Results are from one representative experiment out of at least 2. Inset, neutrophils were incubated for 24 h with buffer (Ctrl), 65 ng/ml GM-CSF (GM), 1000 ng/ml VAA-I (VA), or anti-CD25 antibody (α -CD25) and apoptosis was evaluated by cytology as described in Materials and Methods. Results are means \pm SEM (n=3). *, $p < 0.05$ vs control (Ctrl) by ANOVA.

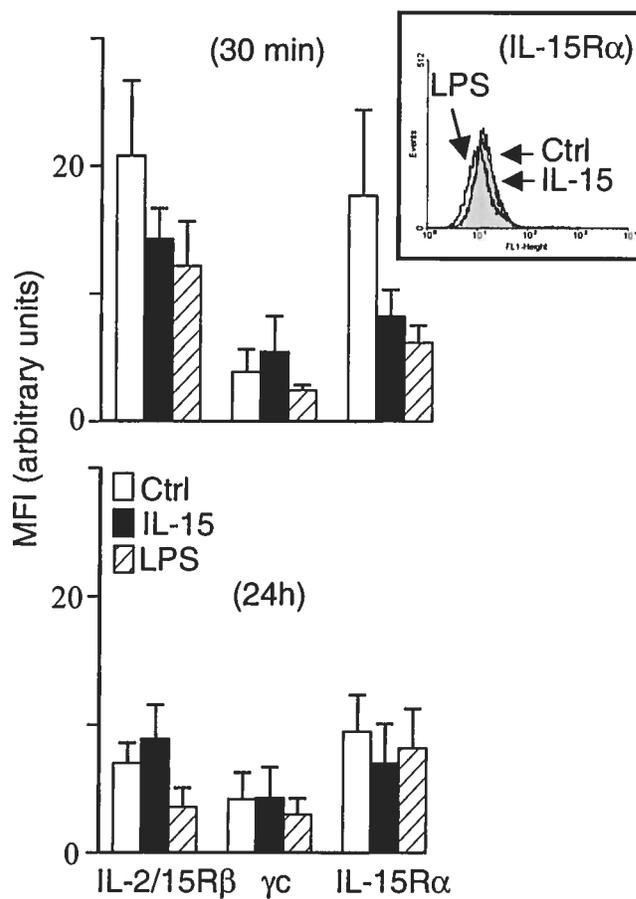


Figure 1. IL-15 does not modulate the expression of IL-2/15Rβ, γc or IL-15Rα, on human neutrophil cell surface.

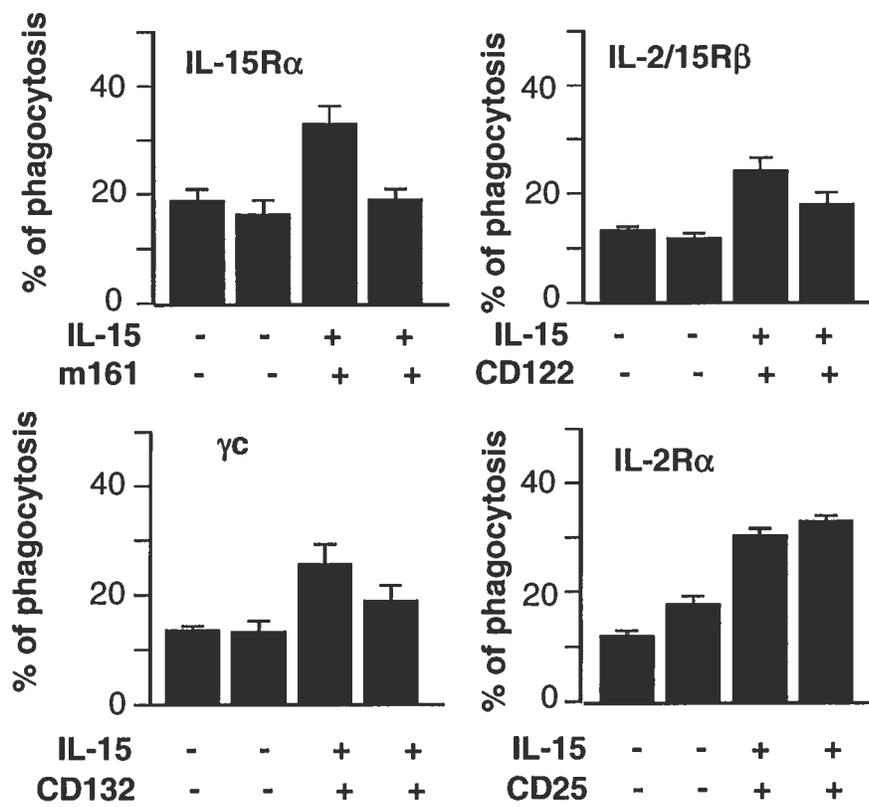


Figure 2. Role of the IL-15R components in IL-15-induced neutrophil phagocytosis.

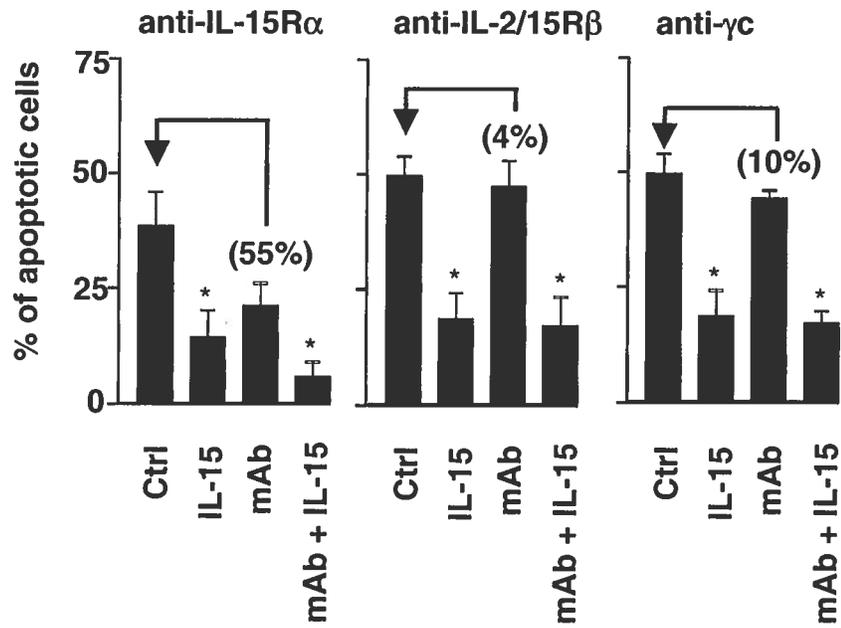


Figure 3. Anti-IL-15R α but not anti-IL-2/15R β or anti- γ c antibody delays neutrophil apoptosis by itself.

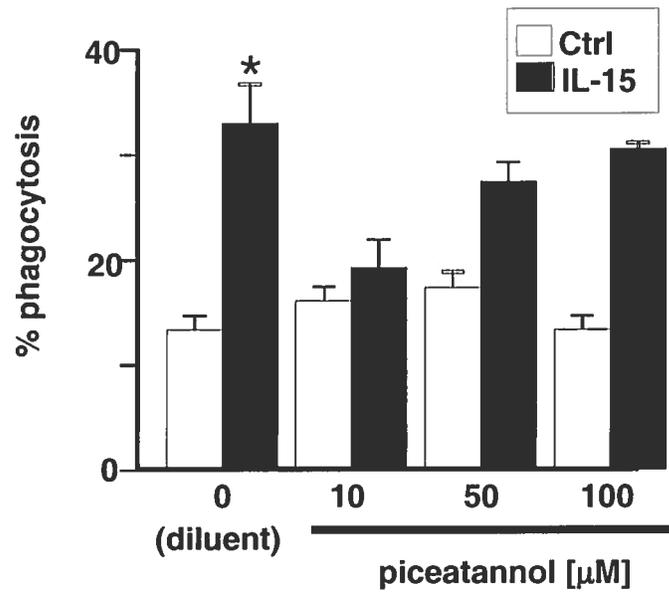


Figure 4. Inhibition of IL-15-induced neutrophil phagocytosis by piceatannol.

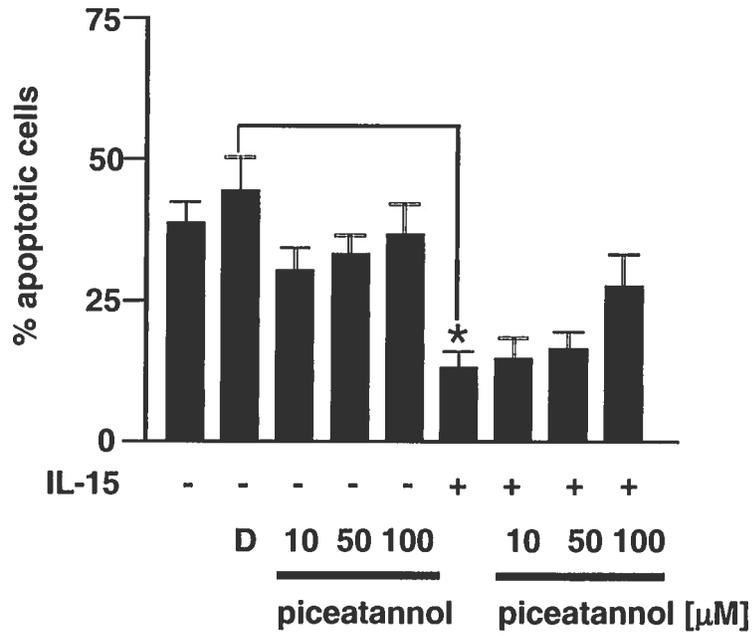


Figure 5. Inhibition of IL-15-induced suppression of neutrophil apoptosis by piceatannol.

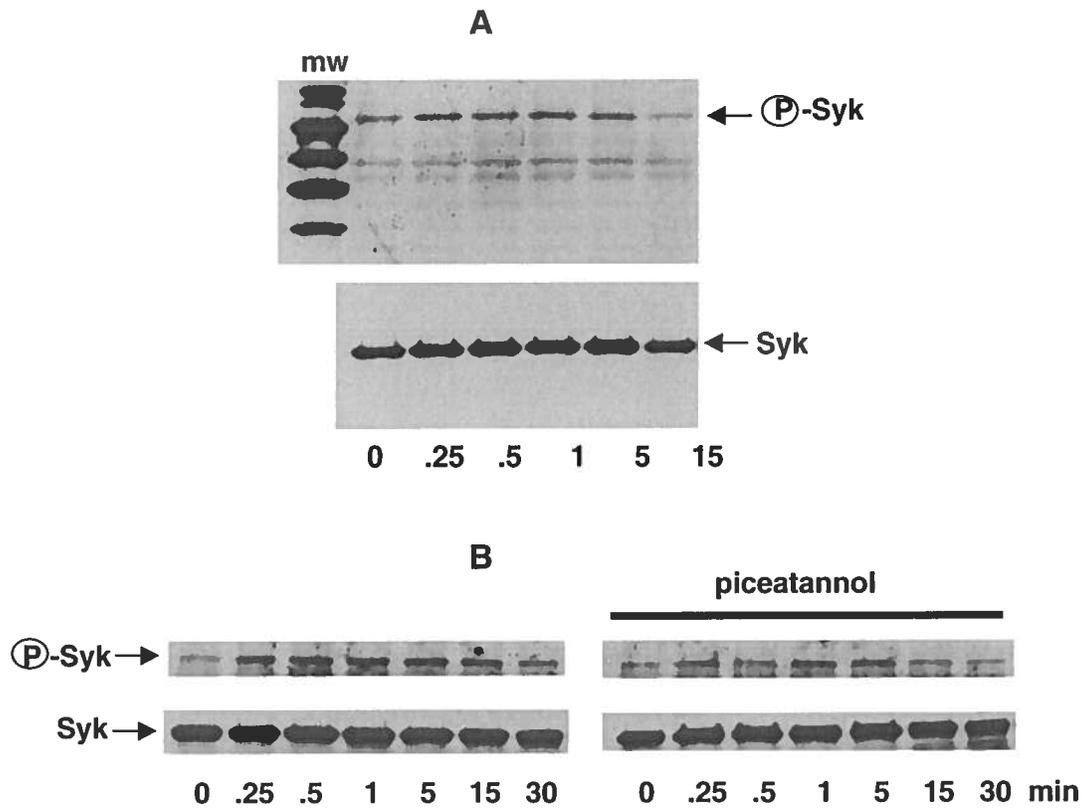


Figure 6. IL-15 induces Syk phosphorylation.

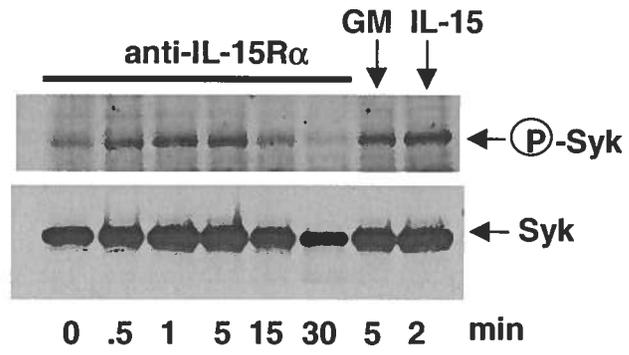


Figure 7. Association of Syk with IL-15R α .

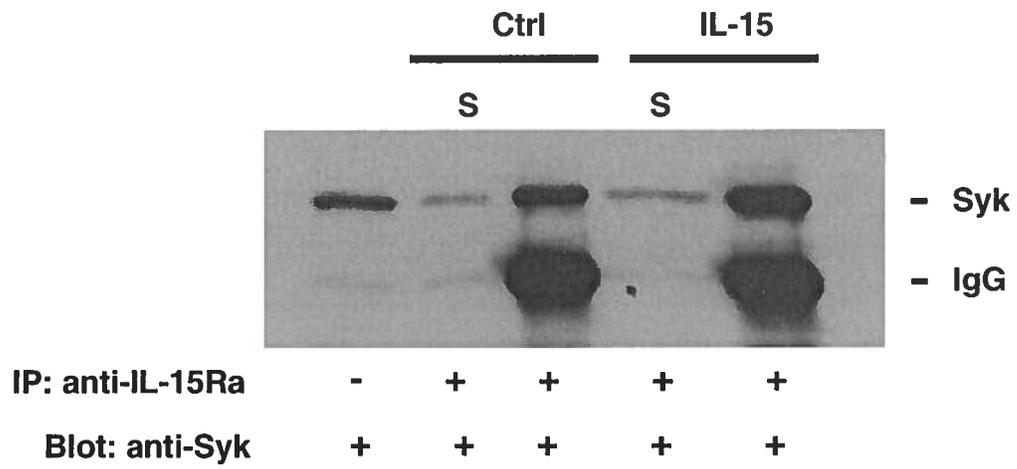


Figure 8. Anti-IL-15R α antibody induces Syk phosphorylation.

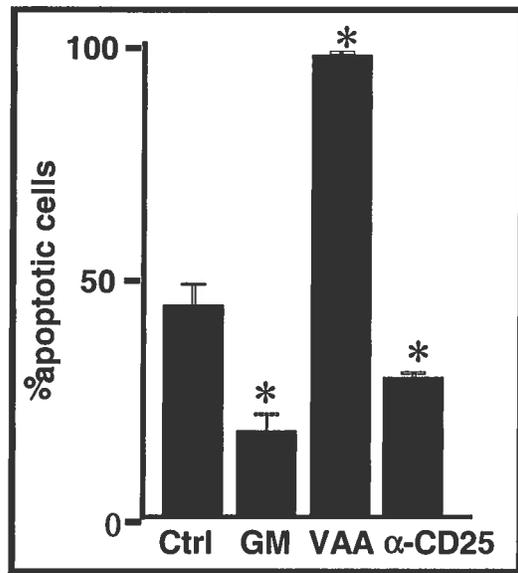
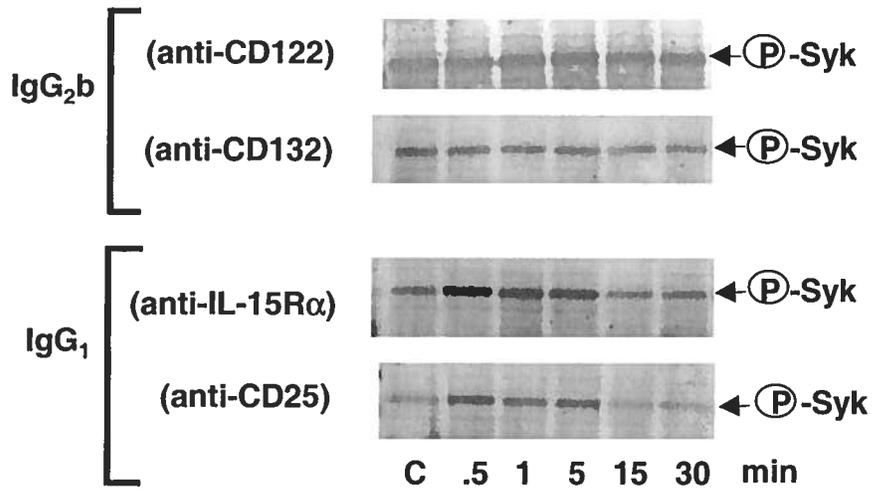


Figure 9. Activation of Syk is not exclusive to the anti-IL-15R α antibody.

REFERENCES

1. Anderson, D.M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N. G. Copeland, D.J. Gilbert, N. A. Jenkins, V. Valentine, D.N. Shapiro, S. W. Morris, L. S. Park, and D. Cosman. 1995. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.* 270: 29862.
2. Demoulin, J.B., and J.C. Renauld. 1998. Signalling by cytokines interacting with the interleukin-2 receptor gamma chain. *Cytokines Cell Mol. Ther.* 4: 243.
3. Boesteanu, A., A.D. Silva, H. Nakajima, W.J. Leonard, J.J. Peschon, and S. Joyce. 1997. Distinct roles for signals relayed through the common cytokine receptor gamma chain and interleukin 7 receptor alpha chain in natural T cell development. *J. Exp. Med.* 186: 331.
4. Bauer, J.H., K.D. Liu, Y. You, S.Y. Lai, and M.A. Goldsmith. 1998. Heteromerization of the gammac chain with the interleukin-9 receptor alpha subunit leads to STAT activation and prevention of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 9255.
5. Asao, H., C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster, K. Sugamura. 2001. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J. Immunol.* 167:1.
6. Leonard, W.J. 1994. The defective gene in X-linked severe combined immunodeficiency encodes a shared interleukin receptor subunit: implications for cytokine pleiotropy and redundancy. *Curr. Opin. Immunol.* 6:631.
7. Leonard, W.J., J.J. O'Shea. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16:293.

8. Girard, D., M.E. Paquet, R. Paquin, A.D. Beaulieu. 1996. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood*. 88:3176.
9. Girard, D., N. Boiani, A.D. Beaulieu. 1998. Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88:232.
10. Girard, D., J. Gosselin, D. Heitz, R. Paquin, A.D. Beaulieu. 1995. Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils. *Blood*. 86:1170.
11. Djeu, J.Y., J.H. Liu, S. Wei, H. Rui, C.A. Pearson, W.J. Leonard, D.K. Blanchard. 1993. Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2. *J. Immunol.* 150:960.
12. McDonald, P.P., M.P. Russo, S. Ferrini, M.A. Cassatella. 1998. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood*. 92:4828.
13. Pelletier, M., V. Lavastre, A. Savoie, C. Ratthé, R. Saller, K. Hostanska, D. Girard. 2001. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I. *Clin. Immunol.* 101:229.
14. Jablonska, E., L. Piotrowski, M. Kiluk, J. Jablonski, Z. Grabowska, W. Markiewicz. 2001. Effect of IL-15 on the secretion of IL-1beta, IL-1Ra and sIL-1RII by PMN from cancer patients. *Cytokine*. 16:173.
15. Pelletier, M., C. Ratthé, D. Girard. 2002. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic

Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett.* 532:164.

16. Lasek, W., J. Golab, W. Maslinski, T. Switaj, E.Z. Balkowiec, T. Stoklosa, A. Giermasz, M. Malejczyk, M. Jakobisiak. 1999. Subtherapeutic doses of interleukin-15 augment the antitumor effect of interleukin-12 in a B16F10 melanoma model in mice. *Eur. Cytokine Netw.* 10:345-56.

17. Hazama, S., T. Noma, F. Wang, N. Iizuka, Y. Ogura, K. Yoshimura, E. Inoguchi, M. Hakozaiki, K. Hirose, T. Suzuki, M. Oka. 1999. Tumour cells engineered to secrete interleukin-15 augment anti-tumour immune responses in vivo. *Br. J. Cancer.* 80:1420.

18. Munger, W., S.Q. DeJoy, R. Jeyaseelan Sr, L.W. Torley, K.H. Grabstein, J. Eisenmann, R. Paxton, T. Cox, M.M. Wick, S.S. Kerwar. 1995. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell Immunol.* 165:289.

19. Moxey-Mims, M.M., H.H. Simms, M.M. Frank, E.Y. Lin, T.A. Gaither. 1991. The effects of IL-1, IL-2, and tumor necrosis factor on polymorphonuclear leukocyte Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. IL-2 down-regulates the effect of tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 147:1823.

20. Hsu, M.J., S.S. Lee, W.W. Lin. 2002. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *J. Leukoc. Biol.* 72:207.

21. Moulding, D.A., C.A. Hart, S.W. Edwards. 1999. Regulation of neutrophil Fc γ R11b (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *J. Leukoc. Biol.* 65:875.
22. Carayol, G., J. Giron-Michel, B. Azzarone, L. Castagna, N. Cambier, Z. Mishal, J.H. Bourhis, S. Chouaib, A. Caignard. 2000. Altered natural killer cell differentiation in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Oncogene.* 19:2758.
23. Kiefer, F., J. Brumell, N. Al-Alawi, S. Latour, A. Cheng, A. Veillette, S. Grinstein, T. Pawson. 1998. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 18:4209.
24. Cooney, D.S., H. Phee, A. Jacob, K.M. Coggeshall. 2001. Signal transduction by human-restricted Fc γ R1a involves three distinct cytoplasmic kinase families leading to phagocytosis. *J. Immunol.* 167:844.
25. Bharadwaj, D., C. Mold, E. Markham, T.W. Du Clos. 2001. Serum amyloid P component binds to Fc γ receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J. Immunol.* 166:6735.
26. Avdi, N.J., J.A. Nick, B.B. Whitlock, M.A. Billstrom, P.M. Henson, G.L. Johnson, G.S. Worthen. 2001. Tumor necrosis factor- α activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway in human neutrophils. Integrin involvement in a pathway leading from cytoplasmic tyrosine kinases apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:2189.
27. Su, L., M. David. 2000. Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon- α / β receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J. Biol. Chem.* 275:12661.

28. Bulanova, E., V. Budagian, T. Pohl, H. Krause, H. Durkop, R. Paus, S. Bulfone-Paus. 2001. The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J. Immunol.* 167:6292.
29. Lu, J., R.L. Giuntoli 2nd, R. Omiya, H. Kobayashi, R. Kennedy, E. Celis. 2002. Interleukin 15 promotes antigen-independent in vitro expansion and long-term survival of antitumor cytotoxic T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 8:3877.
30. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, M.A. Caligiuri. 2002. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:169.
31. Bamford, R.N., A.P. Battiata, J.D. Burton, H. Sharma, T.A. Waldmann. 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. USA.* 93:2897.
32. Fehniger, T.A., M.A. Caligiuri. 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood.* 97:14.
33. McInnes, I.B., F.Y. Liew. 1998. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol. Today.* 19:75.
34. McInnes, I.B., B.P. Leung, R.D. Sturrock, M. Field, F.Y. Liew. 1997. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 3:189.
35. McInnes, I.B., B.P. Leung. 2001. Innate response cytokines in inflammatory synovitis: a role for interleukin-15. *Curr. Dir. Autoimmun.* 3:200.

36. Thurkow, E.W., I.M. van der Heijden, F.C. Breedveld, T.J. Smeets, M.R. Daha, P.M. Kluin, A.E. Meinders, P.P. Tak. 1997. Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis. *J. Pathol.* 181:444.
37. Kirman, I., O.H. Nielsen. 1996. Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 91:1789.
38. Agostini, C., L. Trentin, M. Facco, R. Sancetta, A. Cerutti, C. Tassinari, L. Cimarosto, F. Adami, A. Cipriani, R. Zambello, G. Semenzato. 1996. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 157:910.
39. Kakumu, S., A. Okumura, T. Ishikawa, M. Yano, A. Enomoto, H. Nishimura, K. Yoshioka, Y. Yoshika. 1997. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.* 109:458.
40. Kirman, I., B. Vainer, O.H. Nielsen. 1998. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm. Res.* 47:285.
42. Dubois, S., J. Mariner, T.A. Waldmann, Y. Tagaya. 2002. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity.* 17:537.
43. Barabe, F., C. Gilbert, N. Liao, S.G. Bourgoin, P.H. Naccache. 1998. Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of Fc gamma RIIIb (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals. *FASEB J.* 12:209.
44. Pricop, L., J. Gokhale, P. Redecha, S.C. Ng, J.E. Salmon. 1999. Reactive oxygen intermediates enhance Fc gamma receptor signaling and amplify phagocytic capacity. *J. Immunol.* 162:7041.

45. Raeder, E.M., P.J. Mansfield, V. Hinkovska-Galcheva, J.A. Shayman, L.A. Boxer. 1999. Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J. Immunol.* 163:6785.
46. Desaulniers, P., M. Fernandes, C. Gilbert, S.G. Bourgoin, P.H. Naccache. 2001. Crystal-induced neutrophil activation. VII. Involvement of Syk in the responses to monosodium urate crystals. *J. Leukoc. Biol.* 70:659.
47. Durand, V., J.O. Pers, Y. Renaudineau, A. Saraux, P. Youinou, C. Jamin. 2001. Differential effects of anti-Fc gamma RIIIb autoantibodies on polymorphonuclear neutrophil apoptosis and function. *J. Leukoc. Biol.* 69:233.

Article 2

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Titre

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.

Auteurs

Martin Pelletier, Claude Ratthé et Denis Girard.

Publié dans la revue

FEBS Letters (novembre 2002)

Contribution personnelle

Cet article comporte les résultats d'une deuxième étude sur l'effet de l'IL-15 sur l'apoptose des neutrophiles humains. J'en suis la deuxième auteurs et j'ai participé aux expériences concernant les inhibiteurs. J'ai aussi participé à la mise au point des expériences d'immunobuvardage de type Western de la protéine Jak-2. J'ai participé à la planification des expériences, à l'élaboration de certains protocoles et à la correction du manuscrit. J'ai participé à certaines analyses statistiques et aux analyses des résultats.

Contribution des coauteurs

Martin Pelletier est l'auteur principal de cet article et il a effectué la majorité des expériences. Il a participé à la planification des expériences, à l'élaboration des protocoles et à la correction du manuscrit.

Le Dr. Girard a mis en structure le cœur du projet, a participé à la planification des expériences, à l'élaboration de protocoles et a supervisé toutes les expériences. Il a aussi rédigé le manuscrit et effectué des analyses statistiques et des analyses de résultats.

2.1 Résumé en français de l'article 2

L'interleukine-15 (IL-15) est une cytokine pro-inflammatoire connue pour être un inhibiteur général de l'apoptose possédant des propriétés thérapeutiques potentielles. Même si l'IL-15 est reconnue pour être un agoniste des neutrophiles, son mode d'action demeure inconnu. Dans cette étude, nous avons observé les mécanismes par lesquels l'IL-15 retarde l'apoptose des neutrophiles. L'IL-15 induit des événements de phosphorylation de tyrosines et prévient la perte d'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. En utilisant des inhibiteurs de la transduction intracellulaire, nous avons démontré que Janus kinase (Jak)-2, p38 mitogen-activated protéin kinase (MAPK) et extracellular signal-regulated kinase (ERK), mais non les protéines G jouent un rôle dans le retard d'apoptose induit par l'IL-15. De plus, nous avons démontré que l'IL-15 active Jak-2, p38 MAPK et ERK-1/2, mais, contrairement au granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), elle n'active pas STAT-5a/b. Nous concluons que l'IL-15 retarde l'apoptose des neutrophiles par plusieurs voies de signalisation et que Mcl-1 et plusieurs kinases contribuent à ce phénomène. Nous concluons aussi que, contrairement au GM-CSF, l'IL-15 n'active pas la cascade de signalisation Jak-2/STAT-5.

Conclusion

L'interleukine-15 agit sur les neutrophiles humains par le biais d'un récepteur spécifique à la surface de ceux-ci. Ce récepteur se compose de trois chaînes, soit la IL-15R α , la IL-2/15R β et la γ c (Djeu et al., 1993 : 960 ; Girard et al., 1998 : 232 ; Liu et al., 1994 : 3870 ; Nakarai et al., 1994 : 241). Lorsque la cytokine se lie à son récepteur, plusieurs cascades de signalisation intracellulaires sont enclenchées permettant une réponse du neutrophile (Pelletier et al., 2002 : 164). L'IL-15 module plusieurs fonctions et joue un rôle d'activateur du neutrophile. Elle augmente la phagocytose et ainsi l'efficacité des neutrophiles, retarde l'apoptose afin de leur permettre de persister au site inflammatoire, augmente leur production d'IL-8, ce qui permet d'attirer d'autres cellules et induit leur synthèse protéique *de novo* (Girard et al., 1996 : 3176 ; McDonald et al., 1998 : 4828). L'IL-15 est donc pro-inflammatoire, puisqu'elle favorise le développement de la réponse immunitaire.

Les effets de l'IL-15 sur le neutrophile sont assez bien connus. Cependant, les mécanismes intracellulaires qui mènent à ceux-ci le sont moins. L'étude exposée dans ce document a permis d'élucider quelques éléments de l'action de l'IL-15 sur les neutrophiles humains. Tout d'abord, dans l'article 1, il a été démontré que l'IL-15 ne module pas l'expression des chaînes de son récepteur à la surface des neutrophiles humains. Nous observons ainsi que les neutrophiles de la circulation sont prêts à répondre à l'IL-15. De plus, les expériences relatées dans cet article ont permis d'identifier la chaîne IL-15R α comme étant très importante dans l'action de l'IL-15 sur la phagocytose et des neutrophiles humains. Lorsque celle-ci est bloquée par des anticorps spécifiques, l'effet de l'IL-15 est réduit de 40% alors qu'il l'est de 21% et de 27% lorsque les chaînes IL-2/15R β et γ c sont bloquées respectivement. Plusieurs concentrations d'anticorps ont été utilisées afin de déterminer les conditions optimales pour chaque chaîne de récepteur.

Il a été démontré chez la lignée cellulaire Raji que la chaîne IL-15R α participe à la signalisation et s'associe avec la kinase Syk (Bulanova et al., 2001 : 6292). Cette observation nous a permis de penser que cette kinase pourrait aussi faire partie de la signalisation de la chaîne IL-15R α chez le neutrophile. Comme Syk est connue pour être associée à la phagocytose du neutrophile (Kiefer et al., 1998 : 4209 ; Raeder et al., 1999 : 6785), il se pourrait que cette protéine soit phosphorylée par la chaîne IL-15R α , ce qui expliquerait sa grande importance dans l'effet de l'IL-15 sur la phagocytose des neutrophiles humains. Dans une analyse plus approfondie, les lysats cellulaires de neutrophiles traités avec l'IL-15 pour différents temps ont été séparés sur gels d'acrylamide et analysés par immunobuvardage de type Western. Ces expériences nous ont permis de démontrer que l'IL-15 phosphoryle effectivement la protéine Syk chez les neutrophiles et que cette phosphorylation peut être empêchée par le piceatannol, un inhibiteur classique de cette kinase. Un pré-traitement avec 10 μ M de piceatannol empêche aussi l'augmentation de la phagocytose des neutrophiles par l'IL-15 démontrant le rôle essentiel de Syk dans cette fonction du neutrophile. Des expériences de co-immunoprécipitation ont aussi permis d'observer que la composante IL-15R α s'associe physiquement, chez le neutrophile, avec la kinase Syk. Il est connu que la liaison de l'IL-2 à la chaîne IL-2/15R β entraîne la phosphorylation de Syk (Minami et al., 1995 : 89) mais cette avenue n'a jamais été explorée chez le neutrophile. Il pourrait être intéressant dans le futur d'évaluer l'association de Syk avec la chaîne IL-2/15R β chez le neutrophile.

L'article 1 a aussi permis de démontrer que la kinase Syk joue un rôle dans la signalisation intracellulaire reliée à l'apoptose. Lorsque des neutrophiles sont pré-traités avec 100 μ M de piceatannol, l'effet de l'IL-15 sur l'apoptose est diminué et on dénombre plus de neutrophiles apoptotiques. Il est à noter que la concentration de piceatannol nécessaire pour inhiber l'effet de l'IL-15 sur les neutrophiles varie selon que l'on mesure l'apoptose ou la phagocytose. Dans la littérature, il est connu que le piceatannol, même s'il est l'agent utilisé le plus couramment pour inhiber la kinase Syk, n'est pas entièrement spécifique à cette

protéine et peut inhiber d'autres kinases et des STATs (Su et David, 2000 : 12661). De ce fait, à 10 μ M, le piceatannol inhibe principalement Syk et légèrement Fak et Src (Law et al., 1999 : 2645). Plus la concentration de cet inhibiteur augmente, plus le nombre de protéines affectées s'accroît. Ce phénomène pourrait expliquer la variation des concentrations de piceatannol nécessaires à nos expériences. Il se pourrait que dans l'action de l'IL-15 sur la phagocytose, Syk soit très importante et que les 10 μ M nécessaires servent principalement à l'inhibition de cette kinase. Par contre, puisqu'il est connu que l'IL-15 active la cascade de signalisation Jak/STAT dans son action sur l'apoptose, il est possible que les 100 μ M d'inhibiteur nécessaires neutralisent Syk, mais aussi les STATs activées par la cascade. Il y aurait donc différentes voies d'activation cellulaires pour l'action de l'IL-15 sur l'apoptose et sur la phagocytose.

Nous avons tenté d'utiliser des anticorps pour bloquer les chaînes du récepteur de l'IL-15 et vérifier leur importance sur le retard d'apoptose des neutrophiles induit par cette cytokine. Malheureusement, sur 24 heures, aucun des anticorps n'a pu diminuer l'effet de l'IL-15. Nous croyons qu'il y a peut-être un renouvellement des chaînes à la surface des neutrophiles qui permet au récepteur de redevenir fonctionnel et de lier l'IL-15. Par contre, fait étonnant, l'anticorps reconnaissant la chaîne IL-15R α retarde, à lui seul, l'apoptose des neutrophiles. Cet effet est peut-être dû à une liaison non spécifique de l'anticorps ou à une « imitation » de la part de l'anticorps qui agirait comme s'il était la cytokine même. Un anticorps contre la chaîne IL-2R α a donc été utilisé puisque le neutrophile ne possède pas cette chaîne de récepteur à sa surface. Cet anticorps retarde lui aussi l'apoptose des neutrophiles, donc cet effet observé serait probablement le résultat d'une liaison non spécifique aux récepteurs Fc qui reconnaissent une partie des immunoglobulines. Les deux anticorps précédemment mentionnés sont des IgG₁ et ceux-ci se lient très bien au CD16 et au CD32 ; les deux récepteurs Fc présents de façon constitutive sur le neutrophile. Par contre, les anticorps utilisés pour bloquer les chaînes IL-2/15 β et

gamma c sont de type IgG₂ et ceux-ci sont peu ou pas reconnus par le CD16 et le CD32. Ceci pourrait expliquer pourquoi ces deux anticorps ne retardent pas l'apoptose des neutrophiles. Suite à des expériences plus poussées, nous avons aussi pu démontrer que les anticorps de type IgG₁ induisent la phosphorylation de la kinase Syk alors que les IgG₂ n'ont aucun effet sur sa phosphorylation. La liaison d'anticorps aux récepteurs Fc entraînerait donc un retard de l'apoptose des neutrophiles et une signalisation par la protéine Syk, ce qui pourrait leur permettre, par exemple, de persister à un site contenant des bactéries opsonisées pour les phagocyter. Puisque Syk est associée à la phagocytose, une activation des récepteurs Fc pourrait aussi augmenter leur potentiel phagocytaire. Il serait intéressant d'utiliser la portion Fab des anticorps dans des expériences ultérieures afin d'éliminer la liaison aux sites Fc.

L'article 2 a permis d'explorer plus en profondeur les mécanismes d'action de l'IL-15 dans le retard de l'apoptose des neutrophiles humains. Tout d'abord, des inhibiteurs spécifiques à différentes molécules de la signalisation de plusieurs récepteurs ont été utilisés afin de faire un premier survol et de cibler des candidats potentiels de la signalisation de l'IL-15. Des neutrophiles ont été pré-traités avec les inhibiteurs et ensuite incubés avec l'IL-15 pour 24 heures. Ces expériences ont permis de cibler Jak-2, Jak-3, STAT-1, -3, -5a, and -5b, p38 MAP kinase et MEK comme éléments potentiels de la signalisation de l'IL-15 dans l'apoptose des neutrophiles. Des expériences de Western Blot avec le lysat cellulaire de neutrophiles stimulés avec l'IL-15 ont permis de vérifier les différentes possibilités. Jak2, p38 MAPK et ERK sont phosphorylés en réponse à l'IL-15 ce qui permet d'entrevoir deux voies de signalisation de l'IL-15 chez le neutrophile, une du côté de la cascade Jak/STAT et une autre du côté MAP kinases.

L'article 2 a aussi permis de démontrer le rôle important de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dans le retard d'apoptose de l'IL-15 sur les neutrophiles. Il est connu que les neutrophiles ne possèdent pas la protéine Bcl-2, très répandue

et généralement une des principales protéines régulatrices de l'apoptose. Comme les neutrophiles se dirigent spontanément en apoptose à moins de stimuli externes, il importe d'élucider les mécanismes de régulation de ce phénomène. Des expériences de Western Blot avec des lysats cellulaires de neutrophiles incubés pour 24 heures avec l'IL-15 ont permis de démontrer que cette cytokine empêche la perte d'expression de la protéine Mcl-1. Cette observation ouvre une nouvelle voie quant aux mécanismes de régulation de l'apoptose des neutrophiles. Puisque les neutrophiles jouent un rôle dans plusieurs maladies inflammatoires, ces connaissances permettront peut-être de développer des stratégies visant à bloquer l'effet de l'IL-15 ou à induire l'apoptose des neutrophiles activés de façon désordonnée. Par exemple, la dégradation de la protéine Mcl-1 pourrait permettre l'apoptose des neutrophiles. Dans une autre optique, les différents éléments de la cascade de signalisation de l'IL-15 pourraient être bloqués afin de diminuer l'effet de cette cytokine.

Les études décrites précédemment ont permis de mieux comprendre la signalisation intracellulaire reliée au récepteur de l'interleukine-15 chez le neutrophile. Cette signalisation s'associe à une activation du neutrophile et au développement de la réponse inflammatoire. S'il importe de connaître de façon détaillée quelles molécules jouent un rôle clé dans ce phénomène, il demeure important de se pencher sur les voies d'inhibition qui leur sont étroitement liées. Les protéines de la famille des phosphatases, de la famille SOCS et de celle des PIAS sont activées en réponse à des cytokines et elles agissent comme inhibiteurs des cascades de signalisation qui leur sont associées. Ces protéines sont peu étudiées chez les neutrophiles et il serait intéressant d'évaluer leur rôle dans la signalisation du récepteur de l'interleukine-15.

Références

Livres

- 1 EDWARDS, S.W. 1994. Biochemistry and Physiology of the neutrophil. Cambridge : University Press, 319p.
- 2 JANEWAY, C.A., P. Travers, M. Walport et J.D. Capra. 1999. Immunobiology : The Immune System in Health and disease, Fourth Edition. New York : Garland Publishing, 635p.

Sites Internet

- 1 Academic Press: Cytokine Reference. Encyclopédie en ligne. 2000. <http://www.academicpress.com/companions/0122526708/>
- 2 Horst Ibelgaufts Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia. Encyclopédie en ligne. 2003. <http://www.copewithcytokines.de/>

Articles

- 1 AGOSTINI, C., L. Trentin, M. Facco, R. Sancetta, A. Cerutti, C. Tassinari, L. Cimarosto, F. Adami, A. Cipriani, R. Zambello et G. Semenzato. 1996. "Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis". Journal of Immunology, vol. 157, p. 910-8.
- 2 AL-SHAMI, A. et P. H. Naccache. 1999. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 5333-8.
- 3 ALLEVA, D. G., S. B. Kaser, M. A. Monroy, M. J. Fenton et D. I. Beller. 1997. "IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition". Journal of Immunology, vol. 159, p. 2941-51.
- 4 ANDERSON, D. M., L. Johnson, M. B. Glaccum, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, V. Valentine, M. N. Kirstein, D. N. Shapiro, S. W. Morris et a. I. et. 1995. "Chromosomal assignment and genomic structure of Il15". Genomics, vol. 25, p. 701-6.

- 5 ANDERSON, D. M., S. Kumaki, M. Ahdieh, J. Bertles, M. Tometsko, A. Loomis, J. Giri, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins et al. 1995. "Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 29862-9.
- 6 ARMITAGE, R. J., B. M. Macduff, J. Eisenman, R. Paxton et K. H. Grabstein. 1995. "IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation". Journal of Immunology, vol. 154, p. 483-90.
- 7 ASAO, H., C. Okuyama, S. Kumaki, N. Ishii, S. Tsuchiya, D. Foster et K. Sugamura. 2001. "Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex". Journal of Immunology, vol. 167, p. 1-5.
- 8 ATEDZOE, B. N., A. Ahmad et J. Menezes. 1997. "Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction". Journal of Immunology, vol. 159, p. 4966-72.
- 9 AZIMI, N., K. Brown, R. N. Bamford, Y. Tagaya, U. Siebenlist et T. A. Waldmann. 1998. "Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein transactivates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 2452-7.
- 10 AZIMI, N., S. Jacobson, T. Leist et T. A. Waldmann. 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". Journal of Immunology, vol. 163, p. 4064-72.
- 11 AZZARONE, B., C. Pottin-Clemenceau, P. Krief, E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Scudeletti et F. Indiveri. 1996. "Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells?". European Cytokine Network, vol. 7, p. 27-36.
- 12 BAAN, C. C., C. J. Knoop, C. T. Holweg, T. van Gelder, H. J. Metselaar, H. G. Niesters, P. E. Zondervan, A. H. Balk et W. Weimar. 1999. "The macrophage-derived T-cell growth factor interleukin-15 is present in interleukin-2-independent rejection after clinical heart and liver transplantation". Transplantation Proceedings, vol. 31, p. 2726-8.
- 13 BAMFORD, R. N., A. P. Battiata et T. A. Waldmann. 1996. "IL-15: the role of translational regulation in their expression". Journal of Leukocyte Biology, vol. 59, p. 476-80.
- 14 BAMFORD, R. N., A. J. Grant, J. D. Burton, C. Peters, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler et T. A. Waldmann. 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". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 4940-4.
- 15 BARRETT, K. E. 1996. "Cytokines: sources, receptors and signalling". Baillieres Clinical Gastroenterology, vol. 10, p. 1-15.
- 16 BOGER, D. L. et J. Goldberg. 2001. "Cytokine receptor dimerization and activation: prospects for small molecule agonists". Bioorganic and Medicinal Chemistry, vol. 9, p. 557-62.
- 17 BRIARD, D., D. Brouty-Boye, B. Azzarone et C. Jasmin. 2002. "Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15". Journal of Immunology, vol. 168, p. 4326-32.
- 18 BULANOVA, E., V. Budagian, T. Pohl, H. Krause, H. Durkop, R. Paus et S. Bulfone-Paus. 2001. "The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells". Journal of Immunology, vol. 167, p. 6292-302.
- 19 BURTON, J. D., R. N. Bamford, C. Peters, A. J. Grant, G. Kurys, C. K. Goldman, J. Brennan, E. Roessler et T. A. Waldmann. 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". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 4935-9.
- 20 CARSON, W. E., J. G. Giri, M. J. Lindemann, M. L. Linett, M. Ahdieh, R. Paxton, D. Anderson, J. Eisenmann, K. Grabstein et M. A. Caligiuri. 1994. "Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor". Journal of Experimental Medicine, vol. 180, p. 1395-403.
- 21 CARSON, W. E., M. E. Ross, R. A. Baiocchi, M. J. Marien, N. Boiani, K. Grabstein et M. A. Caligiuri. 1995. "Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro". Journal of Clinical Investigation, vol. 96, p. 2578-82.
- 22 CASSATELLA, M. A. et P. P. McDonald. 2000. "Interleukin-15 and its impact on neutrophil function". Current Opinion in Hematology, vol. 7, p. 174-7.
- 23 CHU, C. L., S. S. Chen, T. S. Wu, S. C. Kuo et N. S. Liao. 1999. "Differential effects of IL-2 and IL-15 on the death and survival of activated TCR gamma delta+ intestinal intraepithelial lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 162, p. 1896-903.

- 24 CHUANG, F. Y., M. Sassaroli et J. C. Unkeless. 2000. "Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils". Journal of Immunology, vol. 164, p. 350-60.
- 25 COHEN, J. J. 1993. "Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function". Chest, vol. 103, p. 99S-101S.
- 26 COONEY, D. S., H. Phee, A. Jacob et K. M. Coggeshall. 2001. "Signal transduction by human-restricted Fc gamma RIIa involves three distinct cytoplasmic kinase families leading to phagocytosis". Journal of Immunology, vol. 167, p. 844-54.
- 27 COONEY, R. N. 2002. "Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway". Shock, vol. 17, p. 83-90.
- 28 DJEU, J. Y., J. H. Liu, S. Wei, H. Rui, C. A. Pearson, W. J. Leonard et D. K. Blanchard. 1993. "Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2". Journal of Immunology, vol. 150, p. 960-70.
- 29 DOBBELING, U., R. Dummer, E. Laine, N. Potoczna, J. Z. Qin et G. Burg. 1998. "Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells". Blood, vol. 92, p. 252-8.
- 30 DONG, C., R. J. Davis et R. A. Flavell. 2002. "MAP kinases in the immune response". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 55-72.
- 31 DOWER, S. K. 1993. "Cytokine receptor families". Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research, vol. 28, p. 19-25.
- 32 DURAND, V., Y. Renaudineau, J. O. Pers, P. Youinou et C. Jamin. 2001. "Cross-linking of human Fc gamma RIIIb induces the production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils". Journal of Immunology, vol. 167, p. 3996-4007.
- 33 EVANS, R., J. A. Fuller, G. Christianson, D. M. Krupke et A. B. Troutt. 1997. "IL-15 mediates anti-tumor effects after cyclophosphamide injection of tumor-bearing mice and enhances adoptive immunotherapy: the potential role of NK cell subpopulations". Cellular Immunology, vol. 179, p. 66-73.
- 34 FADOK, V. A., J. S. Savill, C. Haslett, D. L. Bratton, D. E. Doherty, P. A. Campbell et P. M. Henson. 1992. "Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells". Journal of Immunology, vol. 149, p. 4029-35.
- 35 FEHNIGER, T. A., W. E. Carson et M. A. Caligiuri. 1999. "Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production".

Transplantation Proceedings, vol. 31, p. 1476-8.

- 36 FEHNIGER, T. A., M. H. Shah, M. J. Turner, J. B. VanDeusen, S. P. Whitman, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid et M. A. Caligiuri. 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". Journal of Immunology, vol. 162, p. 4511-20.
- 37 FEHNIGER, T. A., H. Yu, M. A. Cooper, K. Suzuki, M. H. Shah et M. A. Caligiuri. 2000. "Cutting edge: IL-15 costimulates the generalized Shwartzman reaction and innate immune IFN-gamma production in vivo". Journal of Immunology, vol. 164, p. 1643-7.
- 38 FERRINI, S., B. Azzarone et C. Jasmin. 1996. "Is IL-15 a suitable candidate for cancer gene therapy?". Gene Therapy, vol. 3, p. 656-7.
- 39 FINIDORI, J. et P. A. Kelly. 1995. "Cytokine receptor signalling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases, and signal transducers and activators of transcription". Journal of Endocrinology, vol. 147, p. 11-23.
- 40 FLAMAND, L., I. Stefanescu et J. Menezes. 1996. "Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15". Journal of Clinical Investigation, vol. 97, p. 1373-81.
- 41 FOXWELL, B. M., K. Barrett et M. Feldmann. 1992. "Cytokine receptors: structure and signal transduction". Clinical and Experimental Immunology, vol. 90, p. 161-9.
- 42 GAMERO, A. M., D. Ussery, D. S. Reintgen, C. A. Puleo et J. Y. Djeu. 1995. "Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism". Cancer Research, vol. 55, p. 4988-94.
- 43 GARRISON, L. et N. D. McDonnell. 1999. "Etanercept: therapeutic use in patients with rheumatoid arthritis". Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 58 Suppl 1, p. I65-9.
- 44 GIRARD, D., N. Boiani et A. D. Beaulieu. 1998. "Human neutrophils express the interleukin-15 receptor alpha chain (IL-15Ralpha) but not the IL-9Ralpha component". Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 88, p. 232-40.
- 45 GIRARD, D., M. E. Paquet, R. Paquin et A. D. Beaulieu. 1996. "Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15". Blood, vol. 88, p. 3176-84.
- 46 GIRI, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki,

- A. Namen, L. S. Park, D. Cosman et D. Anderson. 1994. "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15". EMBO Journal, vol. 13, p. 2822-30.
- 47 GIRI, J. G., D. M. Anderson, S. Kumaki, L. S. Park, K. H. Grabstein et D. Cosman. 1995. "IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2". Journal of Leukocyte Biology, vol. 57, p. 763-6.
- 48 GIRI, J. G., S. Kumaki, M. Ahdieh, D. J. Friend, A. Loomis, K. Shanebeck, R. DuBose, D. Cosman, L. S. Park et D. M. Anderson. 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 Journal, vol. 14, p. 3654-63.
- 49 GOSSELIN, J., A. Tomolu, R. C. Gallo et L. Flamand. 1999. "Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response". Blood, vol. 94, p. 4210-9.
- 50 GRABSTEIN, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh et a. I. et. 1994. "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor". Science, vol. 264, p. 965-8.
- 51 GREENHALGH, C. J. et D. J. Hilton. 2001. "Negative regulation of cytokine signaling". Journal of Leukocyte Biology, vol. 70, p. 348-56.
- 52 HARADA, S., M. Yamamura, H. Okamoto, Y. Morita, M. Kawashima, T. Aita et H. Makino. 1999. "Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis". Arthritis and Rheumatism, vol. 42, p. 1508-16.
- 53 HASLETT, C., J. Savill et L. Meagher. 1990. "Macrophage recognition of senescent granulocytes". Biochemical Society Transactions, vol. 18, p. 225-7.
- 54 HASLETT, C., J. S. Savill, M. K. Whyte, M. Stern, I. Dransfield et L. C. Meagher. 1994. "Granulocyte apoptosis and the control of inflammation". Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences , vol. 345, p. 327-33.
- 55 HE, Y. W. et T. R. Malek. 1998. "The structure and function of gamma c-dependent cytokines and receptors: regulation of T lymphocyte development and homeostasis". Critical Reviews in Immunology, vol. 18, p. 503-24.
- 56 HOMBURG, C. H., M. de Haas, A. E. von dem Borne, A. J. Verhoeven, C. P. Reutelingsperger et D. Roos. 1995. "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro". Blood, vol. 85, p. 532-40.

- 57 HOMBURG, C. H. et D. Roos. 1996. "Apoptosis of neutrophils". Current Opinion in Hematology, vol. 3, p. 94-9.
- 58 INGLOT, A. D. 1997. "Classification of cytokines according to the receptor code". Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, vol. 45, p. 353-7.
- 59 IVASHKIV, L. B. 2000. "Jak-STAT signaling pathways in cells of the immune system". Rev Immunogenet, vol. 2, p. 220-30.
- 60 JANEWAY, C. A. Jr et R. Medzhitov. 2002. "Innate immune recognition". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 197-216.
- 61 JOHNSTON, J. A., C. M. Bacon, D. S. Finbloom, R. C. Rees, D. Kaplan, K. Shibuya, J. R. Ortaldo, S. Gupta, Y. Q. Chen, J. D. Giri et a. l. et. 1995. "Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 92, p. 8705-9.
- 62 JONULEIT, H., K. Wiedemann, G. Muller, J. Degwert, U. Hoppe, J. Knop et A. H. Enk. 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". Journal of Immunology, vol. 158, p. 2610-5.
- 63 KABUTOMORI, O. et Y. Iwatani. 2001. "Phagocytosis decreases the density of IgG-Fc receptor III on neutrophils". Annals of Hematology, vol. 80, p. 443-4.
- 64 KAKUMU, S., A. Okumura, T. Ishikawa, M. Yano, A. Enomoto, H. Nishimura, K. Yoshioka et Y. Yoshika. 1997. "Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease". Clinical and Experimental Immunology, vol. 109, p. 458-63.
- 65 KANEGANE, H. et G. Tosato. 1996. "Activation of naive and memory T cells by interleukin-15". Blood, vol. 88, p. 230-5.
- 66 KENNEDY, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce et J. J. Peschon. 2000. "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice". Journal of Experimental Medicine, vol. 191, p. 771-80.
- 67 KHAN, I. A., M. Moretto, X. Q. Wei, M. Williams, J. D. Schwartzman et F. Y. Liew. 2002. "Treatment with soluble interleukin-15Ralpha exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8+ T cell response". Journal of Experimental Medicine, vol. 195, p. 1463-70.
- 68 KIEFER, F., J. Brumell, N. Al-Alawi, S. Latour, A. Cheng, A. Veillette, S. Grinstein et T. Pawson. 1998. "The Syk protein tyrosine kinase is essential for

- Fc γ receptor signaling in macrophages and neutrophils". Molecular and Cellular Biology, vol. 18, p. 4209-20.
- 69 KILE, B. T. et W. S. Alexander. 2001. "The suppressors of cytokine signalling (SOCS)". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 58, p. 1627-35.
- 70 KILE, B. T., N. A. Nicola et W. S. Alexander. 2001. "Negative regulators of cytokine signaling". International Journal of Hematology, vol. 73, p. 292-8.
- 71 KIM, Y. S., W. Maslinski, X. X. Zheng, A. C. Stevens, X. C. Li, G. H. Tesch, V. R. Kelley et T. B. Strom. 1998. "Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc γ 2a protein blocks delayed-type hypersensitivity". Journal of Immunology, vol. 160, p. 5742-8.
- 72 KIMURA, Y., T. Takeshita, M. Kondo, N. Ishii, M. Nakamura, J. Van Snick et K. Sugamura. 1995. "Sharing of the IL-2 receptor γ chain with the functional IL-9 receptor complex". International Immunology, vol. 7, p. 115-20.
- 73 KIRMAN, I. et O. H. Nielsen. 1996. "Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis". American Journal of Gastroenterology, vol. 91, p. 1789-94.
- 74 KISSELEVA, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein et C. W. Schindler. 2002. "Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges". Gene, vol. 285, p. 1-24.
- 75 KIVISAKK, P., D. Matusevicius, B. He, M. Soderstrom, S. Fredrikson et H. Link. 1998. "IL-15 mRNA expression is up-regulated in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis (MS)". Clinical and Experimental Immunology, vol. 111, p. 193-7.
- 76 KOBAYASHI, S. D., J. M. Voyich, C. L. Buhl, R. M. Stahl et F. R. DeLeo. 2002. "Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, p. 6901-6.
- 77 KOBAYASHI, T., S. Tsunawaki et H. Seguchi. 2001. "Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide". Redox Rep, vol. 6, p. 27-36.
- 78 KRAUSE, H., B. Jandrig, C. Wernicke, S. Bulfone-Paus, T. Pohl et T. Diamantstein. 1996. "Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15)". Cytokine, vol. 8, p. 667-74.
- 79 KREBS, D. L. et D. J. Hilton. 2000. "SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling". Journal of Cell Science, vol. 113 (Pt 16), p. 2813-9.

- 80 KREBS, D. L. et D. J. Hilton. 2001. "SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling". Stem Cells, vol. 19, p. 378-87.
- 81 KURYYS, G., Y. Tagaya, R. Bamford, J. A. Hanover et T. A. Waldmann. 2000. "The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 30653-9.
- 82 LAUW, F. N., A. J. Simpson, J. M. Prins, M. D. Smith, M. Kurimoto, S. J. van Deventer, P. Speelman, W. Chaowagul, N. J. White et T. van der Poll. 1999. "Elevated plasma concentrations of interferon (IFN)-gamma and the IFN-gamma-inducing cytokines interleukin (IL)-18, IL-12, and IL-15 in severe melioidosis". Journal of Infectious Diseases, vol. 180, p. 1878-85.
- 83 LAW, D. A., L. Nannizzi-Alaimo, K. Ministri, P. E. Hughes, J. Forsyth, M. Turner, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, V. L. Tybulewicz et D. R. Phillips. 1999. "Genetic and pharmacological analyses of Syk function in alphaIIb beta3 signaling in platelets". Blood, vol. 93, p. 2645-52.
- 84 LECLERCQ, G., V. Debacker, M. de Smedt et J. Plum. 1996. "Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 184, p. 325-36.
- 85 LEE, Y. B., J. Satoh, D. G. Walker et S. U. Kim. 1996. "Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture". Neuroreport, vol. 7, p. 1062-6.
- 86 LEE, Y. H., K. H. Ely, A. Lepage et L. H. Kasper. 1999. "Interleukin-15 enhances host protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in T-cell receptor alpha-/-deficient mice". Parasite Immunology, vol. 21, p. 299-306.
- 87 LEONARD, W. J. 2001. "Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction". International Journal of Hematology, vol. 73, p. 271-7.
- 88 LEONARD, W. J. et J. J. O'Shea. 1998. "Jaks and STATs: biological implications". Annual Review of Immunology, vol. 16, p. 293-322.
- 89 LI, X. C., P. Roy-Chaudhury, W. W. Hancock, R. Manfro, M. S. Zand, Y. Li, X. X. Zheng, P. W. Nickerson, J. Steiger, T. R. Malek et T. B. Strom. 1998. "IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection". Journal of Immunology, vol. 161, p. 890-6.
- 90 LIN, J. X., T. S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J. A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E. T. Bloom, J. Mietz, S. John et a. I. et. 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, vol. 2, p. 331-9.

- 91 LIU, J. H., S. Wei, D. Ussery, P. K. Epling-Burnette, W. J. Leonard et J. Y. Djeu. 1994. "Expression of interleukin-2 receptor gamma chain on human neutrophils". Blood, vol. 84, p. 3870-5.
- 92 LIU, Z., K. Geboes, S. Colpaert, G. R. D'Haens, P. Rutgeerts et J. L. Ceuppens. 2000. "IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production". Journal of Immunology, vol. 164, p. 3608-15.
- 93 LODOLCE, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin et A. Ma. 1998. "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation". Immunity, vol. 9, p. 669-76.
- 94 LU, J. 1995. "[The classes, structures, functions and signaling transduction of cytokine receptors]". Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, vol. 26, p. 305-11.
- 95 MARINER, J. M., V. Lantz, T. A. Waldmann et N. Azimi. 2001. "Human T cell lymphotropic virus type I Tax activates IL-15R alpha gene expression through an NF-kappa B site". Journal of Immunology, vol. 166, p. 2602-9.
- 96 MASUDA, A., T. Matsuguchi, K. Yamaki, T. Hayakawa, M. Kubo, W. J. LaRochelle et Y. Yoshikai. 2000. "Interleukin-15 induces rapid tyrosine phosphorylation of STAT6 and the expression of interleukin-4 in mouse mast cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 29331-7.
- 97 MASUDA, A., T. Matsuguchi, K. Yamaki, T. Hayakawa et Y. Yoshikai. 2001. "Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 26107-13.
- 98 MCDONALD, P. P., M. P. Russo, S. Ferrini et M. A. Cassatella. 1998. "Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils". Blood, vol. 92, p. 4828-35.
- 99 MCINNES, I. B., J. al-Mughales, M. Field, B. P. Leung, F. P. Huang, R. Dixon, R. D. Sturrock, P. C. Wilkinson et F. Y. Liew. 1996. "The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis". Nature Medicine, vol. 2, p. 175-82.
- 100 MCINNES, I. B., B. P. Leung, R. D. Sturrock, M. Field et F. Y. Liew. 1997. "Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis". Nature Medicine, vol. 3, p. 189-95.
- 101 MINAMI, Y., Y. Nakagawa, A. Kawahara, T. Miyazaki, K. Sada, H. Yamamura et T. Taniguchi. 1995. "Protein tyrosine kinase Syk is associated with and activated by the IL-2 receptor: possible link with the c-myc induction pathway". Immunity, vol. 2, p. 89-100.
- 102 MIYAZAKI, T., Z. J. Liu, A. Kawahara, Y. Minami, K. Yamada, Y. Tsujimoto,

- E. L. Barsoumian, R. M. Permuter et T. Taniguchi. 1995. "Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation". Cell, vol. 81, p. 223-31.
- 103 MOHAMADZADEH, M., A. Takashima, I. Dougherty, J. Knop, P. R. Bergstresser et P. D. Cruz Jr. 1995. "Ultraviolet B radiation up-regulates the expression of IL-15 in human skin". Journal of Immunology, vol. 155, p. 4492-6.
- 104 MORELAND, L. W., S. W. Baumgartner, M. H. Schiff, E. A. Tindall, R. M. Fleischmann, A. L. Weaver, R. E. Ettliger, S. Cohen, W. J. Koopman, K. Mohler, M. B. Widmer et C. M. Blosch. 1997. "Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein". New England Journal of Medicine, vol. 337, p. 141-7.
- 105 MROZEK, E., P. Anderson et M. A. Caligiuri. 1996. "Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells". Blood, vol. 87, p. 2632-40.
- 106 MUNGER, W., S. Q. DeJoy, R. Jeyaseelan Sr, L. W. Torley, K. H. Grabstein, J. Eisenmann, R. Paxton, T. Cox, M. M. Wick et S. S. Kerwar. 1995. "Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin- 15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2". Cellular Immunology, vol. 165, p. 289-93.
- 107 MUSSO, T., L. Calosso, M. Zucca, M. Millesimo, M. Puliti, S. Bulfone-Paus, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi et R. Badolato. 1998. "Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells". Infection and Immunity, vol. 66, p. 2640-7.
- 108 MUSSO, T., L. Calosso, M. Zucca, M. Millesimo, D. Ravarino, M. Giovarelli, F. Malavasi, A. N. Ponzi, R. Paus et S. Bulfone-Paus. 1999. "Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15". Blood, vol. 93, p. 3531-9.
- 109 NAKARAI, T., M. J. Robertson, M. Streuli, Z. Wu, T. L. Ciardelli, K. A. Smith et J. Ritz. 1994. "Interleukin 2 receptor gamma chain expression on resting and activated lymphoid cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 180, p. 241-51.
- 110 NEGRIER, S., B. Escudier, C. Lasset, J. Y. Douillard, J. Savary, C. Chevreau, A. Ravaud, A. Mercatello, J. Peny, M. Mousseau, T. Philip et T. Tursz. 1998. "Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie". New England Journal of Medicine, vol. 338, p. 1272-8.
- 111 NEMUNAITIS, J. 1997. "A comparative review of colony-stimulating factors". Drugs, vol. 54, p. 709-29.

- 112 NIEDERLOVA, J. et K. Koubek. 1999. "[Chemokines and chemokine receptors. Review article]". Sbornik Lekarsky, vol. 100, p. 169-89.
- 113 NOGUCHI, M., Y. Nakamura, S. M. Russell, S. F. Ziegler, M. Tsang, X. Cao et W. J. Leonard. 1993. "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor". Science, vol. 262, p. 1877-80.
- 114 O'SHEA, J. J., M. Gadina et R. D. Schreiber. 2002. "Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway". Cell, vol. 109 Suppl, p. S121-31.
- 115 PARKIN, J. et B. Cohen. 2001. "An overview of the immune system". Lancet, vol. 357, p. 1777-89.
- 116 PASHENKOV, M., M. Mustafa, P. Kivisakk et H. Link. 1999. "Levels of interleukin-15-expressing blood mononuclear cells are elevated in multiple sclerosis". Scandinavian Journal of Immunology, vol. 50, p. 302-8.
- 117 PAVLAKIS, M., J. Strehlau, M. Lipman, M. Shapiro, W. Maslinski et T. B. Strom. 1996. "Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection". Transplantation, vol. 62, p. 543-5.
- 118 PELLETIER, M., C. Ratthe et D. Girard. 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 Letters, vol. 532, p. 164-70.
- 119 RAEDER, E. M., P. J. Mansfield, V. Hinkovska-Galcheva, J. A. Shayman et L. A. Boxer. 1999. "Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis". Journal of Immunology, vol. 163, p. 6785-93.
- 120 RAVETCH, J. V. et S. Bolland. 2001. "IgG Fc receptors". Annual Review of Immunology, vol. 19, p. 275-90.
- 121 RAVETCH, J. V. et R. A. Clynes. 1998. "Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo". Annual Review of Immunology, vol. 16, p. 421-32.
- 122 REINECKER, H. C., R. P. MacDermott, S. Mirau, A. Dignass et D. K. Podolsky. 1996. "Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15". Gastroenterology, vol. 111, p. 1706-13.
- 123 ROBERTSON, M. J. et J. Ritz. 1990. "Biology and clinical relevance of human natural killer cells". Blood, vol. 76, p. 2421-38.
- 124 ROSENBERG, S. A. 2001. "Progress in human tumour immunology and immunotherapy". Nature, vol. 411, p. 380-4.

- 125 ROSENBERG, S. A., J. C. Yang, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, J. S. Weber, D. R. Parkinson, C. A. Seipp, J. H. Einhorn et D. E. White. 1994. "Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2". JAMA, vol. 271, p. 907-13.
- 126 ROSS, M. E. et M. A. Caligiuri. 1997. "Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response". Blood, vol. 89, p. 910-8.
- 127 ROSSI, D. et A. Zlotnik. 2000. "The biology of chemokines and their receptors". Annual Review of Immunology, vol. 18, p. 217-42.
- 128 RUCHATZ, H., B. P. Leung, X. Q. Wei, I. B. McInnes et F. Y. Liew. 1998. "Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology". Journal of Immunology, vol. 160, p. 5654-60.
- 129 RUSSELL, S. M., A. D. Keegan, N. Harada, Y. Nakamura, M. Noguchi, P. Leland, M. C. Friedmann, A. Miyajima, R. K. Puri, W. E. Paul et a. I. et. 1993. "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor". Science, vol. 262, p. 1880-3.
- 130 RUTELLA, S., L. Pierelli, G. Bonanno, A. Mariotti, S. Sica, F. Sora, P. Chiusolo, G. Scambia, C. Rumi et G. Leone. 2001. "Immune reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of interleukin-15 on T-cell survival and effector functions". Experimental Hematology, vol. 29, p. 1503-16.
- 131 SAKAI, T., K. Kusugami, H. Nishimura, T. Ando, T. Yamaguchi, M. Ohsuga, K. Ina, A. Enomoto, Y. Kimura et Y. Yoshikai. 1998. "Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease". Gastroenterology, vol. 114, p. 1237-43.
- 132 SAVILL, J. 1997. "Apoptosis in resolution of inflammation". Journal of Leukocyte Biology, vol. 61, p. 375-80.
- 133 SAVILL, J. 1992. "Macrophage recognition of senescent neutrophils". Clin Sci (Lond), vol. 83, p. 649-55.
- 134 SAVILL, J. et C. Haslett. 1995. "Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation". Seminars in Cell Biology, vol. 6, p. 385-93.
- 135 SAVILL, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson et C. Haslett. 1989. "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages". Journal of Clinical Investigation, vol. 83, p. 865-75.
- 136 SCHEERLINCK, J. P., G. Casey, P. McWaters, J. Kelly, D. Woollard, M. W.

- Lightowlers, J. M. Tennent et P. J. Chaplin. 2001. "The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of cytokine genes using a DNA prime-protein boost strategy". Vaccine, vol. 19, p. 4053-60.
- 137 SMITH, X. G., E. M. Bolton, H. Ruchatz, X. Wei, F. Y. Liew et J. A. Bradley. 2000. "Selective blockade of IL-15 by soluble IL-15 receptor alpha-chain enhances cardiac allograft survival". Journal of Immunology, vol. 165, p. 3444-50.
- 138 SQUIER, M. K., A. J. Sehnert et J. J. Cohen. 1995. "Apoptosis in leukocytes". Journal of Leukocyte Biology, vol. 57, p. 2-10.
- 139 STARR, R. et D. J. Hilton. 1999. "Negative regulation of the JAK/STAT pathway". Bioessays, vol. 21, p. 47-52.
- 140 SU, L. et M. David. 2000. "Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon- alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 12661-6.
- 141 TAGA, T. et T. Kishimoto. 1992. "Cytokine receptors and signal transduction". FASEB Journal, vol. 6, p. 3387-96.
- 142 TAGAYA, Y., R. N. Bamford, A. P. DeFilippis et T. A. Waldmann. 1996. "IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels". Immunity, vol. 4, p. 329-36.
- 143 TAGAYA, Y., J. D. Burton, Y. Miyamoto et T. A. Waldmann. 1996. "Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells". EMBO Journal, vol. 15, p. 4928-39.
- 144 TAGAYA, Y., G. Kurys, T. A. Thies, J. M. Losi, N. Azimi, J. A. Hanover, R. N. Bamford et T. A. Waldmann. 1997. "Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 14444-9.
- 145 TINHOFER, I., I. Marschitz, T. Henn, A. Egle et R. Greil. 2000. "Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma". Blood, vol. 95, p. 610-8.
- 146 TINUBU, S. A., J. Hakimi, J. A. Kondas, P. Bailon, P. C. Familletti, C. Spence, M. D. Crittenden, G. L. Parenteau, F. M. Dirbas, M. Tsudo et a. I. et. 1994. "Humanized antibody directed to the IL-2 receptor beta-chain prolongs primate cardiac allograft survival". Journal of Immunology, vol. 153, p. 4330-8.
- 147 TRENTIN, L., A. Cerutti, R. Zambello, R. Sancretta, C. Tassinari, M. Facco, F. Adami, F. Rodeghiero, C. Agostini et G. Semenzato. 1996. "Interleukin-15

promotes the growth of leukemic cells of patients with B- cell chronic lymphoproliferative disorders". Blood, vol. 87, p. 3327-35.

- 148 TRNENY, M. et P. Klener. 1992. "[Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications]". Casopis Lekarů Ceskych, vol. 131, p. 427-33.
- 149 TYTHER, R., N. Fanning, M. Halligan, J. Wang, H. P. Redmond et G. Shorten. 2001. "The effect of the anaesthetic agent isoflurane on the rate of neutrophil apoptosis in vitro". Irish Journal of Medical Science, vol. 170, p. 41-4.
- 150 UMEMURA, M., H. Nishimura, K. Hirose, T. Matsuguchi et Y. Yoshikai. 2001. "Overexpression of IL-15 in vivo enhances protection against Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection via augmentation of NK and T cytotoxic 1 responses". Journal of Immunology, vol. 167, p. 946-56.
- 151 UNDERHILL, D. M. et A. Ozinsky. 2002. "Phagocytosis of microbes: complexity in action". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 825-52.
- 152 URIBE, L. et K. I. Weinberg. 1998. "X-linked SCID and other defects of cytokine pathways". Seminars in Hematology, vol. 35, p. 299-309.
- 153 VAN GELDER, T., C. C. Baan, A. H. Balk, C. J. Knoop, C. T. Holweg, P. van der Meer, B. Mochtar, P. E. Zondervan, H. G. Niesters et W. Weimar. 1998. "Blockade of the interleukin (IL)-2/IL-2 receptor pathway with a monoclonal anti-IL-2 receptor antibody (BT563) does not prevent the development of acute heart allograft rejection in humans". Transplantation, vol. 65, p. 405-10.
- 154 VEILLETTE, A., S. Latour et D. Davidson. 2002. "Negative regulation of immunoreceptor signaling". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 669-707.
- 155 VILCHES, C. et P. Parham. 2002. "KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 217-51.
- 156 VOSE, J. M. et J. O. Armitage. 1995. "Clinical applications of hematopoietic growth factors". Journal of Clinical Oncology, vol. 13, p. 1023-35.
- 157 WEILER, M., B. Rogashev, T. Einbinder, M. J. Hausmann, J. Kaneti, C. Chaimovitz et A. Douvdevani. 1998. "Interleukin-15, a leukocyte activator and growth factor, is produced by cortical tubular epithelial cells". Journal of the American Society of Nephrology, vol. 9, p. 1194-201.
- 158 WILKINSON, P. C. et F. Y. Liew. 1995. "Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15". Journal of Experimental Medicine, vol. 181, p. 1255-9.

- 159 WITTHUHN, B. A., O. Silvennoinen, O. Miura, K. S. Lai, C. Cwik, E. T. Liu et J. N. Ihle. 1994. "Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells". Nature, vol. 370, p. 153-7.
- 160 YAJIMA, T., H. Nishimura, R. Ishimitsu, T. Watase, D. H. Busch, E. G. Pamer, H. Kuwano et Y. Yoshikai. 2002. "Overexpression of IL-15 in vivo increases antigen-driven memory CD8+ T cells following a microbe exposure". Journal of Immunology, vol. 168, p. 1198-203.
- 161 YASUKAWA, H., A. Sasaki et A. Yoshimura. 2000. "Negative regulation of cytokine signaling pathways". Annual Review of Immunology, vol. 18, p. 143-64.
- 162 YU, H., T. A. Fehniger, P. Fuchshuber, K. S. Thiel, E. Vivier, W. E. Carson et M. A. Caligiuri. 1998. "Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15". Blood, vol. 92, p. 3647-57.
- 163 ZAMBELLO, R., M. Facco, L. Trentin, R. Sancetta, C. Tassinari, A. Perin, A. Milani, G. Pizzolo, F. Rodeghiero, C. Agostini, R. Meazza, S. Ferrini et G. Semenzato. 1997. "Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes". Blood, vol. 89, p. 201-11.
- 164 ZHANG, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough et J. Sprent. 1998. "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15". Immunity, vol. 8, p. 591-9.
- 165 ZIOLKOWSKA, M., A. Koc, G. Luszczkiewicz, K. Ksiezopolska-Pietrzak, E. Klimczak, H. Chwalinska-Sadowska et W. Maslinski. 2000. "High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism". Journal of Immunology, vol. 164, p. 2832-8.